

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**Université Mentouri Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Animale**

**N° d'ordre: 199 / Mag / 2009**

**N° de série: 009 / SN / 2009**

**MEMOIRE**

**En vue de l'obtention du diplôme de magistère en biologie cellulaire et moléculaire**  
**Option: Toxicologie cellulaire et moléculaire**

**THEME**

**PROPRIETES ANTIOXYDANTES ET ACTIVITE INHIBITRICE**  
**DE LA XANTHINE OXYDASE DES EXTRAITS DE LA PLANTE**  
**MEDICINALE *Ajuga iva* (L.) Schreber**

**Présenté par: M<sup>elle</sup> ADJADJ Moufida**

**Soutenu le:**

**20 / 06 / 2009**

**Devant le Jury:**

<b>Président:</b>	<b>Dr. KHELIFI TOUHAMI Fatima</b>	<b>M.C., Université de Constantine</b>
<b>Rapporteur:</b>	<b>Dr. BAGHIANI Abderrahmane</b>	<b>M.C., Université de Sétif</b>
<b>Examineurs:</b>	<b>Dr. ABIDLI Nacira</b>	<b>M.C., Université de Constantine</b>
	<b>Pr. ARRAR Lekhmici</b>	<b>Pr., Université de Sétif</b>

**Année Universitaire 2008 - 2009**

## REMERCIEMENTS

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.*

*Je voudrais remercier Monsieur BAGHIANI Abderrahmane, Maître de Conférences au département de Biologie, Université F.A. de Sétif, pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et son équipe et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.*

*Je remercie Madame KHELIFI TOUHAMI Fatima, Maître de Conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Mentouri de Constantine, pour son aide et ses encouragements, et d'avoir accepté d'être présidente du jury de mon mémoire.*

*Je remercie également Madame ABIDLI Nacira, Maître de Conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Mentouri de Constantine, pour ses conseils et son aide, et d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier Monsieur ARRAR Lefhimici, Professeur au département de Biologie, Université F.A. de Sétif, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire, pour sa disponibilité cordiale et ses précieux conseils.*

*J'adresse également mes remerciements à Mme. BOUMERFEG Sabah, Chargée de cours au centre universitaire de Bordj-Bou-Argeridj, pour ces conseils pratiques, techniques et scientifiques. Elle reste pour moi un exemple à suivre. Merci !*

*Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.*

## DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.*

*À mes sœurs et frères, et à toute la famille.*

*À tous mes amis et collègues.*

*À tous ceux que j'aime.*

# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

**INTRODUCTION**.....1

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. La xanthine oxydoréductase</b> .....	3
1.1. Structure.....	4
1.2. Distribution et localisation de la XOR.....	6
1.3. Propriétés enzymatiques et mécanisme d'action.....	6
1.4. La conversion de la XDH en XO.....	10
1.5. Les formes inactives de la XOR.....	11
1.6. Rôles physiologiques de la XOR.....	11
1.7. Rôles pathologiques de la XOR.....	12
1.7.1. Rôle de la XOR dans l'inflammation.....	12
1.7.2. Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion.....	12
1.7.3. Rôle de la XOR dans d'autres maladies.....	14
1.8. Les inhibiteurs de la XOR.....	14
1.8.1. Les inhibiteurs analogues de substrats.....	14
1.8.2. Autres inhibiteurs de la XOR.....	15
<b>2. Le stress oxydatif</b> .....	17
2.1. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène.....	17
2.2. Sources des radicaux libres.....	17
2.3. Principales cibles des ROS.....	21
2.4. Les maladies liées au stress oxydant.....	23
<b>3. Les antioxydants</b> .....	24
3.1. Antioxydants enzymatiques.....	24
3.1.1. Le Superoxyde dismutase (SOD).....	24
3.1.2. La Catalase (CAT).....	24
3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (GR).....	25

3.2. Antioxydants non enzymatiques.....	26
3.2.1. La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol).....	26
3.2.2. La vitamine C (acide ascorbique).....	26
3.2.3. Les caroténoïdes.....	26
3.2.4. Les flavonoïdes.....	26
<b>4. Les polyphénols.....</b>	<b>27</b>
4.1. Les acides phénoliques.....	27
4.2. Les tannins.....	27
4.3. Les flavonoïdes.....	28
4.3.1. Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes.....	28
4.3.2. Classification des flavonoïdes.....	31
4.3.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	32
<b>5. La plante médicinale <i>Ajuga iva</i> L.....</b>	<b>39</b>
5.1. Description de la plante.....	39
5.2. Nomenclature de la plante.....	40
5.3. Composition chimique de la plante.....	40
5.4. Utilisation traditionnelle de la plante.....	41

## MATERIEL ET METHODES

<b>1. Matériel.....</b>	<b>43</b>
1.1. Matériel biologique.....	43
1.2. Réactifs chimiques et matériel instrumental.....	43
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>44</b>
2.1. Purification de la xanthine oxydase.....	44
2.2. Contrôle de pureté de la XO.....	45
2.3. Estimation de l'activité enzymatique de la XO.....	45
2.4. Extraction des flavonoïdes d' <i>Ajuga iva</i> .....	46
2.5. Dosage des polyphénols totaux.....	48
2.6. Dosage des flavonoïdes.....	49
2.7. Inhibition de l'activité de la xanthine oxydase par les extraits d' <i>Ajuga iva</i> .....	50
2.8. Effet scavenger des extraits d' <i>Ajuga iva</i> sur le superoxyde produit par la XO.....	50
2.9. Propriétés antioxydantes des extraits d' <i>Ajuga iva</i> .....	51

2.9.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits d' <i>Ajuga iva</i> par la méthode de DPPH (effet scavenger).....	51
2.9.2. Test de $\beta$ -carotène / acide linoléique.....	52
2.10. Analyse statistique.....	52

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Purification, contrôle de pureté et estimation de l'activité de la xanthine oxydase.....	53
2. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	55
3. Inhibition de la xanthine oxydase par les extraits d' <i>Ajuga iva</i> .....	57
4. Effet scavenger des extraits d' <i>Ajuga iva</i> sur l' $O_2^{\circ}$ produit par la XO.....	60
5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits d' <i>Ajuga iva</i> par la méthode de DPPH (effet scavenger).....	63
6. Test de $\beta$ -carotène / acide linoléique.....	67
Discussion générale.....	70

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....74**

Résumé en Arabe.....	94
Résumé en Français.....	95
Résumé en Anglais.....	96

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b><i>A. iva</i></b>	<i>Ajuga iva</i>
<b>AA %</b>	Pourcentage de l'activité antioxydante
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AISE</b>	<i>Ajuga iva</i> shoot extracts
<b>AqE</b>	Aqueous extract
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BHT</b>	Butylated hydroxytoluene
<b>BMXO</b>	Bovine milk xanthine oxidase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CBB</b>	Coomassie brillant blue
<b>ChE</b>	Chloroform extract
<b>CrE</b>	Crud extract
<b>cyt c</b>	Cytochrome c
<b>Da</b>	Dalton
<b>DPPH</b>	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EAc</b>	Extrait d'acétate d'éthyle
<b>EaE</b>	Ethyl acetate extract
<b>EAI</b>	Extraits d' <i>Ajuga iva</i>
<b>EAq</b>	Extrait aqueux
<b>EBr</b>	Extrait brut
<b>ECh</b>	Extrait de chloroforme
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EHx</b>	Extrait d'héxane
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavine adénine dinucléotide réduit
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion disulfure oxydé
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HHDP</b>	Héxahydroxydiphénique
<b>HxE</b>	Hexane extract
<b>I %</b>	Pourcentage d'inhibition

<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice de 50 %
<b>IL</b>	Interleukine
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>LOO<sup>°</sup></b>	Lipid peroxide radical
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>Mo</b>	Molybdène
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>NADPHO</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit oxydase
<b>NO<sup>°</sup></b>	Radical nitroxyle
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrite
<b>NOS</b>	NO synthase
<b>O<sub>2</sub><sup>°-</sup></b>	Radical superoxyde
<b>OH<sup>°</sup></b>	Radical hydroxyle
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxynitrite
<b>PFR</b>	Protein to flavine ratio
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>RNS</b>	Reactive nitrogene species
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>rpm</b>	Rotations par minute
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulphate
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamid gel electrophoresis
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>TEMED</b>	N,N,N'N' Tetramethylenediamine
<b>TNF</b>	Tumour necrosis factor
<b>UI</b>	Unité internationale
<b>UV-Vis</b>	Ultraviolet-Visible
<b>XDH</b>	Xanthine déshydrogénase
<b>XO</b>	Xanthine oxydase
<b>XOR</b>	Xanthine oxydoréductase

## LISTE DES FIGURES

<b>Fig. 1:</b> Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase.....	3
<b>Fig. 2:</b> Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase.....	5
<b>Fig. 3:</b> Schéma de l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au niveau du site Mo, et du NADH au niveau du site FAD. Et la réduction du NAD <sup>+</sup> ou de l'O <sub>2</sub> au niveau du site FAD.....	7
<b>Fig. 4:</b> Rôle de la XOR dans l'oxydation du NADH et la génération du radical nitroxy (NO <sup>°</sup> ) et du peroxy-nitrite (ONOO)......	8
<b>Fig. 5:</b> Mécanisme réactionnel de la XDH (A) et de la XO (B).....	9
<b>Fig. 6:</b> Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion.....	13
<b>Fig. 7:</b> A: Structures des substrats puriniques de la XOR. B: Structures des inhibiteurs de la XOR analogues de substrats.....	15
<b>Fig. 8:</b> Structure de l'inhibiteur synthétique non purinique Febuxostat.....	16
<b>Fig. 9 :</b> Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.....	19
<b>Fig. 10:</b> Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	25
<b>Fig. 11:</b> Structure de base des flavonoïdes.....	28
<b>Fig. 12:</b> La biosynthèse des flavonoïdes.....	30
<b>Fig. 13:</b> Relation structure/activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la xanthine oxydase (Les valeurs sont les IC <sub>50</sub> exprimées en µM).....	34
<b>Fig. 14:</b> Sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me <sup>n+</sup> ).....	35
<b>Fig. 15:</b> Effet scavenger sur les radicaux libres (R <sup>°</sup> ) par les flavonoïdes.....	36
<b>Fig. 16:</b> Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	37
<b>Fig. 17:</b> Quelques photos d' <i>Ajuga iva</i> .....	42

<b>Fig. 18:</b> Etapes de l'extraction des flavonoïdes d' <i>A. iva</i> par la méthode de Markham (1982).....	47
<b>Fig. 19:</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. ....	48
<b>Fig. 20:</b> Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine.....	49
<b>Fig. 21:</b> Spectre d'absorption UV-Vis ( <b>A</b> ) et électrophorèse (SDS-PAGE) ( <b>B</b> ) de la XO purifiée...	54
<b>Fig. 22:</b> Effet inhibiteur des extraits d' <i>A. iva</i> sur l'activité de la XO.....	58
<b>Fig. 23:</b> Les concentrations des extraits d' <i>A. iva</i> et de l'allopurinol qui inhibent 50 % de l'activité de la XO.....	59
<b>Fig. 24:</b> Effet inhibiteur de la réduction du cyt c par l' $O_2^{\circ-}$ produit par la XO des extraits d' <i>A. iva</i> .....	61
<b>Fig. 25:</b> Les concentrations des extraits d' <i>A. iva</i> qui inhibent 50 % de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50 % du cyt c par l' $O_2^{\circ-}$ produit par cette enzyme.....	62
<b>Fig. 26:</b> Effet scavenger des extraits d' <i>A. iva</i> sur le radical DPPH.....	63
<b>Fig. 27:</b> La réduction du DPPH par un antioxydant.....	64
<b>Fig. 28:</b> $IC_{50}$ du radical DPPH des différents extraits d' <i>A. iva</i> et des composés phénoliques.....	65
<b>Fig. 29:</b> Activité antioxydante des extraits d' <i>A. iva</i> par rapport au BHT, MeOH et H <sub>2</sub> O par le test de $\beta$ -carotène / acide linoléique.....	67
<b>Fig. 30:</b> Activité antioxydante des l'extrait d' <i>A. iva</i> et du BHT, MeOH et H <sub>2</sub> O (à 24 h), par le test de $\beta$ -carotène / acide linoléique.....	69

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Les principales sources des ROS.....	17
<b>Tableau 2 :</b> Quelques maladies liées au stress oxydant.....	23
<b>Tableau 3:</b> Quelques activités biologiques des flavonoïdes.....	38
<b>Tableau 4:</b> L'activité totale et oxydase de la XOR purifiée à partir du lait bovin frais.....	55
<b>Tableau 5:</b> Rendement des extraits d' <i>A. iva</i> et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonides....	57
<b>Tableau 6:</b> Les concentrations des extraits d' <i>A. iva</i> qui inhibent 50 % de l'activité de la XO.....	58
<b>Tableau 7:</b> Les concentrations des extraits d' <i>A. iva</i> qui inhibent la réduction de 50 % du cyt c par l'O <sub>2</sub> <sup>°</sup> produit par la XO.....	61
<b>Tableau 8:</b> Les concentrations des extraits d' <i>A. iva</i> et des composés phénoliques qui inhibent 50 % du radical DPPH.....	64
<b>Tableau 9:</b> Effet antioxydant des différents extraits d' <i>A. iva</i> par le test de β-carotène / acide linoléique.....	68

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Les plantes ont été utilisées comme remèdes pour les maladies humaines dans la médecine Chinoise presque 4000 à 6000 années avant la découverte des composés bioactifs tels que les flavonoïdes. Ces derniers possèdent une capacité antioxydante très importante et peuvent contribuer à une diminution du stress oxydatif *via* l'inhibition ou l'activation d'enzymes (Koyama et al., 1999). Le concept du stress oxydant est un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes (Favier, 2003). Les radicaux libres sont générés dans les mitochondries lors du transfert d'électrons, dans les cellules phagocytaires lors d'un processus inflammatoire et au cours de processus physiologiques d'oxydoréduction. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules. En effet, ils peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (Bandhopadhyay et al., 1999).

Plus de 100 pathophysiologies humaines, allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire comme l'arthrite rhumatoïde, sont liées notamment au stress oxydant (Govindarajan et al., 2005).

A condition physiologique, le pouvoir oxydant des radicaux libres est contrebalancé par de nombreux antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, on peut notamment citer certaines vitamines (C, E et bêta-carotène), mais aussi les phyto-nutriments (polyphénols, caroténoïdes...), les oligo-éléments (sélénium, zinc, cuivre,...), etc. (Mauro, 2006). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (tabac, pollution, infections...). L'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-

vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de très nombreux polyphénols, vitamines et oligo-éléments dans ces aliments (Favier, 2003).

En Algérie, beaucoup de plantes sont traditionnellement utilisées pour traiter les maladies inflammatoires, en particulier le rhumatisme. Parmi ces plantes, *Ajuga iva*, connue sous le nom commun Chendgoura, est largement utilisée dans les régions semi arides et particulièrement dans l'Est Algérien. Malgré son utilisation très vaste dans la médecine traditionnelle, *A. iva* reste très peu étudiée et spécialement dans la lutte contre le stress oxydatif.

L'objectif essentiel de ce présent travail, consiste à chercher le (s) extrait (s) d'*A. iva* susceptible (s) de bloquer l'action des ROS soit par inhibition des sources génératrices des ROS ou par piégeage direct de ces espèces (effet scavenger). Pour cela, le pouvoir inhibiteur des différents extraits sur l'activité de l'enzyme génératrice de ROS; la xanthine oxydoréductase bovine (XOR), a été étudié. L'évaluation du pouvoir scavenger des différents extraits sur l'anion superoxyde et sur le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été également effectuée. Enfin, l'effet anti-péroxydation lipidique des différents extraits d'*A. iva* a été testé en utilisant la test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique.

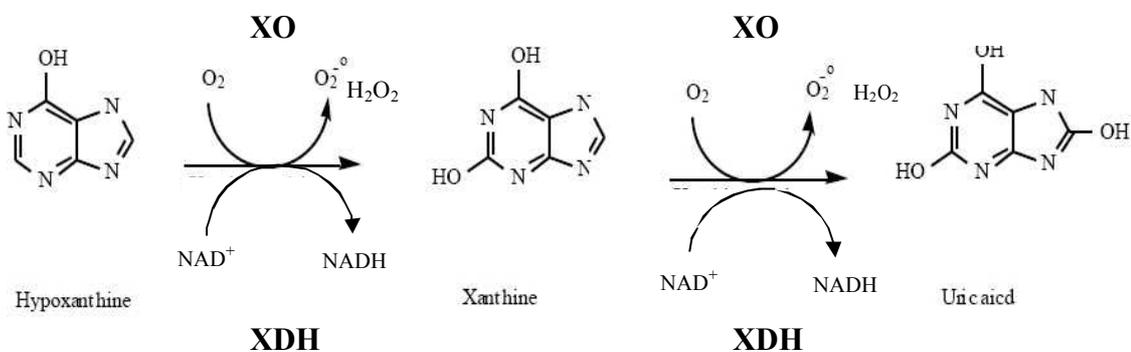
# ***REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoprotéique qui a été identifié pour la première fois dans le lait bovin (Schardinger, 1902). La xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) et la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) sont des formes interconvertibles de la même enzyme; xanthine oxydoréductase (Battelli et al., 1992; Page et al., 1998; Masuoka and Kubo, 2004; Pacher et al., 2006).

La xanthine oxydase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines, qui catalyse l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique, et la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (**Figure 1**) (Page et al., 1998; Masuoka and Kubo, 2004; Da Silva et al., 2004., Nikolic et al., 2006; You et al., 2006; Pacher et al., 2006; Ferrari et al., 2007). L'acide urique joue un grand rôle dans la goutte et l'hyperuricémie (Harris et al., 1999; Unno et al., 2004).

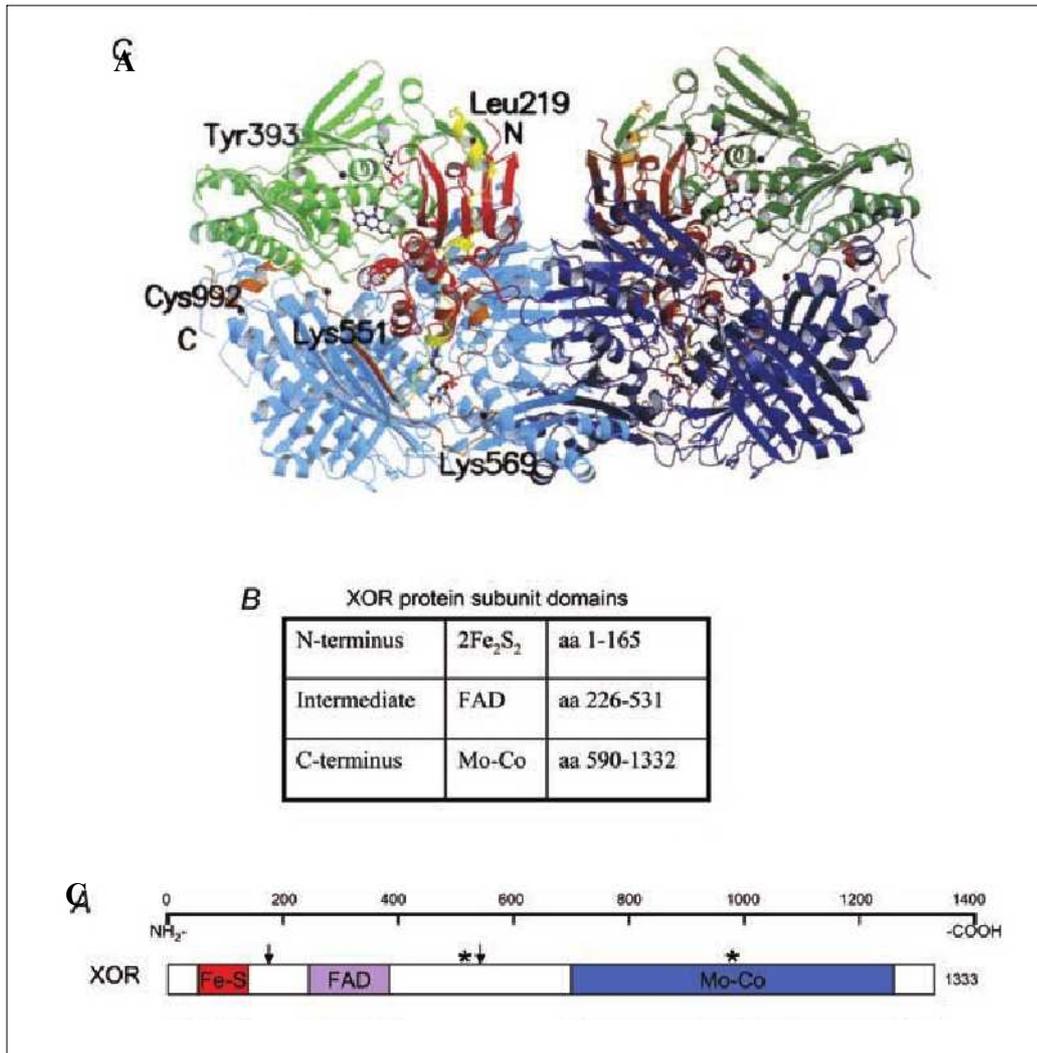


**Figure 1:** Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase (Cotelle, 2001).

## 1.1. Structure

La XOR est une enzyme homodimère composée de deux sous-unités identiques chacune est de poids moléculaire d'environ 145 kDa (Krenitsky et al., 1986; Berry and Hare, 2004; Pacher et al., 2006). Chaque sous unité est organisée en trois domaines (**Figure 2**) chacun est associé à un cofacteur spécifique: le domaine N-terminal de 20 kDa, contient deux centres ( $Fe_2 / S_2$ ), le domaine central (FAD) de 40 kDa et le domaine C-terminal de 85 kDa contient un centre molybdoptérine (Mo) (Harrison, 2002; Baghiani et al., 2003; Berry and Hare, 2004; Pacher et al., 2006).

Le gène qui code pour la XOR humaine a plus de 60 kb, il est composé de 36 exons et 35 introns (Xu et al., 1996). Ce gène est localisé dans la bande p22 du chromosome 2 (Ichida et al., 1993; Xu et al., 1994). La séquence de la XOR humaine est de 1333 acides aminés, elle est de 91% d'homologie avec celle de la XOR de la souris et du rat (Xu et al., 1994).



**Figure 2:** Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase.

**A:** Structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine; les domaines identiques des deux sous unités sont représentés par les mêmes couleurs (claire pour le monomère à gauche, et plus foncées pour celui à droite): en rouge le domaine du Fe<sub>2</sub> / S<sub>2</sub>, en vert le domaine du FAD et en bleu le domaine Mo (Enroth et al., 2000). **B:** Les trois domaines des sous unités de la XOR, leurs tailles et leurs cofacteurs associés (Enroth et al., 2000). **C:** Structure secondaire de la XOR, les flèches indiquent les sites de protéolyse par la trypsine (Amaya et al., 1990) et les étoiles indiquent les résidus cystéines modifiés lors de la conversion réversible de la XOR (Cys 535, Cys 992) (Nishino and Nishino, 1997).

## 1.2. Distribution et localisation de la XOR

La XOR est une enzyme distribuée dans la plus part des êtres vivants, comme les bactéries (Woolfolk and Downard, 1977), les végétaux et l'homme (Kooij et al., 1992). Le gène de la XOR est hautement exprimé dans le foie et l'intestin grêle où il a une forte activité (Parks and Granger, 1986 ; Wright et al., 1993).

Les études ont montré que l'enzyme est localisée dans les différents tissus des mammifères, en particulier les cellules hépatiques et les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Moriwaki et al, 1993). Dans les tissus humains, la XOR se trouve dans le foie, l'intestin grêle et la glande mammaire (Linder et al., 1999).

Les méthodes de localisation intracellulaire montrent que la XOR se trouve à fortes concentrations dans le cytoplasme (Jarasch et al, 1981) et au niveau de la membrane cellulaire (Rouquette et al., 1998), et elle est très abondante dans le lait (Mather, 2000).

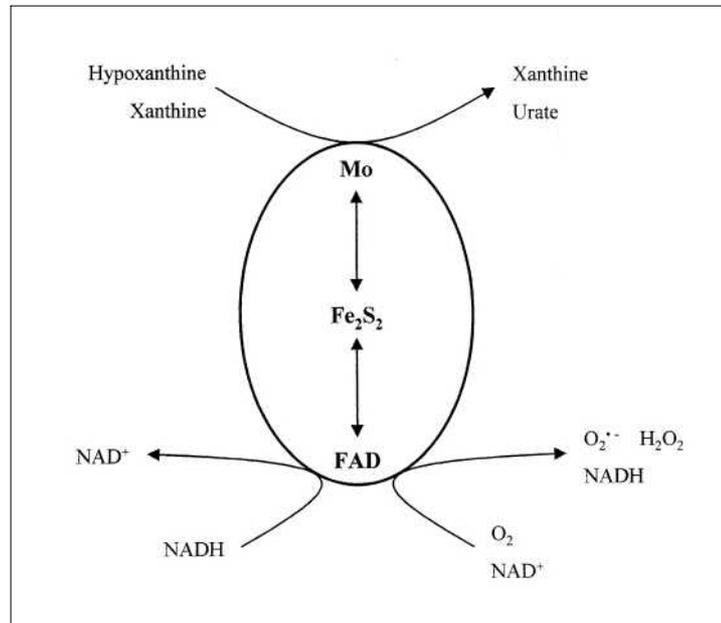
## 1.3. Propriétés enzymatiques et mécanisme d'action

La XOR catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (le produit final du catabolisme des purines humains) (Usuda et al., 1988).

Les études ont montré que l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine se fait au niveau du centre Mo de l'enzyme en le donnant deux électrons (Xia et al., 1999) qui sont transférés au centre FAD par l'intermédiaire des centres  $Fe_2 / S_2$  (Hille and Anderson, 1991), qui sont considérés comme réservoirs d'électrons (**Figure 3**) (Olson et al., 1974a).

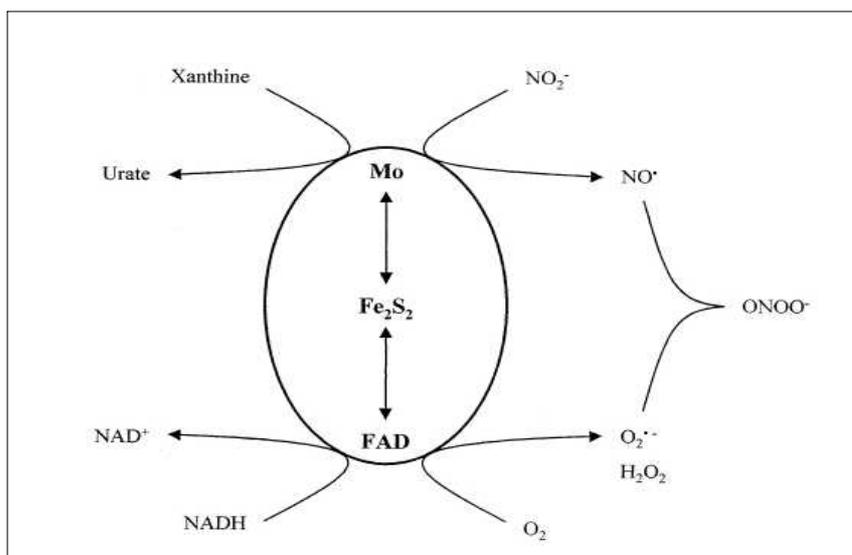
Ensuite le  $NAD^+$ , ou l' $O_2$ , accepte les électrons à partir du centre FAD (**Figure 3**) (Olson et al., 1974b; Hille and Massey, 1981a). L'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) peut être réduit par la XO soit d'une manière bivalente pour donner le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ou d'une manière univalente pour donner le radical superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) (Hille and Massey, 1981a). Le radical hydroxyle ( $OH^{\circ}$ ) peut donc se former à partir de l' $H_2O_2$  via les réactions de Fenton et Haber-Weiss. Par contre, le  $NAD^+$  se fixe au centre FAD de la XDH, et donc deux électrons sont transférés au  $NAD^+$  pour le réduire de manière bivalente en NADH (Harris and Massey, 1997a).

Les deux formes de la XOR peuvent aussi fonctionner comme une NADH oxydase (**Figure 3**) (Harris and Massey, 1997b; Sanders et al., 1997; Zhang et al., 1998). Le NADH se réagit directement avec le centre FAD pour le réduire en FADH<sub>2</sub> qui donne les électrons à l'O<sub>2</sub> pour le réduire en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sanders et al., 1997; Zhang et al., 1998).



**Figure 3:** Schéma de l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au niveau du site Mo, et du NADH au niveau du site FAD. Et la réduction du NAD<sup>+</sup> ou de l'O<sub>2</sub> au niveau du site FAD (Harrison, 2002).

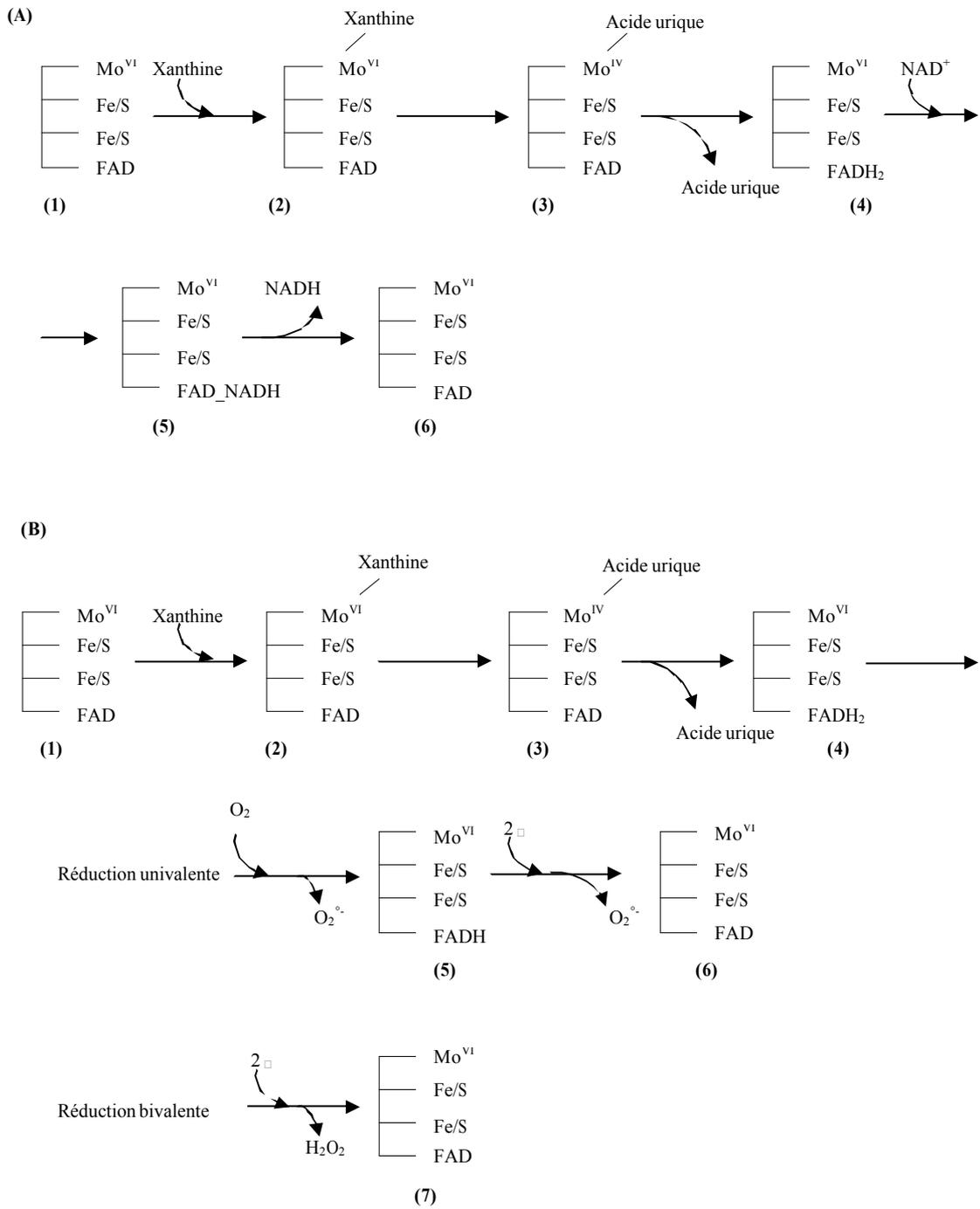
Le radical nitroxyde (NO<sup>•</sup>) est normalement produit par la NO synthase (NOS), mais dans les conditions hypoxiques (anaérobiques), cette enzyme ne peut pas le produire (Berry and Hare, 2004). Donc la XOR joue le rôle du NOS. En présence de nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et d'un substrat réducteur (Xanthine ou NADH), le NO<sup>•</sup> est formé au niveau du site Mo (**Figure 4**). Ensuite, le site FAD catalyse la production de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en présence de l'oxygène moléculaire. Le superoxyde produit se combine avec le NO<sup>•</sup> pour former le peroxyde nitrite (ONOO<sup>-</sup>), qui est une espèce oxydante non radicalaire extrêmement toxique (Godber et al., 2000; Harrison, 2002).



**Figure 4:** Rôle de la XOR dans l'oxydation du NADH et la génération du radical nitroxyde (NO<sup>•</sup>) et du peroxyxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Harrison, 2002).

Donc le mécanisme réactionnel de la XOR consiste en deux demi-réactions, d'oxydation et de réduction (Olson et al., 1974a). La demi-réaction de réduction se passe au niveau du site Mo où la xanthine subit une oxydation, de telle façon un hydrogène est transféré au site MoVI oxydé pour le réduire en MoIV (**Figure 5**) (Xia et al., 1999). En même temps, dans la même position de la xanthine, se fixe un groupement hydroxyle qui forme l'acide urique. Ce groupement hydroxyle est dérivé à partir d'une molécule d'eau (H<sub>2</sub>O) (Murray et al., 1966).

La demi-réaction d'oxydation se passe au niveau du site FAD (Hille and Nishino, 1995), où se fait un transfert intramoléculaire d'électrons entre les sites Mo et FAD médié par le site Fe<sub>2</sub> / S<sub>2</sub> pour réoxyder le MoIV en MoVI avec une libération du produit (acide urique) suivie d'une réduction du FAD en FADH<sub>2</sub> (**Figure 5**) (Olson et al, 1974a). Si la demi-réaction d'oxydation est catalysée par la XDH, le NAD<sup>+</sup> est fixé sur le FADH<sub>2</sub> et donc subit une réduction bivalente par les deux électrons du FADH<sub>2</sub> (Harris and Massey 1997a). Par contre, si la demi-réaction d'oxydation est catalysée par la XO le substrat oxydant est l'O<sub>2</sub> qui sera réduit soit d'une manière univalente pour donner l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, soit d'une manière bivalente pour donner l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hille and Massey, 1981a).



**Figure 5:** Mécanisme réactionnel de la XDH (A) et de la XO (B) (Hille, 1996 modifiée).

#### 1.4. La conversion de la XDH en XO

La XOR existe sous deux formes: type D et type O. La forme dominante de la XOR qui se trouve *in-vivo* est le type D (Della Corte et al., 1969; Stirpe and Della Corte, 1969; Waud and Rajagopalan, 1976a). Chacune des deux formes préfère un accepteur d'électrons différent de celui de l'autre forme. Le type D préfère la réduction du  $\text{NAD}^+$  et le type O préfère la réduction de  $\text{O}_2$  (Harrison, 2002).

La conversion de la XDH en XO se fait via différentes voies; la première est dû au traitement de la XDH par les protéases, comme la trypsine, la chymotrypsine ou la pancréatine, elle est donc irréversiblement transformée en XO (Della Corte et al., 1969; Stirpe and Della Corte, 1969; Nishino and Tamura, 1991). Ces enzymes provoquent une modification dans le groupe d'acides aminés (Phe 549, Arg 335, Trp 336, Arg 427) et donc l'interaction entre Phe 549 et Trp 336 est rompue, ce qui change la structure du site actif FAD et celui-ci devient inaccessible au  $\text{NAD}^+$ . Ce changement structurel forme un canal facilitant le rapprochement de  $\text{O}_2$  au site FAD (Kuwabara et al., 2003).

La deuxième conversion de la XDH est réversible, elle est dû à l'oxydation des groupements thiols de la Cys 535 et la Cys 992 (Nishino and Nishino, 1997) dans des conditions d'incubation à 37 °C (Della Corte and Stirpe, 1972), exposition aux agents sulphydryls (Waud and Rajagopalan, 1976b) et l'exposition aux conditions anaérobiques (Della Corte et al., 1969).

Quelques composés, tels que l'oxygène, le 4,4-dithiodipyridine et le p-hydroxymercuribenzoate, provoquent l'oxydation de 14 groupements sulphydryls libres (SH) dans le type D de l'enzyme XOR en formant des ponts disulfures (Waud and Rajagopalan, 1976a). Ce changement de conformation du site catalytique de l'enzyme type D le rend de type O. Ensuite les ponts disulfures sont réduits par des composés réducteurs des groupements sulphydryls tel que le dithiothreitol (DTT) (Parks et al., 1988).

### **1.5. Les formes inactives de la XOR**

La XOR a deux formes inactives, l'une est démolybdo-XOR et l'autre est désulfo-XOR. Ces formes représentent environ 60 % de l'enzyme du lait bovin (Bray, 1975) et plus de 97 % du lait humain (Baghiani et al., 2002; 2003).

Ces deux formes ne peuvent pas oxyder les composés qui réagissent au niveau du centre Mo, comme la xanthine et l'hypoxanthine, cependant elles ont l'activité à réagir avec le NADH au niveau du centre FAD (Bray, 1975). La forme démolybdo est dépourvue d'atome Mo ou le cofacteur ptéridine (Massey and Edmondson, 1970). Dans la forme désulfo, l'atome de soufre au niveau du site Mo est remplacé par un atome d'oxygène. Cette enzyme désulfo peut récupérer son activité après une résulfuration en l'incubant avec des composés sulfures comme le (Na<sub>2</sub>S) (Baghiani et al., 2003).

### **1.6. Rôles physiologiques de la XOR**

La XOR joue un rôle principal dans le catabolisme des purines en acide urique (Bray, 1975), mais elle a aussi d'autres fonctions plus larges dans la physiologie de l'organisme tels que son rôle dans l'absorption du Fer au niveau de l'intestin et le foie (Topham et al., 1982).

Hancock et ses collaborateurs (2002) ont pu montrer une activité antimicrobienne de la XOR du lait humain et bovin qui inhibe la croissance bactérienne in vitro d'une manière nitrite-dépendante suggérant l'implication du NO<sup>o</sup> et du ONOO<sup>-</sup>. In vivo, les nourrissons ayant reçu du lait maternel riche en XOR ont moins de risques de développer des gastroentérites que ceux ayant reçu la formule infantile (Stevens et al., 2000). En 1995, Van den Munckhof et ses collaborateurs ont pu détecter des bactéries partiellement détruites entourées par la XOR dans les cellules épithéliales de l'intestin du rat. Ils ont supposé que ces bactéries ont été attaquées par le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène générés par la XOR.

La XO a une action antivirale en catalysant la conversion du retinaldéhyde en acide rétinoïque. Les dérivés de cet acide peuvent inhiber la croissance virale empêchant ainsi la propagation de l'infection (Taibi et al., 2001).

## **1.7. Rôles pathologiques de la XOR**

### **1.7.1. Rôle de la XOR dans l'inflammation**

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents interférons, tels que TNF- $\alpha$  et C5a, qui provoquent la conversion de la XDH en XO (Friedl et al., 1989). Alors, la production de ROS est élevée. Ce qui provoque l'activation de NF- $\kappa$ B régulateur de la production des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 et IL-6) (Schreck and Baeuerle, 1991; Burdon and Gill, 1993).

Les ROS produites par la XOR peuvent également réagir avec les composés de la membrane cellulaire, tel l'acide arachidonique, pour produire des lipides chimioattractants des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (Perez et al., 1990).

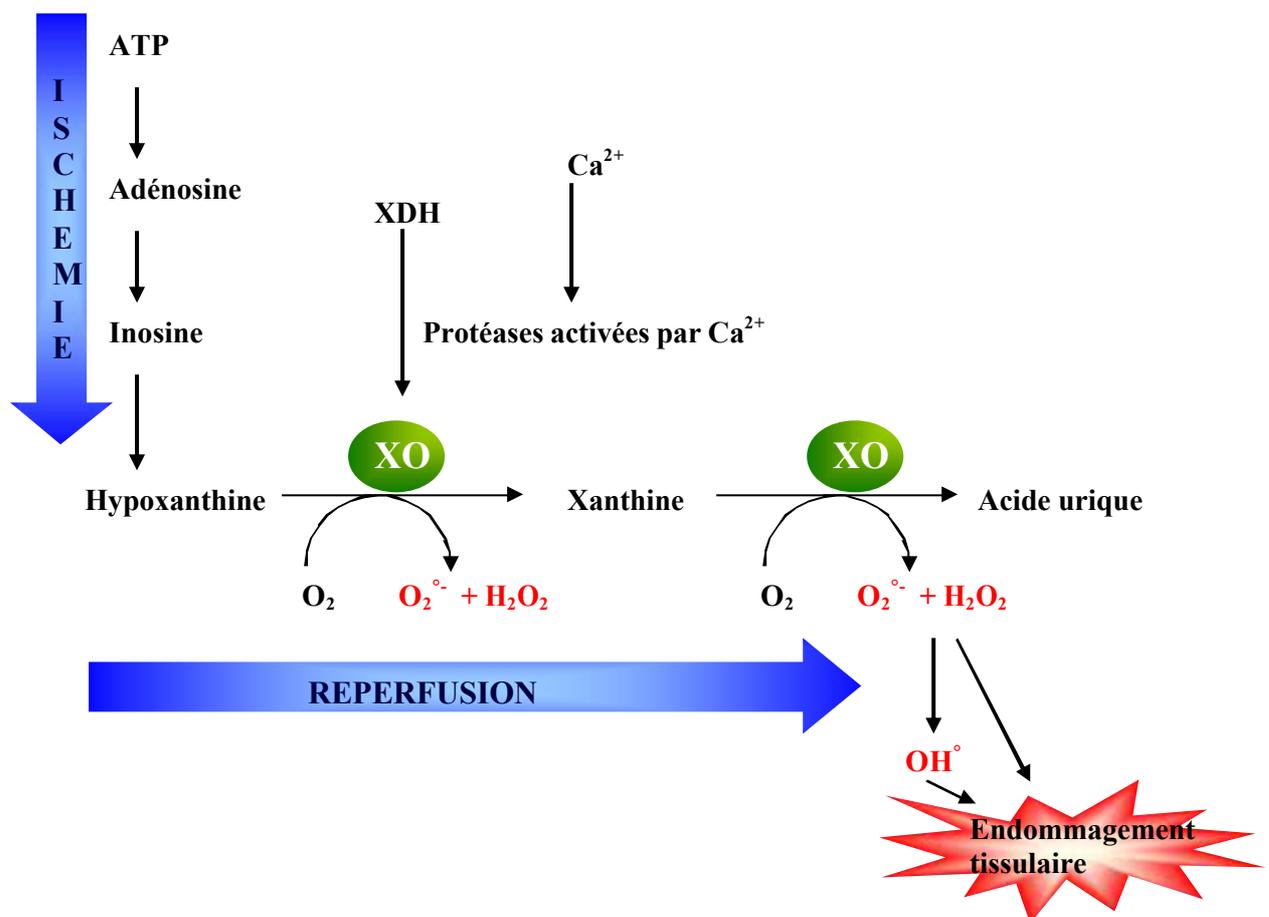
L'inflammation est une réaction de défense contre les invasions externes, mais elle peut s'amplifier d'une manière incontrôlable conduisant à l'apparition de différents désordres et maladies inflammatoires. La XOR, impliquée dans le déroulement de la réaction physiologique de l'inflammation, participe également dans son amplification par sa capacité de produire les ROS. Dans l'arthrite rhumatoïde, la XOR amplifie l'inflammation synoviale conduisant à l'érosion de l'os et la propagation de la maladie (Blake et al., 1997).

### **1.7.2. Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion**

Granger et ses collaborateurs (1981), ont lancé leur hypothèse qui dit que les ROS produits par la XOR provoquent les lésions ischémiques dû au catabolisme de l'ATP pendant l'hypoxie, ce qui conduit à l'augmentation de concentration de l'hypoxanthine (**Figure 6**).

Lorsque la concentration intracellulaire de l'ATP est diminuée, il se produit un déséquilibre dans le gradient ionique de part et d'autre de la membrane plasmique conduisant ainsi à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$  provoque l'activation des protéases  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes (Granger et al, 1981; Mc Cord, 1985) qui catalysent la conversion irréversible de la XDH, prédominante *in vivo*, en XO (**Figure 6**) (Della Corte and Stirpe, 1968; Granger et al, 1981; Kooij et al., 1992).

Dans la réperfusion, la XO oxyde l'hypoxanthine accumulé en xanthine, et la xanthine en acide urique, et réduit l'O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 6**) (Hille and Massey, 1981a). L'interaction entre ces deux espèces par la réaction de Haber–Weiss produit le radical hydroxyle, provoquant ainsi des lésions tissulaires (Huang et al., 2001).



**Figure 6:** Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion (Granger et al., 1981).

### **1.7.3. Rôle de la XOR dans d'autres maladies**

Les ROS produits par la XOR peuvent provoquer plusieurs maladies tels que l'arthrite, l'asthme, l'athérosclérose, le Parkinson et l'Alzheimer (Squadrito, 2000).

La XOR produit l'acide urique, l'augmentation de la concentration de ce produit provoque la goutte. C'est une maladie qui se traduit par une hyperuricémie, et aboutissant à des précipitations uratiques dans différents tissus, en particulier dans les articulations (Nuki, 2006). L'hyperuricémie est dû à une insuffisance rénale, donc la quantité d'acide urique éliminé diminue et il s'accumule dans le sang. Les cristaux d'acide urique se déposent au niveau des articulations, ce qui provoque une destruction des os avec des douleurs à chaque mouvement (Enomoto et al., 2002).

### **1.8. Les inhibiteurs de la XOR**

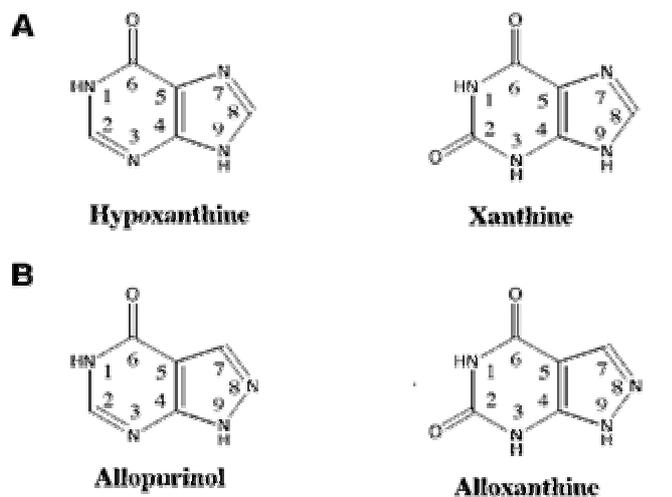
Les inhibiteurs de la XOR peuvent être des analogues de substrats puriniques ou des molécules n'ayant aucune relation structurale avec les substrats biologiques de l'enzyme. Les deux types d'inhibiteurs réagissent au niveau ou pré du site Mo (Hille and Massey, 1981a).

#### **1.8.1. Les inhibiteurs analogues de substrats**

Ce type d'inhibiteurs analogues de substrats renferme le groupe des pyrazol[3,4-d]pyrimidine, et en particulier l'allopurinol (1,5-dihydro-4-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) et l'oxypurinol (4,6-dihydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine) (**Figure 7**) (Hille and Massey, 1981a; Pacher et al., 2006).

L'allopurinol est donné comme traitement de la goutte par administration avec l'alimentation et les médicaments (Rott and Agudelo, 2003; Terkeltaub, 2003; Bieber and Terkeltaub, 2004; Schlesinger, 2004; Pea, 2005; Wortmann, 2005). L'allopurinol est oxydé rapidement par la XO *in-vivo* pour former son métabolite actif, oxypurinol (alloxanthine), qui inhibe également la XO de manière non-compétitive. À concentrations élevées de l'allopurinol, il se comporte comme un inhibiteur non-compétitif, mais à concentrations moins élevées il inhibe l'enzyme compétitivement (Pacher et al., 2006).

Les deux inhibiteurs (allopurinol et oxypurinol) peuvent aussi réagir comme des scavengers de radicaux libres produits par la XOR (Augustin et al, 1994). Pour cela, on ne peut pas confirmer que l'allopurinol et l'oxypurinol ont un effet inhibiteur ou un effet scavenger (Moorhouse et al., 1987 ).



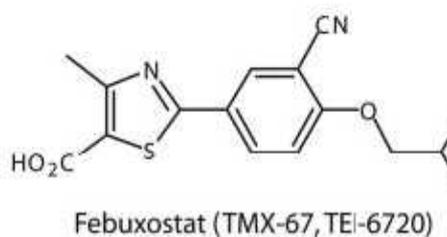
**Figure 7: A:** Structures des substrats puriniques de la XOR. **B:** Structures des inhibiteurs de la XOR analogues de substrats (Truglio et al., 2002).

### 1.8.2. Autres inhibiteurs de la XOR

Il existe d'autres inhibiteurs de la XOR tels que: le Cyanide, l'Arsenite, le Méthanol, et le formaldéhyde. Le cyanure inhibe la XOR en libérant le soufre du site Mo, donnant naissance à la forme désulfo inactive de la XOR (Hille and Massey, 1981b). Alors que l'arsenite interagit avec le molybdène de l'enzyme XOR et bloque le transfert d'électrons du centre molybdène vers les centres  $Fe_2 / S_2$  et FAD (Stewart et al., 1984).

La XOR peut être inhibée par son produit, l'acide urique, de manière non compétitive (Tan et al., 1993), et la concentration élevée de ROS diminue l'activité de la XOR (Terada et al., 1991).

Le febuxostat; acide 2-[3-cyano-4-(2-methylpropoxy)phenyl]-4methylthiazole-5-carboxylique, est un inhibiteur synthétique non purinique (**Figure 8**) spécifique de la XOR. Il inhibe sélectivement les deux formes de la XOR mais pas les autres enzymes catalyseurs du métabolisme des purines (Yasuhiro et al., 2005).



**Figure 8:** Structure de l'inhibiteur synthétique non purinique febuxostat (Pacher et al., 2006).

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels de la XOR isolés des plantes (Lin et al., 2002). Les études ont montré que les flavonoïdes inhibent la XOR de manière compétitive (Lin et al., 2002; Van Hoorn et al., 2002; Da Silva et al., 2004). Des études menées sur l'inhibition de la XO par les flavonoides ont montrées théoriquement l'existence de similarités structurales entre le cycle A des flavonoides et le noyau purinique de l'hypoxanthine et la xanthine (Rastelli et al., 1997).

## 2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre dans la balance pro-oxydants / antioxydants, que se soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux libres (Favier, 2003).

### 2.1. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires (Morris, et al., 1995; Ahmad, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (Reactive Nitrogen Species : RNS) (Ahmad, 1995). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte), et ils ont tendance: soit à capter un autre électron ; c'est alors un radical oxydant (Exemple:  $\text{OH}^\bullet + \text{e}^- \Rightarrow \text{OH}^-$ ), soit à le céder ; c'est alors un radical réducteur (Ahmad, 1995).

Les espèces réactives de l'oxygène regroupent les radicaux libres de l'oxygènes et certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante et qui peuvent être des précurseurs de radicaux tels que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Morris, et al., 1995; Favier, 2003).

### 2.2. Sources des radicaux libres

Les principales sources des radicaux libres sont soit endogènes ou exogènes, elles sont résumées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1** : Les principales sources des ROS

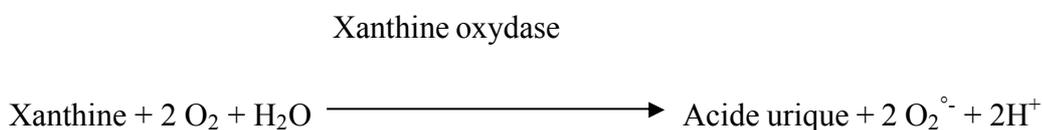
Sources des ROS	
Endogènes	Exogènes
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mitochondries</li><li>• Phagocytoses</li><li>• Xanthine oxydase</li><li>• Métaux de transition</li><li>• Peroxysomes</li><li>• Exercice physique</li><li>• Inflammation</li><li>• Choc</li><li>• Ischiémie/reperfusion</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cigarette</li><li>• Radiation ionisantes</li><li>• Pollutions diverses</li><li>• Rayonnement UV</li><li>• Produits chimiques &amp; médicaments</li><li>• Ozone</li></ul>

### 2.2.1. Sources endogènes

Le peroxysome est une source importante dans la production cellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> car cet organite contient de nombreuses enzymes générant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein (Boveris et al., 1972; Moure et al., 2001; Belviranlı and Gökbel, 2006).

Le réticulum endoplasmique lisse contient les enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Turrens et al., 1982; Freeman et al., 1983). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi les ROS (Morel et al., 1999).

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme soluble qui génère les ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harrison, 2002). Dans la deuxième réaction l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l'anion superoxyde (Harrison, 2002; Da Silva et al., 2004; Pacher et al., 2006):



Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique (Ahmad, 1995; Harrison, 2002).

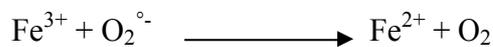
Le NADPH oxydase (NADPHO) joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babior, 1999). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'O<sub>2</sub><sup>°-</sup> (Ahmad, 1995; Krause, 2004):



Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leur forme réduite, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires in vitro: ils transforment l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$ . Les destructions cellulaires (hémolyse, cytolysse hépatique) entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydant. La formation du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ) à partir du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en présence de fer ferreux est dite réaction de Fenton. Il est le radical libre le plus réactif (Ahmad, 1995):



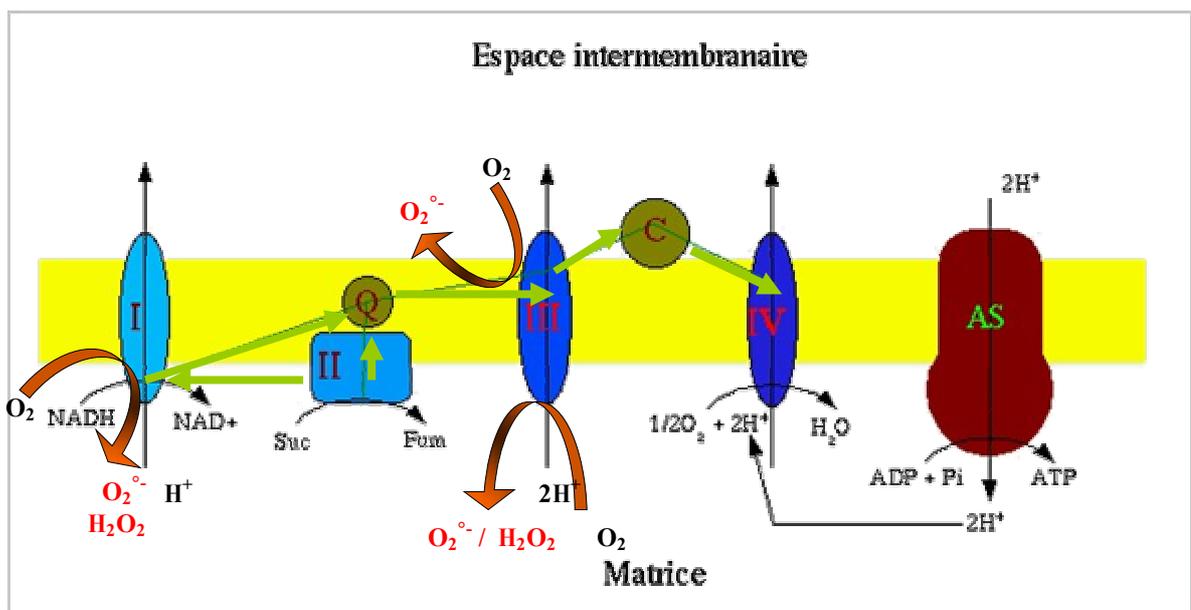
L'anion superoxyde permet aussi de reformer le fer ferreux à partir du fer ferrique :



Globalement, cette suite de réactions est appelée cycle d'HABER-WEISS :



La mitochondrie est la principale source de ROS par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90 % des ROS cellulaires. Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (Balaban et al., 2005) (**Figure 9**).

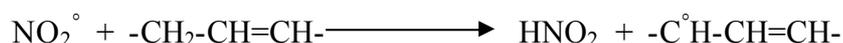


**Figure 9 :** Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Cadenas and Davies, 2000).

### 2.2.2. Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres ( $O_2^\circ$ ,  $OH^\circ$ ,  $\frac{1}{2} O_2$ ) et de molécules génératrices de radicaux libres ( $H_2O_2$ ) (Ward et al., 1987).

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres car ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Bartsch and Nair, 2000; Bonnefont-Rousselot et al., 2001):



Ces toxiques peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux  $OH^\circ$ . La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires (Pinkus et al., 1996).

D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons, tels que le tétrachlorure de carbone ( $CCl_4$ ) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux  $CCl_3^\circ$  et mis en évidence dans des hépatocytes de rats (Kanter et al., 2003). La réduction de  $CCl_4$  en  $CCl_3^\circ$  s'effectue par deux voies: soit sous l'action du cytochrome P450 hépatique ;



soit en présence de fer ferreux ;  $CCl_4 + Fe^{2+} \longrightarrow Cl^- + CCl_3^\circ + Fe^{3+}$

En 1988, Knecht et Mason ont montré que le  $CCl_3^\circ$  était capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés, et donc de provoquer une augmentation importante des hydroperoxydes lipidiques.

## **2.3. Principales cibles des ROS**

### **2.3.1. Les lipides**

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons (Favier, 2003). Cette réaction est appelée peroxydation lipidique. Le radical formé ( $R^\circ$ ) subit un réarrangement interne dû au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire (Fulbert and Clas, 1992).

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Favier, 2003). La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le MDA (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène (Ahmad, 1995).

### **2.3.2. Les protéines**

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les ROS sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical  $OH^\circ$  s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Favier, 2003). Sur les

acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydés et inactivés. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Ahmad, 1995; Favier, 2003).

### **2.3.3. L'ADN**

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par  $\text{OH}^\circ$  peuvent être générées. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Favier, 2003). Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dans la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine (Morris, et al., 1995; Ahmad, 1995; Favier, 2003).

## 2.4. Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est la principale cause de plusieurs maladies (**Tableau 2**), la plupart de ces maladies apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Favier, 2003).

**Tableau 2** : Quelques maladies liées au stress oxydant

<b>Maladies</b>	<b>Références</b>
Vieillessement	(Harman, 1998; Mecocci et al., 2000 ; Ferrari, 2001).
Maladies cardiovasculaires	(Mitchinson and Ball, 1987; Yokoda et al., 1988; Montagnier et al., 1998).
Maladies autoimmunes	(Halliwell and Gutteridge, 1999).
Cancer	(Marnett, 1987; Cerutti, 1994).
Diabète	(Grankvist et al., 1981 ; Brownlee et al., 1984 ; Hunt et al., 1990 ; Baynes and Thorpe, 1999 ; Faure and Bonnefont-Rousselot, 2005).
Inflammations	(Hogg, 1998; Lefkowitz et al., 1999; Yoshikawa and Naito, 2000; Valentao et al., 2002; Atawodi, 2005; Govindarajan et al., 2004).
Maladie de Parkinson	(Halliwell and Gutteridge, 1999; Atawodi, 2005; Govindarajan et al., 2004).
Maladie d'Alzheimer	(Montagnier et al., 1998)
Arthrite	(Krane et al., 1990; Seiss, 1991; Aruoma, 1993; Halliwell and Gutteridge, 1999).

### 3. Les antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont non-enzymatiques et enzymatiques (Mates et al., 1999; Comhair and Erzurum, 2002; Droge, 2002).

#### 3.1. Antioxydants enzymatiques

##### 3.1.1. La Superoxyde dismutase (SOD)

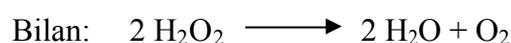
La superoxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 10**) selon la réaction suivante :



La SOD existe sous trois formes qui se diffèrent par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001 ; Strutz et al., 2001).

##### 3.1.2. La Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Figure 10**). La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène (Ahmad, 1995) :

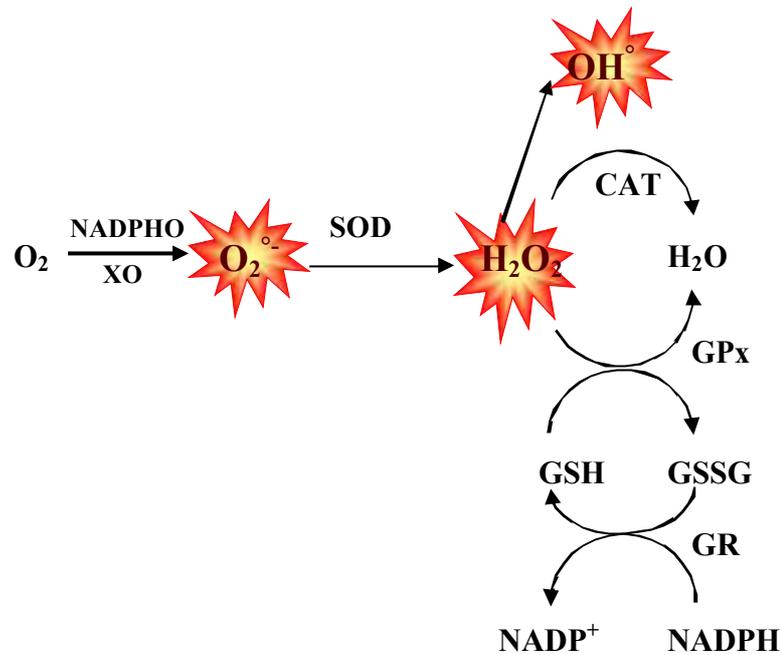


La catalase est composée de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec  $\text{Fe}^{3+}$  lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de  $\text{NADPH}, \text{H}^+$  qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène (Bonfont-Rousselot et al., 2003).

### 3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Lors de cette réaction (Figure 10) deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (Ahmad, 1995).

Le glutathion disulfure (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Ahmad, 1995; Mates et al., 1999).



**Figure 10:** Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.

## **3.2. Antioxydants non enzymatiques**

### **3.2.1. La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)**

La vitamine E se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde ( $\text{LOO}^\circ$ ). Elle devient à son tour un radical moins actif que le  $\text{LOO}^\circ$  et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Packer et al., 1997; Evans, 2000).

### **3.2.2. La vitamine C (acide ascorbique)**

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut capter directement l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  et l' $\text{OH}^\circ$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Packer et al., 1997; Evans, 2000).

### **3.2.3. Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Krinsky, 1993).

### **3.2.4. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (Galati and O'Brien, 2004; Peluso, 2006). Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ROS comme la xanthine oxydase (Halliwell, 1994).

## **4. Les polyphénols**

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Tapiero et al., 2002). Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante (Lugasi et al., 2003). Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta et al. 2005).

### **4.1. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes médicinales (Psotová et al., 2003). Comme exemple; acide chlorogénique, acide caféique, acide protocatéchique, acide vanillique, acide férulique, acide sinapique et acide gallique (Hale, 2003). Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets antioxydants et anti-inflammatoires. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (Psotová et al., 2003). L'acide férulique et l'acide caféique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, l'acide gallique inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale, 2003).

### **4.2. Les tannins**

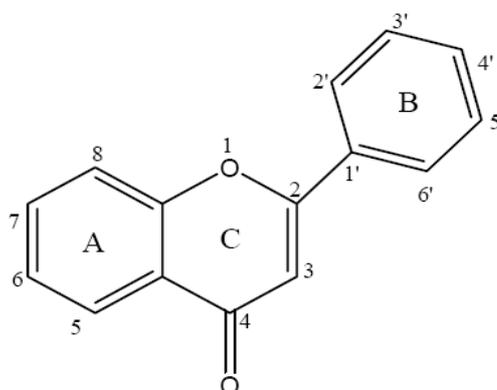
Les tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales, existent dans presque chaque partie de la plante : feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (Cowan, 1999). Ils sont divisés en deux groupes : 1) tannins hydrolysables qui sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique (acide gallique, dans le cas des tanins galliques, ou acide hexahydroxydiphénique (HHDP), dans le cas des tannins ellagiques). 2) tannins condensés qui sont formés par la condensation des unités flavan-3-ols et flavan-3-4-diols (Bruneton, 1993).

### 4.3. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bruneton, 1999). Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. (Nijveldt et al., 2001; Erlund, 2004; Peluso, 2006). La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont des 3-O-glycosides, mais peuvent également exister sous des formes aglycones (Medić - Šarić et al. 2004). La prise moyenne des flavonoïdes par l'homme s'étend de 25 mg/jour à 1 g/jour (Wang and Mazza, 2002).

#### 4.3.1. Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes

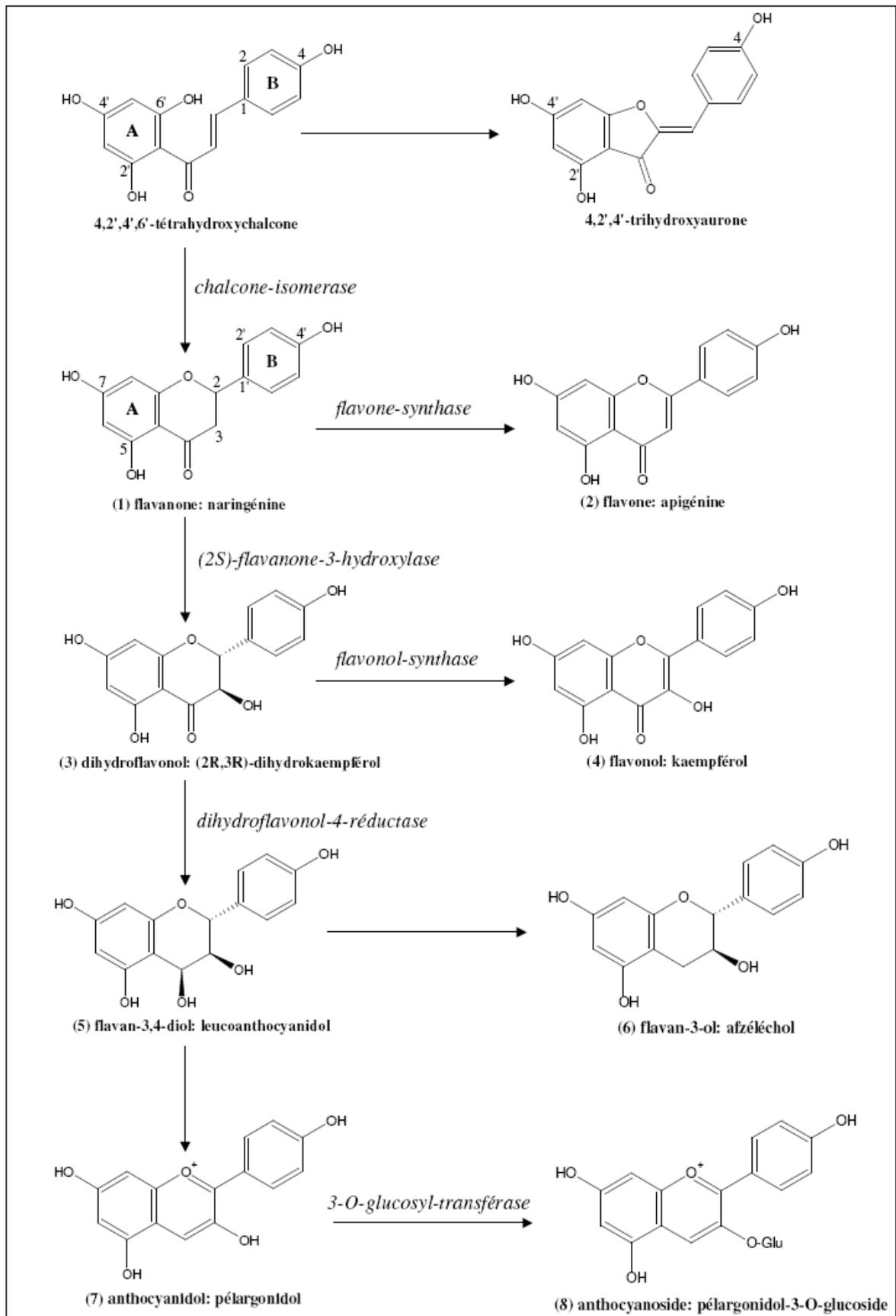
Plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés (Harborne and Williams, 2000). Ils sont des composés dont la structure de base est constituée de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné (cycle C) (**Figure 11**). C'est le noyau Flavone de base (Erlund, 2004).



**Figure 11:** Structure de base des flavonoïdes (Erlund, 2004).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en 8 classes différentes (Flavones, Flavonols, Flavanones, Dihydroflavonols, Flavanols, Anthocyanidols, Chalcones et Aurones) (Erlund, 2004; Peluso, 2006).

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone (**Figure 12**) (Sakihama et al., 2002). Cette dernière est métabolisée sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase en flavanone. Ensuite la flavanone est métabolisée en flavone par la flavone synthase, ou en dihydroflavonol par la (2S)-flavanone-3-hydroxylase. Le dihydroflavonol est métabolisé soit en flavonol en présence de la flavonol synthase, ou en flavan-3,4-diol par la dihydroflavonol-4-réductase. Le flavane-3,4-diols donne ensuite la flavane-3-ol et l'anthocyanidol. Ce dernier agit avec la 3-O-glycosyltransférase pour donner l'anthocyanoside (O'Connell and Fox, 2001).



**Figure 12:** La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

### **4.3.2. Classification des flavonoïdes**

#### **A. Flavones et Flavonols**

Les Flavones et Flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison entre C2 et C3, et l'existence d'hydroxyle en C3 dans les flavonols (**Figure 12**) (Erlund, 2004). Le model de flavonoïde qui représente les flavones est l'apigénine, et la quercétine pour les flavonols (Peluso, 2006; Lotito and Frei, 2006).

#### **B. Flavanones et Dihydroflavonols**

Les Flavanones et Dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 (**Figure 12**). La seule différence entre ces deux classes est la présence d'hydroxyle en C3 dans les dihydroflavonols. Le modèle de flavonoïde qui représente les flavanones est la naringénine, et le dihydrokaempférol représente les dihydroflavonols (Heim et al., 2002; Peluso, 2006).

#### **C. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols**

Les flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et les anthocyanidols sont hydrolysés en position C3 et dépourvus d'oxygène en C4 (**Figure 12**). Cette position peut être libre en cas des flavan-3-ols et anthocyanidols, ou hydroxylées en cas des flavan-3,4-diols. Les anthocyanidols sont caractérisés par la présence des doubles liaisons entre C1-C2 et C3-C4 (O'Connell and Fox, 2001; Heim et al., 2002; Peluso, 2006; Lotito and Frei, 2006).

#### **D. Chalcones et Aurones**

Les chalcones sont différentes des autres classes de flavonoïdes. De part elles sont constituées de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par une chaîne tri-carbonée, donc l'ouverture du noyau puranique central (C) (**Figure 12**). Les aurones sont caractérisées par

une structure de 2-benzylidène coumaranone (Sakihama et al., 2002; Peluso, 2006; Morris and Zhang, 2006).

## **E. Les flavonoïdes glycosidiques**

La plupart des flavonoïdes sont sous forme glycosidique. Différents monosaccharides ou combinaisons de di- ou trisaccharides peuvent être liés aux différents groupements hydroxyles des flavonoïdes aglycones (Williams and Harborne, 1994). Ces sucres peuvent être D-glucose, L-rhamnose ou galactose, et ils sont liés soit au groupement hydroxyle de la position C3, par exemple le pélargonidol-3-O-glucoside (**Figure 12**), ou de la position C7 (Kemertelidze et al., 2000; Spencer et al., 2004; Erlund, 2004).

### **4.3.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes**

#### **A. Inhibition enzymatique**

Les flavonoïdes peuvent arrêter la production des ROS par l'inhibition d'enzymes productrices de ces ROS (Pietta, 2000) comme la xanthine oxydase (Middleton et al., 2000; Potapovich and Kostyuk, 2003).

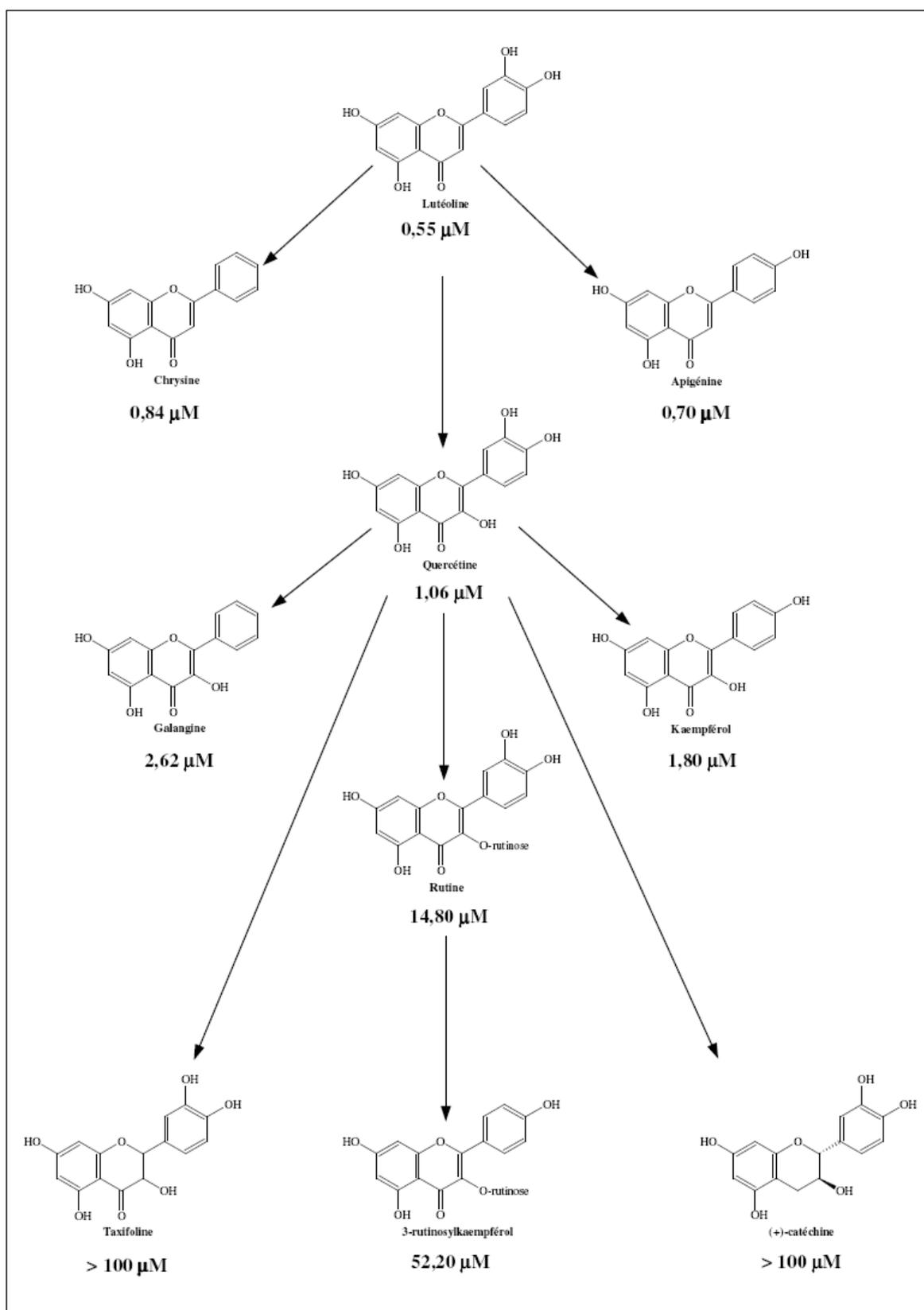
La xanthine oxydase participe dans la production de radicaux libres (Mc Cord and Fridovich, 1968). Elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction s'accompagne de la génération d' $O_2^{\circ-}$  (Ahmad, 1995).

L'allopurinol, qui est un analogue de purine, a été le seul inhibiteur de la xanthine oxydase utilisé en clinique pour le traitement de l'hyperuricémie et la goutte (Ishibuchi et al., 2001). Mais les similarités structurales entre les composés puriniques et l'allopurinol entraînent une inhibition d'autres enzymes impliqués dans le métabolisme des purines (Young et al., 1974). Donc l'allopurinol a plusieurs effets toxiques tels que les troubles

gastrointestinales, réduction de la filtration glomérulaire, fièvre et insuffisance rénale (Horiuchi et al., 2000).

Les recherches sont donc dirigées vers les inhibiteurs de la XO d'origine naturelle. Hanasaki et al. (1994), ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte et l'hyperuricémie en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains.

Ces résultats ont été confirmés par Cos et ses collaborateurs (1998). Ils ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production d'acide urique (**Figure 13**). Les différents points qui ressortent de cette étude sont les suivants: 1) Seuls les flavonols et les flavones ont la capacité à inactiver la XO (**Figure 13**). Cette inhibition est due à la présence de la double liaison entre C2-C3. Les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3-4-diols n'ont donc aucune influence sur l'activité de la xanthine oxydase. 2) En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, on observe que l'absence du groupe hydroxyle en C3 augmente légèrement l'activité (**Figure 13**). 3) Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés (**Figure 13**). Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.



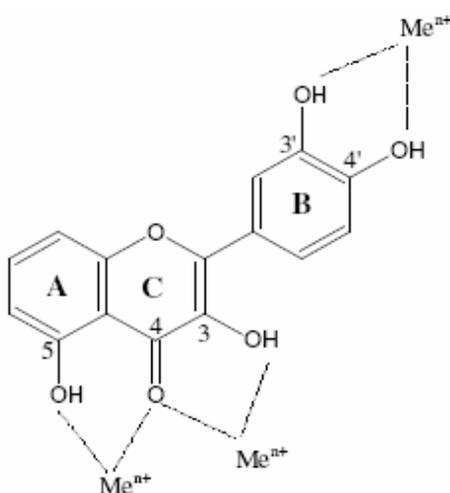
**Figure 13:** Relation structure/activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la xanthine oxydase (Les valeurs sont les IC<sub>50</sub> exprimées en µM) (Cos et al., 1998).

## B. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et du cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) peuvent être à l'origine de la production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce moins réactive  $\text{H}_2\text{O}_2$  via la réaction de Fenton (Ahmad, 1995):



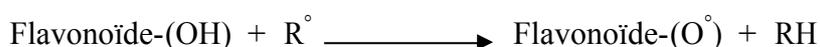
L'effet antioxydant des flavonoïdes peut être associé avec la chélation des métaux tels que  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (Hilliwell and Gutteridge, 1989 ; Van Acker et al., 1998 ; Heim et al., 2002). Les flavonoïdes ont la capacité de former des complexes, stables avec les ions métalliques (Afanas'ev et al., 1989) et donc l'inhibition de la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production de ROS (Ferrali et al., 1997). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont représentés dans la **Figure 14**; 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 C et A (Moridani et al., 2003).



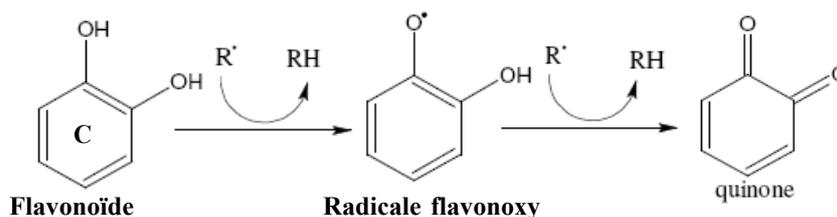
**Figure 14:** Sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $\text{Me}^{n+}$ ) (Van Acker et al., 1996).

### C. Effet scavenger sur les radicaux libres

Les flavonoïdes peuvent exprimer ces propriétés antioxydantes par différentes actions, une d'elles est l'effet scavenger des radicaux libres (Nijveldt et al., 2001). L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études. Les flavonoïdes sont oxydés par les radicaux libres comme le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Kumaran and Karunakaran, 2007), le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Choi et al., 2002; Céspedes et al., 2008), le peroxy, l'alkoxyl et l'hydroxyle (Erben-Russ et al., 1987; Jovanovic et al., 1994) par transfert d'hydrogène. Le radical réduit devient inactif (Middleton, 1996).



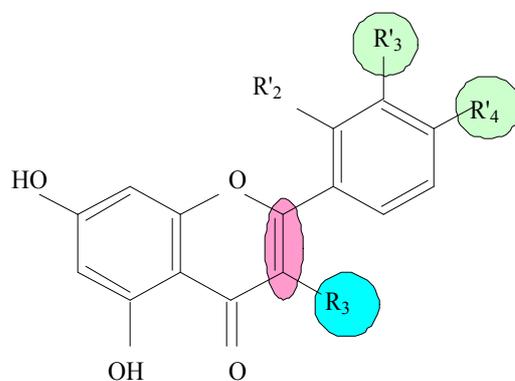
Où  $\text{R}^\bullet$  représente le radical libre,  $\text{Flavonoïde-(O}^\bullet)$  est le radical flavonoxy qui peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Figure 15**).



**Figure 15:** Effet scavenger sur les radicaux libres ( $\text{R}^\bullet$ ) par les flavonoïdes (Jovanovic et al., 1994).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Jovanovic et al., 1994; Van Acker et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996; Cotelle et al., 1996; Cao et al., 1997; Bors et al., 1997; Cos et al., 1998; Dugas et al., 2000; Pietta, 2000). En analysant les résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois 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 double liaison C2-C3 adjacente à la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Rice-Evans et al., 1996).

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996) (**Figure 16**).



**Figure 16:** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996).

#### D. Autres activités biologiques des flavonoïdes

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-bactériennes et anti-virales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-ulcéreuses et anti-cancéreuses. Le **Tableau 3** montre quelques références de ces activités.

**Tableau 3:** Quelques activités biologiques des flavonoïdes

<b>Activités biologiques des flavonoïdes</b>	<b>Références</b>
Propriétés anti-virales et anti-bactériennes	(Kaul et al., 1985; Critchfield et al., 1996; Afolayan and Meyer, 1997; Cowan, 1999; Cottiglia et al., 2001; Mbaveng et al., 2008)
Propriétés anti-inflammatoires	(Gabor, 1986; Ferrandiz and Alcaraz, 1991; Tordera et al., 1994; Middleton et al., 2000)
Effets anti-allergiques	(Middleton and Drzewiecki, 1984; Gabor, 1986; Di Carlo et al., 1999)
Effets anti-ulcéreux	(Izzo, 1996; Di Carlo et al., 1999)
Effets anticancéreux	(Middleton et al., 2000; Bracke et al., 1991; Larocca et al., 1994; Makimura et al., 1993)

## 5. La plante médicinale *Ajuga iva* L.

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique (Nostro et al., 2000). Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie (Bahorun, 1997). Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes peuvent guérir les malades avec moins d'effets secondaires (Fouché et al., 2000).

### 5.1. Description de la plante

*Ajuga iva* (Chendgoura) est une petite plante vivace de goût amer de 5-10 cm, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes de 14-25 mm de longueur, linéaires, denses et couvertes de duvets (**Figure 17**). Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur, la lèvre supérieure de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est relativement plus large décoré dans sa base par un axe central jaunâtre avec des spots de la même couleur de la fleur, généralement en violet. A l'intérieur de la fleur il y a quatre étamines liées à quatre carpelles noirs. Les graines sont marrons et ont la taille des graines de *Nigella sativa* (Halimi, 2004).

Cette plante aromatique se développe dans le sol profond des terres friches à 2700 m de hauteur, dans la période étendue du printemps jusqu'à la fin de l'été. La période de floraison est entre Mai et Juin (Batanouny et al., 1999; Halimi, 2004). Elle est largement distribuée dans la région méditerranéenne: le sud de l'Europe et le nord de l'Afrique, en particulier en Algérie, Maroc, Tunisie, et en Egypte (Halimi, 2004).

## 5.2. Nomenclature de la plante

Règne: Plantae

Division: Spermatophyta (Angiospermae)

Classe: Dicotyledones

Ordre: Tubiflorae

Famille: Lamiaceae / Labiatae

Genre: *Ajuga*

Espèce: *iva*

Auteur: (L.) Schreber

Nom commun (Arabe): Chendgoura, (Berber): Taftelba, (Français): Ivette, Petit if, Bugle, (Anglais): Herb ivy, Musky bugle

La dérivation du nom: *Ajuga*, du latin "*Jugum*": joug. Avec le suffixe "a": sans joug, du fait que la corolle est dépourvue de lèvre supérieure. *iva*, est un ancien nom féminin latin qui est utilisé pour la première fois pour cette plante (Tutin et al. 1972; Ghedira et al., 1991; Halimi, 2004).

## 5.3. Composition chimique de la plante

La plupart des plantes contiennent les composés polyphénoliques, qui sont les meilleurs antioxydants (Rice-Evans et al., 1997). Les flavonoïdes et les tannins se trouvent en grande quantité dans l'*Ajuga iva* (El Hilaly et al., 2004). Elle contient aussi les anthocyanes, les acides phénoliques et d'autres substances en particulier l'ajugarine (Halimi, 2004).

Les études ont montrés que l'ivette contient les trois majeurs ecdystéroïdes (makisterone A, 20-hydroxyecdysone et cyasterone), en plus du 24,28-dehydromakisterone A et les deux nouveau phytoecdystéroïdes (22-oxocyasterone et 24,25-dehydroprecyasterone). Elle contient aussi le 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, le polypodine B et le 14,15-dihydroajugapitine (Wessner et al., 1992 ; Bondi et al., 2000). Ben Jannet et al. (1999) ont isolés les ivaïdes A, B et C d'*Ajuga iva*. Les cicatrisants (externes), les diterpénoides (clérodane), les iridoïdes et saponosides acides sont aussi des composés chimiques que les chercheurs les trouvent dans l'*Ajuga iva*, elle est très riche en fer (Ben Jannet et al., 2000).

#### 5.4. Utilisation traditionnelle de la plante

En médecine traditionnelle, *Ajuga iva* (L.) Schreber (Labiatae) est utilisée entière sans racines. En Algérie, elle est employée, après macération aqueuse de plusieurs jours ou en poudre, pour traiter le diabète et l'hypertension. Elle est aussi consommée en poudre sec ou avec du miel pour surmonter son goût amer, pour traiter les troubles gastro-intestinales et contre l'ulcère de l'estomac. L'infusion de 20 à 30g de Chendgoura dans un litre d'eau; 2 ou 3 tasses par jour est indiquée contre la fièvre, la diarrhée et les gaz. L'ivette est efficace contre les maux de tête et les maux de dents (mâcher une feuille fraîche).

En usage externe, elle est souvent employée en applications locales contre les rhumatismes, et comme antiseptique et cicatrisante sur les plaies. D'autre part, la macération ou l'infusion serait utile pour débarrasser le cuir chevelu des parasites. En plus, elle a un effet antifongique et antimicrobien. Généralement, *Ajuga iva* possède toutes les propriétés de *Artemisia herba alba* et *Thymus vulgaris*.

Chenni et ses collaborateurs (2007) ont étudié l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* qui diminue les dommages issus du stress oxydatif chez les rats traités par des doses élevées de cholestérol. Dans le même axe, Bouderbala et al. (2008) ont montré que l'extrait aqueux lyophilisé d'*Ajuga iva* peut réduire le stress oxydant et diminuer la peroxydation lipidique chez des rats hypercholestérolémiques. Et comme les flavonoïdes et les iridoïdes ont été isolés de cette plante (Ghedira et al., 1991), il a été suggéré que la défense antioxydante chez les rats hypercholestérolémiques traités par *Ajuga iva* peut être dû à ces composés. Les résultats des recherches de El-Hilaly et Lyoussi (2002) et de El-Hilaly et ses collaborateurs (2006) suggèrent que *Ajuga iva* peut être considérée comme un agent anti-diabétique et hypolipidémique chez l'homme. En 2004, El-Hilaly et ses collaborateurs ont trouvé que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* a des propriétés vasodilatatrices et est donc considéré comme agent anti-hypertensif.

Les études de Pascual-Villalobos et Robledo (1998; 1999) ont montré que l'extrait aqueux de *Ajuga iva* inhibe la croissance de la larve *Tribolium castaneum* (70-100% de mortalité). Son effet insecticide est aussi étudié par Simmonds et Blaney (1992) contre *Spodoptera frugiperda* et *S. littoralis*. L'ivette a une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa* (Ben Jannet et al., 1999).

(A)



(B)



(C)



**Figure 17:** Quelques photos d' *Ajuga iva*. (A) la plante entière, (B) la fleur, (C) les feuilles et les fleurs.

# ***MATERIEL ET METHODES***

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel biologique

Le lait bovin frais a été obtenu d'une ferme des environs de Sétif. *Ajuga iva* (Chendgoura) a été récoltée de Djebel Guerioune, Aïn Mlila, Oum Elbouaghi, au mois de Mai 2006. Elle a été identifiée par Pr. Khalfellah N., Laboratoire de Biochimie génétique et Biotechnologie, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, Constantine.

### 1.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , EthyleneDiamine Tetraacetic Acid (EDTA), Dithiothreitol (DTT), NaCl, NaOH, bicine, sulfate d'ammonium, Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), gel d'héparine-agarose, xanthine, allopurinol, cytochrome c, quercétine, rutine, acide gallique,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{FeCl}_3$ , gomme arabique, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>°</sup>),  $\beta$ -carotène, acide linoléique, Butylated HydroxyToluene (BHT) et Tween 40, Bleu de Coomassie Brillant (CBB) G250, Acrylamide, Bis-acrylamide, Bleu brillant R250, glycine, proviennent tous de Sigma-Aldrich, les autres réactifs et solvants (méthanol, n-butanol, n-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, acide phosphorique et acide acétique) ont été obtenus de Prolabo.

Parmi l'appareillage utilisé: rotavapeur (BÜCHI), centrifugeuse 3-K30 (Sigma), 1601 Shimadzu spectrophotomètre et le spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Techcomp).

## 2. Méthodes

### 2.1. Purification de la xanthine oxydase

La purification de la xanthine oxydase du lait bovin (BMXO) a été réalisée selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par Baghiani et al. (2003); le lait bovin a été centrifugé à 5000 rpm pendant 20 minutes.

La crème flottante a été dissoute dans un volume double de phosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ , 0.2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de DTT. Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugée à 6000 rpm pendant 20min. Le surnageant récupéré a été filtré sur laine de verre et additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid (-20 °C) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min.

Après filtration du surnageant sur laine de verre, la XOR a été précipitée par ajout progressif de sulfate d'ammonium 20 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité (couche supérieure brunâtre) a été récupéré doucement et resuspendu dans un petit volume de tampon héparine ( $NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4$  25 mM, contenant 1 mM d'EDTA, pH 6.2), et dialysé contre ce même tampon pendant une nuit sous agitation. Afin d'éliminer les impuretés insolubles, le dialysat a été centrifugé à 18000 rpm pendant 60 min. Après filtration à travers un filtre de 45  $\mu$ m de diamètre, le produit final constitue l'extrait brut de la XOR.

L'extrait brut obtenu a été déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavée par le tampon héparine. La colonne a été ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.1 M de NaCl. La XOR a été récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl, et dialysée contre un tampon Bicine 50 mM, pH 8.3, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme a été répartie en aliquotes de 0.5 ml et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation. La colonne a été régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1 M puis avec le tampon héparine pour une nouvelle utilisation.

**Remarque:** toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C.

## **2.2. Contrôle de pureté de la XO**

La pureté de l'enzyme purifiée a été estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et par le rapport protéine / flavine PFR (Protein to Flavin Ratio), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ( $A_{280\text{nm}} / A_{450\text{nm}}$ ). Une valeur 5 ou proche de 5 est un bon signe de pureté (Bray, 1975).

### **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970); le gel de séparation (10 % d'acrylamide et 2.74 % de bis-acrylamide) a été préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N',N' Tetramethylene diamine (TEMED) (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration a été préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les échantillons (XO, environ 1 mg / ml) ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg / ml) ont été préparés dans une solution échantillon constituée d'un tampon Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V). Ensuite, ils ont été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Les standards des poids moléculaires (Sigma) utilisés sont de 29000 Da à 205000 Da.

La migration électrophorétique a été réalisée dans un tampon Tris-HCl (25 mM) contenant 0.192 M de glycine et 0.1 % de SDS (P/V) par application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel de séparation, l'ampérage a été ensuite augmenté jusqu'à 37- 45 mA. Les protéines séparées ont été colorées pendant au moins une heure dans une solution de bleu de Coomassie 0.2 % (P/V) contenant 10 % d'acide acétique (V/V), 45 % de méthanol (V/V) dans de l'eau distillée. Le gel a été ensuite décoloré par une solution d'acide acétique 5-10 % (V/V).

## **2.3. Estimation de l'activité enzymatique de la XO**

L'activité totale de la XOR a été estimée en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 295 nm, en présence de 100  $\mu\text{M}$  de xanthine comme substrat de l'enzyme et 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{NAD}^+$  comme accepteur d'électrons dissous dans un tampon Na-Bicine à pH 8.3

(Avis et al., 1956). L'activité de la forme oxydase a été mesurée par la même méthode mais en absence de  $\text{NAD}^+$ :

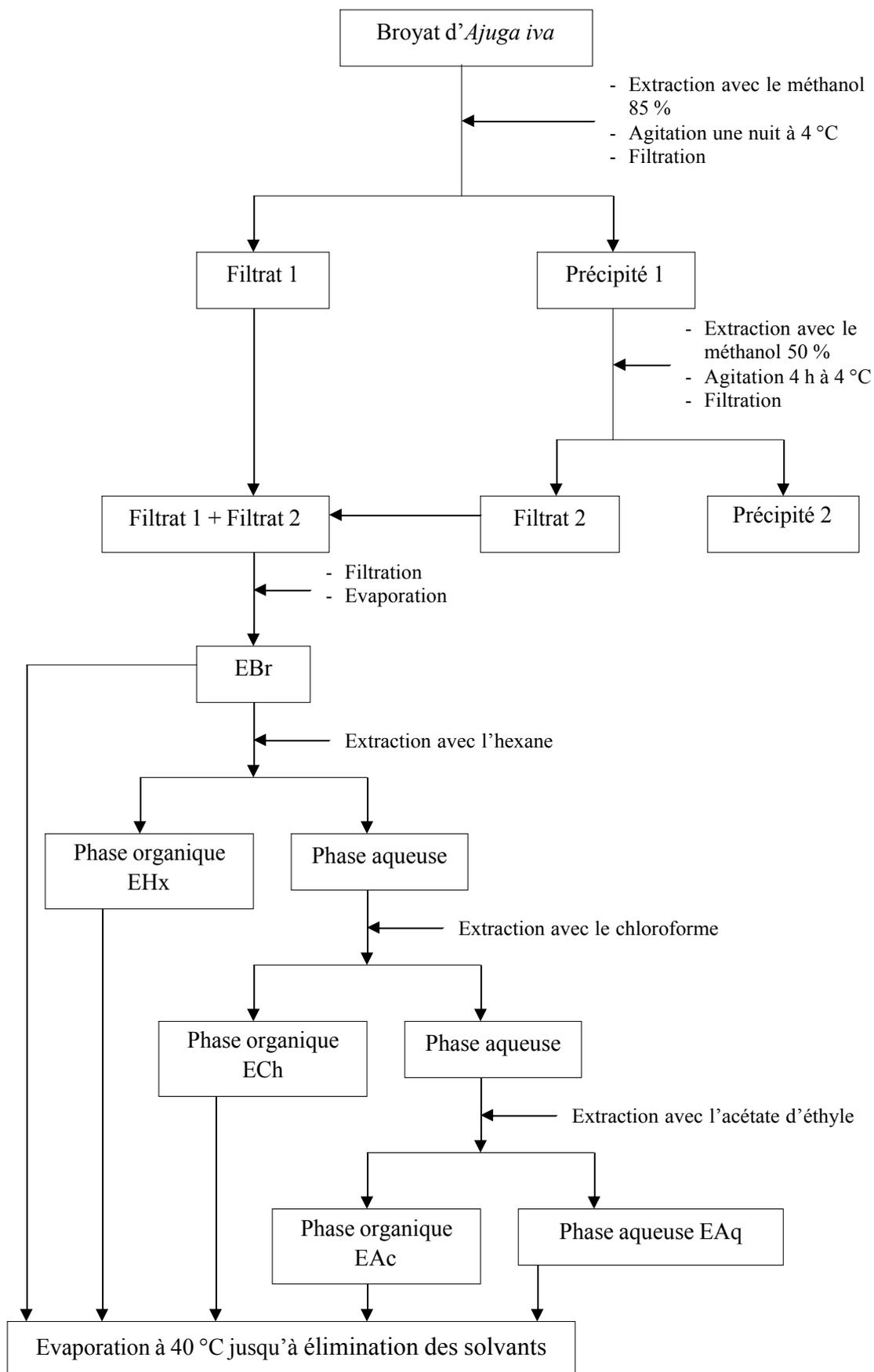
L'activité enzymatique totale = l'activité de la forme O – l'activité de la forme D

L'activité enzymatique a été exprimé en nombre de nano mole d'acide urique produit dans une minute par milligramme de l'enzyme (nmols / min / mg de protéine).

#### **2.4. Extraction des flavonoïdes d'*Ajuga iva***

La partie aérienne (tiges, fleurs et feuilles) de la plante *A. iva* a été bien nettoyée et séchée à température ambiante, ensuite broyée à l'aide d'un mortier. La méthode de Markham (1982) était suivie pour l'extraction des polyphénols en utilisant des solvants organiques à polarité croissante. Suivant cette méthode; 100 g de la poudre d'*A. iva* ont été complétés à 1 litre par le mélange méthanol/eau distillée (85 / 15 %). Le mélange a été soumis à une agitation pendant une nuit à 4°C, puis laissé reposer quelques heures. La fraction flottante a été par la suite filtrée sur laine de verre, puis sur verre fritté (N° 03) pour obtenir le filtrat 1 et conservé à 4 °C. L'extraction a été répétée une fois et le précipité a été complété à 1 litre par le méthanol 50 % pour obtenir le filtrat 2 qui a été mélangé avec le filtrat 1 (**Figure 18**). Le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre (**Figure 18**) et soumis à une évaporation rotative à 40 °C utilisant un rotavapor (BÜCHI) pour obtenir l'extrait brut, EBr. Un volume de 50 ml de l'extrait brut a été soumis à une évaporation jusqu'à l'élimination de l'eau puis conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

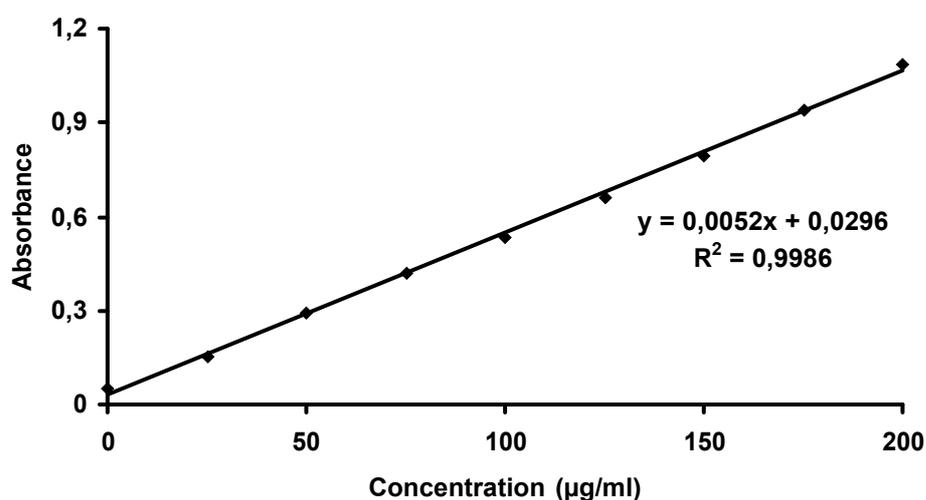
L'extrait brut a été soumis à trois extractions successives par l'hexane, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Un volume de EBr a été initialement mélangé avec le même volume d'hexane et la phase organique a été récupérée, après décantation pour donner l'extrait d'hexane (EHx) (**Figure 18**). La phase aqueuse résiduelle a été soumise à une autre extraction par le chloroforme, pour l'obtention de l'extrait chloroformique (ECh), et enfin par l'acétate d'éthyle, pour obtenir l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc). La phase aqueuse résiduelle constitue l'extrait aqueux final (EAq). Après évaporation et élimination complète des solvants, les cinq fractions ont été conservées à -20 °C jusqu'à utilisation (**Figure 18**).



**Figure 18:** Etapes de l'extraction des flavonoïdes d'*A. iva* par la méthode de Markham (1982). (EBr) extrait brut, (EHx) extrait d'hexane, (ECh) extrait du chloroforme, (EAc) extrait d'acétate d'éthyle, (EAQ) extrait aqueux.

## 2.5. Dosage des polyphénols totaux

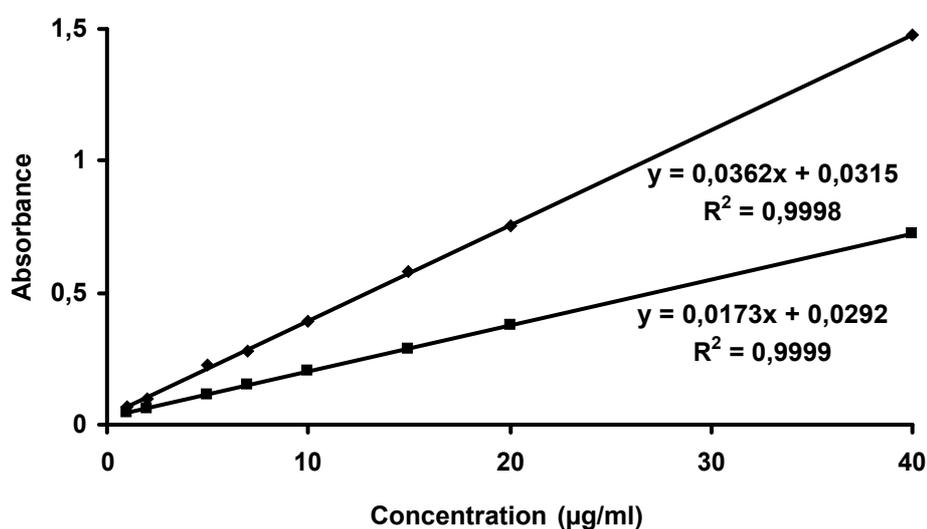
Le dosage des polyphénols totaux des extraits d'*A. iva* a été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992). Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium ( $K_3Fe[CN]_6$ ) par les polyphénols pour donner les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer ( $FeCl_3$ ) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de chaque extrait (dilués dans l'eau distillée ou dans le méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du  $K_3Fe(CN)_6$  (0.016 M) puis 1 ml du  $FeCl_3$  (0.02 M, dans le HCl 0.1 N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 19**) (0-200  $\mu g / ml$ ) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / g E).



**Figure 19:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point de la courbe représente la moyenne ( $n = 3$ ).

## 2.6. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes des extraits d'*A. iva* ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996); 1 ml de chaque échantillon (préparés dans l'eau distillée ou dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (**Figure 20**) (0-40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , chacune a été préparée dans le méthanol) et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine ou de rutine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E) et (mg ER / g E).



**Figure 20:** Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point des deux courbes représente la moyenne (n = 3).

## 2.7. Inhibition de l'activité de la xanthine oxydase par les extraits d'*Ajuga iva*

L'effet inhibiteur des extraits d'*A. iva* sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de l'acide urique produit par oxydation de 100 µM de xanthine dissous dans un tampon phosphate de sodium saturé on air (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM, pH 7.4, contenant 0.1 mM d'EDTA), en présence de plusieurs concentrations de chaque extrait d'*A. iva* (préparées dans le tampon phosphate de sodium ou dans le méthanol) (Robak and Gryglewski, 1988 ; Boumerfeg et al., 2009). L'absorbance a été lue à 295 nm, et l'activité inhibitrice de ces extraits a été comparée par rapport au standard allopurinol qui est l'inhibiteur spécifique de la XO. Après ajout de la XO, la réaction a été suivie pendant 60 secondes et l'activité inhibitrice des extraits d'*A. iva* a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi:  $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

A<sub>C</sub>: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A<sub>E</sub>: absorbance en présence de l'inhibiteur

L'IC<sub>50</sub> de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur ( $Y = a X + b$ ). Elle a été exprimée en mg / ml et comparée avec celle de l'allopurinol;  $IC_{50} = (50 - b) / a$

## 2.8. Effet scavenger des extraits d'*Ajuga iva* sur le superoxyde produit par la XO

L'effet scavenger des extraits d'*A. iva* sur l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produit par la XO a été déterminé en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm (Robak and Gryglewski, 1988). Le milieu réactionnel a été composé d'un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.4, 0.1 mM d'EDTA) bien saturé en oxygène aérien, contenant 100 µM de xanthine et 25 µM de cytochrome c et en présence de plusieurs concentrations de chacun des extraits d'*A. iva* (préparées dans le méthanol ou dans le tampon phosphate de sodium). La réaction est suivie pendant 60 secondes après ajout de la XO. L'activité inhibitrice de la réduction du cytochrome c par les extraits d'*A. iva* a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi:

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A<sub>C</sub>: absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

A<sub>E</sub>: absorbance en présence de l'extrait

L'IC<sub>50</sub> de chaque extrait (concentration inhibitrice de la réduction de 50 % du cytochrome c) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait.

## **2.9. Propriétés antioxydantes des extraits d'*Ajuga iva***

### **2.9.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits d'*Ajuga iva* par la méthode de DPPH (effet scavenger)**

L'activité anti-radicalaire des différents extraits d'*A. iva* a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Cuendet et al., 1997; Burits and Bucar, 2000). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour chaque extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT (Butylated hydroxytoluene) pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits d'*A. iva* a été calculé comme suit:  $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

A<sub>C</sub>: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A<sub>E</sub>: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC<sub>50</sub>) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT.

### 2.9.2. Test de $\beta$ -carotène / acide linoléique

L'activité antioxydante des extraits d'*A. iva* a été étudiée par le test au  $\beta$ -carotène / acide linoléique. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique (Barriere et al., 2001; Aslan et al., 2006).

Une solution de  $\beta$ -carotène / acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de  $\beta$ -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C dans le rotavapor. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène (100 ml / min / 30 min) ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350  $\mu$ l de chacun des extraits préparés d'*A. iva* (2 mg / ml, dans l'eau distillée ou dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHT (2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi:

$$AA \% = (A_E / A_C) \times 100$$

$A_E$ : absorbance en présence de l'extrait

$A_C$ : absorbance en présence du contrôle positif BHT

**Remarque:** les valeurs de AA % prises pour la comparaison sont ceux calculées à 24 h.

### 2.10. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SD (déviation standard), et en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne) (n = 3). Les résultats ont été analysés par le test d'ANOVA univarié (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec les contrôles négatifs (en absence des extraits), et la comparaison des extraits entre eux. La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est  $< 0.05$ .

# ***RESULTATS ET DISCUSSION***

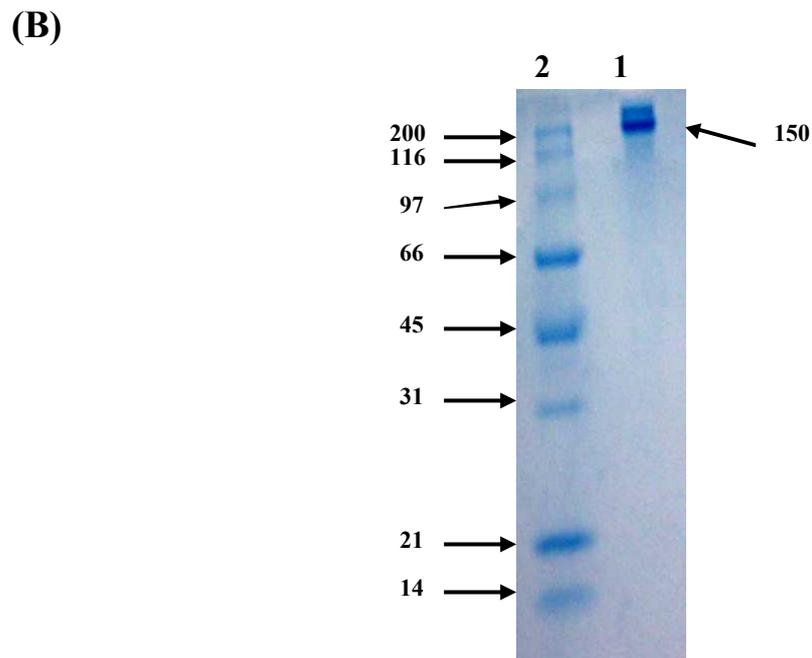
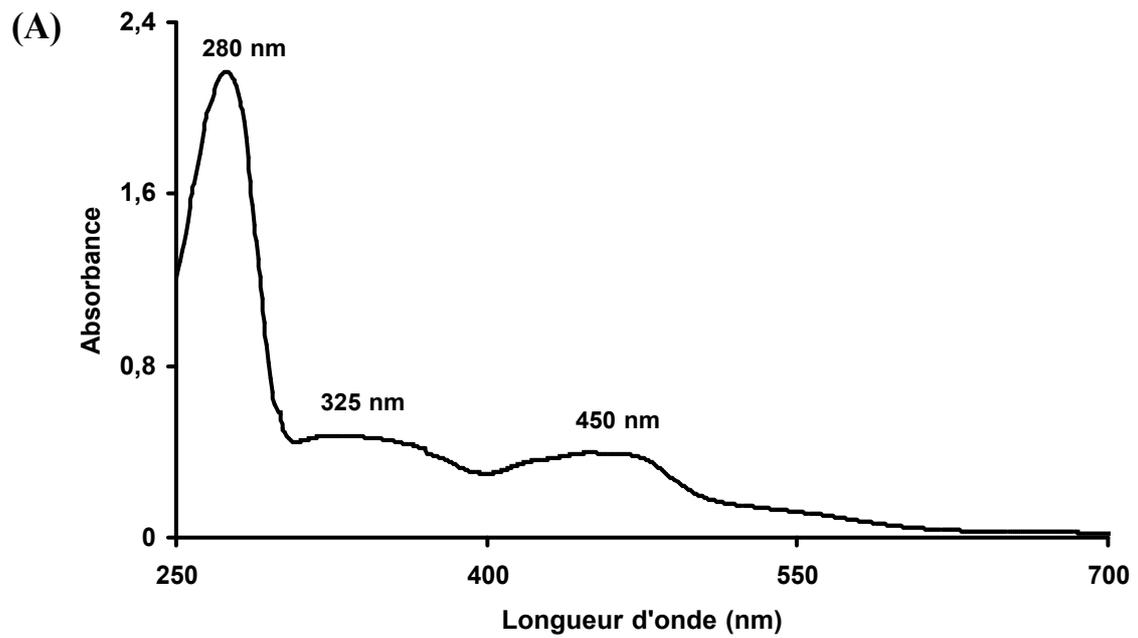
## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Purification, contrôle de pureté et estimation de l'activité de la XO

La purification de la XO a été réalisée par la méthode décrite par Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par Baghiani et al., (2003) à partir du lait bovin frais, par une série de centrifugations puis précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie d'affinité sur colonne de gel d'héparine basée sur l'affinité de la XO aux glycosaminoglycanes sulphatés (Adachi et al., 1993). Le rendement de la purification est de  $\square\square\square\square$  mg d'enzyme purifiée par litre du lait bovin frais. Il est similaire ce qui est trouvé par Baghiani et al., (2002; 2003).

Le spectre d'absorption caractéristique de la XO par un balayage spectrophotométrique (UV-Vis) a présenté trois pics majeurs à 280, 325 et 450 nm (**Figure 21 A**) qui est similaire aux résultats obtenus par les travaux de Abadeh et al., (1992), Sanders et ses collaborateurs (1997), Baghiani et ses collaborateurs (2002; 2003), Benboubetra et ses collaborateurs (2004) et Atmani et ses collaborateurs (2004). Le rapport protéine / flavine PFR a été calculé comme suit:  $A_{280nm} / A_{450nm}$ . La XOR purifiée a donc un degré de pureté élevé présenté par son PFR de 5.15, parce que une valeur proche de 5 est considéré comme critère de pureté (Bray, 1975).

La pureté de l'enzyme a été confirmée par une électrophorèse (SDS-PAGE). Le chemin électrophorétique a présenté une bande majeure d'approximativement 150 KDa (**Figure 21 B**) ce qui est similaire aux résultats des études effectués en 2003 par Baghiani et ses collaborateurs, et en 2004 par Atmani et ses collaborateurs.



**Figure 21:** Spectre d'absorption UV-Vis (A) et électrophorèse (SDS-PAGE) (B) de la XO purifiée. **B1:** XO pure (150 000 Da), **B2:** Standards des poids moléculaires (Myosin 200 000;  $\beta$ -galactosidase 116 250; Phosphorylase b 97 400; Serum albumin 66 200; Ovalbumin 45 000; Carbonic anhydrase 31 000, Trypsin inhibitor 21 500 et Lysozyme Da).

L'activité totale et l'activité de la forme oxydase de l'enzyme purifiée a été estimée du lait bovin en présence de xanthine comme un substrat réducteur et de  $\text{NAD}^+$  et  $\text{d'O}_2$  comme substrat oxydant, et le pourcentage de la forme oxydase a été par la suite calculé. Donc, l'enzyme pure a présenté une activité totale de 2055.05 nmol / min / mg protéine, et le pourcentage de la forme oxydase (XO) de l'enzyme a été de 91.89 % (**Tableau 4**). Ces résultats sont similaires à ceux de Baghiani et al., (2003), qui indiquent, que l'activité de la XOR du lait des différentes espèces mammifères est liée à la forme inactive démolymbo de l'enzyme.

**Tableau 4:** L'activité totale et oxydase de la XOR purifiée à partir du lait bovin frais.

Activité (nmol /min / mg protéine)*		Pourcentage de la forme oxydase (XO)	Rapport protéine/flavine (PFR)
Totale	Forme oxydase (XO)		
2055.05	1988.55	91.89	5.15

\* L'activité totale et l'activité de la forme oxydase ont été calculées en suivant la production de l'acide urique en présence et en absence de  $500\mu\text{M}$  de  $\text{NAD}^+$  respectivement, et  $100\mu\text{M}$  de xanthine dans un tampon Na-bicine à pH 8.3.

## 2. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes d'*A. iva* a été effectuée par les solvants organiques à partir d'une poudre végétale. Cette extraction a permis d'obtenir cinq extraits. Selon Newman et al., (1974) et Markham et al., (1982) les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés seraient comme suit: l'extrait brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins, l'extrait d'hexane qui est en générale constitué de lipides et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'extrait du chloroforme est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'extrait aqueux peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tetra-glycosylés).

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (**Tableau 5**) a montré que l'EBr représente le rendement le plus élevé ( $12.16 \pm 1.47 \%$ ), ensuite l'EAq avec  $7.80 \pm 0.52 \%$ , l'ECh a un rendement de  $1.25 \pm 0.37 \%$  qui est dix fois inférieur à celui de l'EBr, et enfin les rendements de l'EHx ( $0.94 \pm 0.062 \%$ ) et de l'EAc ( $0.90 \pm 0.12 \%$ ) sont les plus faibles et treize fois inférieurs à celui de l'EBr.

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta et al. 2005). Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes est dû à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des trois extraits (EBr, ECh et EAc) d'*A. iva*, a été effectué pour en estimer les teneurs.

Les polyphénols totaux dans ces extraits sont dosés selon la méthode de bleu de Prusse modifiée par Graham (1992). D'après les résultats présentés dans le **Tableau 5**, l'EAc est le plus riche en polyphénols ( $35.83 \pm 0.69 \text{ mg EAG} / \text{g E}$ ) suivi par l'ECh ( $30.58 \pm 0.2 \text{ mg EAG/g E}$ ) et enfin l'EBr qui contient presque la moitié de la quantité de polyphénols trouvée dans l'EAc ( $17.38 \pm 0.29 \text{ mg EAG} / \text{g E}$ ). La détermination des taux des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle que l'ECh représente la fraction la plus riche en flavonoïdes avec une teneur ( $9.64 \pm 0.33 \text{ mg EQ} / \text{g E}$ ) presque double de celle trouvée dans l'EBr ( $4.92 \pm 0.30 \text{ mg EQ} / \text{g E}$ ), ensuite l'EAc avec  $7.72 \pm 0.19 \text{ mg EQ} / \text{g E}$ . Si les calculs sont effectués à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine, la concentration des flavonoïdes

dans ces extraits est doublée parce que la pente de la courbe d'étalonnage de la rutine égale à la moitié de celle de la quercétine (**Figure 20**, section matériel et méthodes).

**Tableau 5:** Le rendement des extraits d'*A. iva* et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

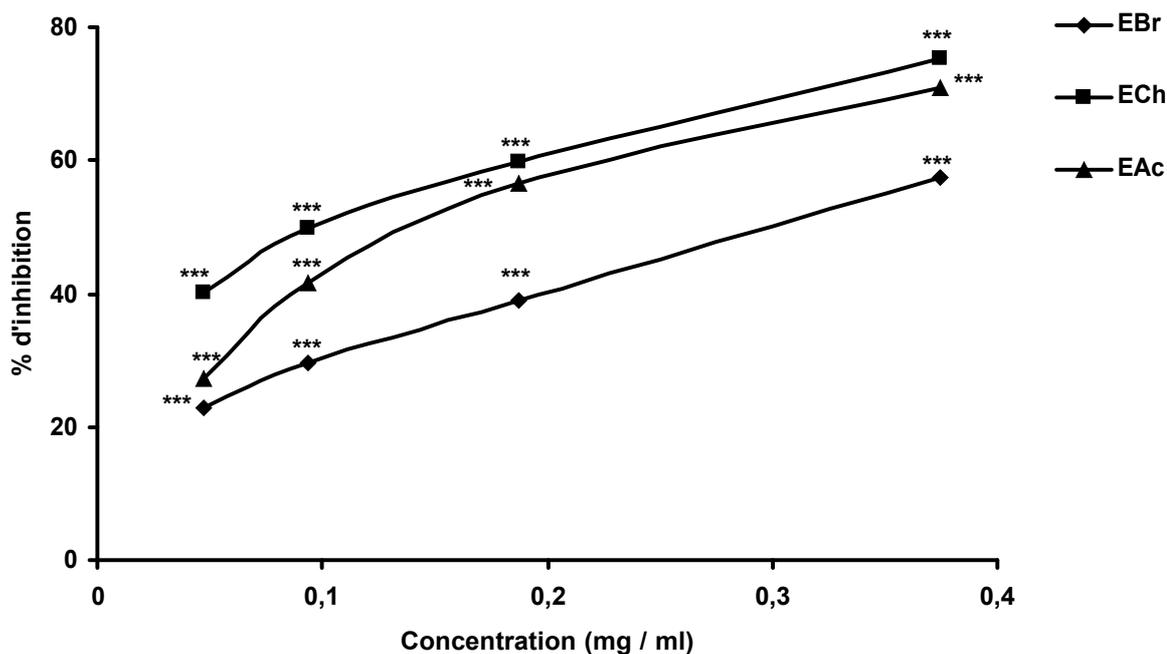
Les extraits	Rendement (%)	Polyphénols totaux (mgEAG/g E)	Flavonoïdes	
			mg EQ / g E	mg ER / g E
EBr	12.16 ± 1.47	17.38 ± 0.29	4.92 ± 0.30	9.90 ± 1.058
EHx	0.94 ± 0.062	nd	nd	nd
ECh	1.25 ± 0.37	30.58 ± 0.2	9.64 ± 0.33	19.49 ± 0.30
EAc	0.90 ± 0.12	35.83 ± 0.69	7.72 ± 0.19	15.87 ± 1.11
EAq	7.80 ± 0.52	nd	nd	nd

nd non déterminé.

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n = 3).

### 3. Inhibition de la xanthine oxydase par les extraits d'*Ajuga iva*

L'effet inhibiteur des extraits d'*A. iva* sur l'activité de la XO du lait bovin a été évaluée spectrophotométriquement à 295 nm. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits inhibent l'activité de la XO très significativement ( $p < 0.001$ , comparant avec le contrôle), d'une manière dose-dépendante (**Figure 22**).



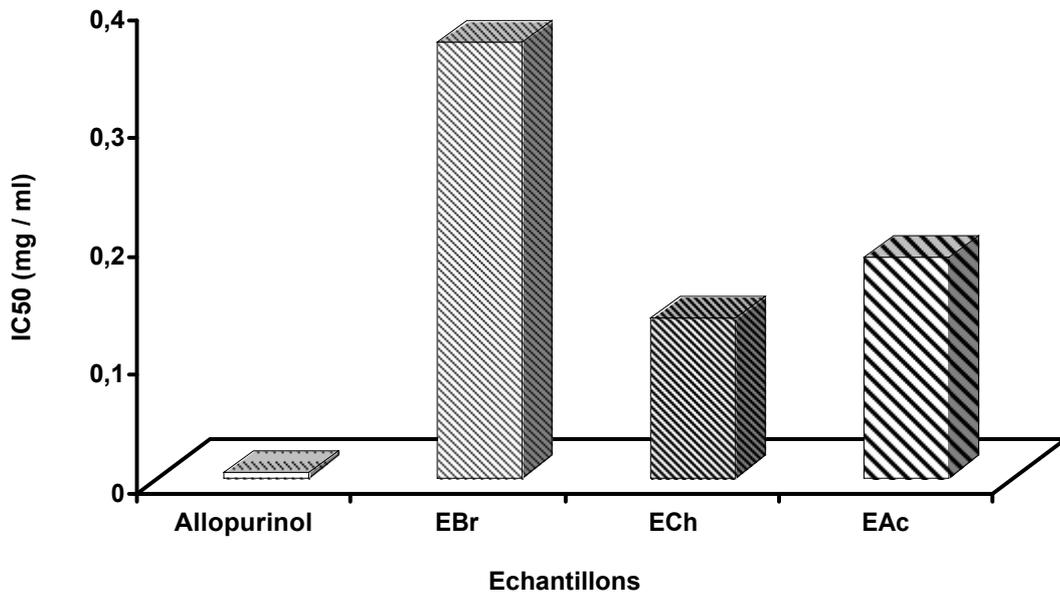
**Figure 22:** Effet inhibiteur des extraits d'*A. iva* sur l'activité de la XO. Chaque point représente la moyenne (n = 3). \*\*\* p < 0.001, comparant avec le contrôle.

Les valeurs des  $IC_{50}$  des différents extraits (**Tableau 6, Figure 23**) montrent que l'ECh semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant, parmi les trois extraits (p < 0.001), avec une  $IC_{50}$  de  $0.134 \pm 0.00032$  mg / ml, suivi par l'EAc ( $IC_{50} = 0.185 \pm 0.0019$  mg / ml), et l'EBr qui a une  $IC_{50}$  ( $0.367 \pm 0.0041$  mg / ml) double de celle de l'EAc. L'ECh et l'EAc ont un effet presque 32 et 44 fois inférieur à l'allopurinol, respectivement, alors que l'EBr est presque 88 fois plus faible.

**Tableau 6:** Les concentrations des extraits d'*A. iva* qui inhibent 50 % de l'activité de la XO.

Echantillons	Allopurinol	EBr	ECh	EAc
$IC_{50}$ (mg / ml)	$0.00419 \pm 0.00036$	$0.367 \pm 0.0041$	$0.134 \pm 0.00032$	$0.185 \pm 0.0019$

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).



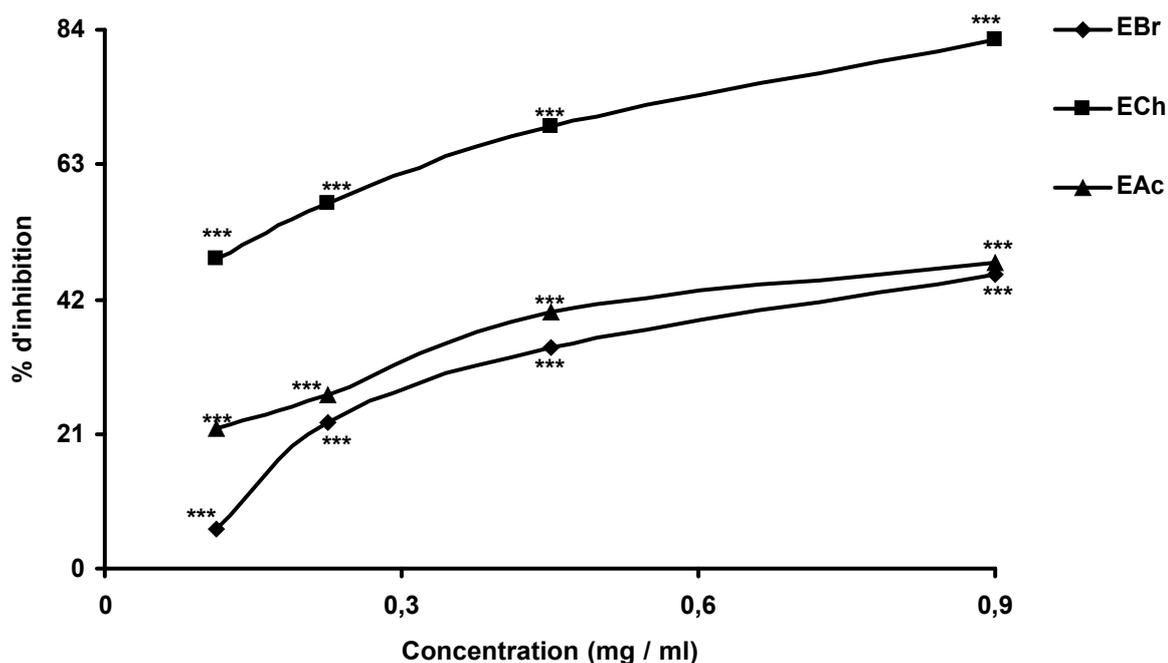
**Figure 23:** Les concentrations des extraits d'*A. iva* et de l'allopurinol qui inhibent 50 % de l'activité de la XO. Chaque valeur représente la moyenne (n = 3).

Il existe des substances qui inhibent la XO en bloquant la fixation du substrat au sites actifs de l'enzyme (Skibo, 1986; Sanders et al., 1997), donc l'inhibition de l'activité de la XO par les extraits d'*A. iva* est traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant sur les sites actifs, Mo et FAD, de l'enzyme. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différentes plantes sur l'activité de la XO (Owen and Johns, 1999; Kong et al., 2000; Sweeney et al., 2001; Zhu et al., 2004; Ferraz Filha et al., 2006; Umamaheswari et al., 2007), cette activité inhibitrice est peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les polyphénols (Costantino et al., 1992; Chiang et al., 1994), les tannins (Schmeda-Hirschmann et al., 1996) et les flavonoïdes (Iio et al., 1985; Hanasaki et al., 1994; Cos et al., 1998; Lin et al., 2002; Van Hoorn et al., 2002; Da Silva et al., 2004).

Cos et ses collaborateurs (1998) ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs activités inhibitrices de la XO. Ils ont montré que la présence de la double liaison entre les carbones C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> et l'absence du groupe hydroxyle en C<sub>3</sub> des flavonoïdes augmentent leur activité inhibitrice. Ils ont aussi montré que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des flavonoïdes non glycosylés ; par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine. La richesse de l'ECh d'*A. iva* en flavonoïdes aglycones pourrait être à l'origine de son effet inhibiteur le plus puissant.

#### **4. Effet scavenger des extraits d'*Ajuga iva* sur l'O<sub>2</sub><sup>°-</sup> produit par la XO**

Pour étudier l'effet scavenger des extraits d'*A. iva* sur l'anion superoxyde produit par la XO, la réduction du cytochrome c (cyt c) par l'O<sub>2</sub><sup>°-</sup> a été suivie à 550 nm. Les résultats ont montré que les extraits inhibent la réduction du cyt c très significativement ( $p < 0.001$ , comparant avec le contrôle), d'une manière dose-dépendante (**Figure 24**). Les résultats des IC<sub>50</sub> des trois extraits d'*A. iva* sont représentés dans le **Tableau 7**. L'effet inhibiteur de la réduction du cyt c le plus puissant est celui de l'ECh (IC<sub>50</sub> = 0.23 ± 0.0017 mg / ml) ( $p < 0.001$ ), suivie par EAc (IC<sub>50</sub> = 1.046 ± 0.0055 mg / ml) qui a un effet presque 4 fois inférieur à celui de l'ECh et 3 fois supérieur à celui de l'EBr le plus faible (IC<sub>50</sub> = 3.34 ± 0.018 mg / ml).



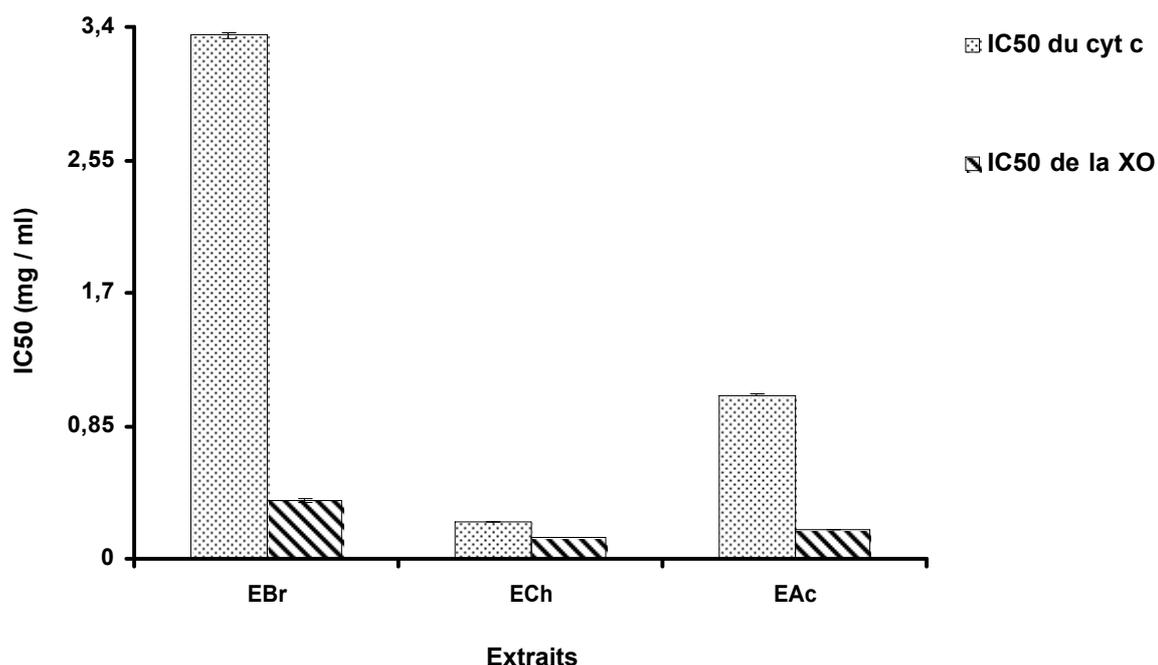
**Figure 24:** Effet inhibiteur de la réduction du cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$  produit par la XO des extraits d'*A. iva*. Chaque point représente la moyenne (n = 3). \*\*\* p < 0.001, comparant avec le contrôle.

**Tableau 7:** Les concentrations des extraits d'*A. iva* qui inhibent la réduction de 50 % du cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$  produit par la XO.

Les extraits	EBr	ECh	EAc
IC <sub>50</sub> (mg / ml)	3.34 ± 0.018	0.23 ± 0.0017	1.046 ± 0.0055

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

L'inhibition de la réduction du cyt c est dû à l'effet inhibiteur de la XO et / ou l'effet scavenger sur l' $O_2^{\bullet-}$  produit par cette enzyme (Valentao et al., 2002). Les IC<sub>50</sub> des trois extraits d'*A. iva* sont représentés dans la **Figure 25**. Pour l'EBr, IC<sub>50</sub> de la production de l'acide urique à partir de l'oxydation de la xanthine par la XO est presque 9 fois plus faible que celle inhibitrice de la réduction du cyt c. La même chose pour l'EAc qui a une IC<sub>50</sub> de la réduction cyt c presque 5 fois supérieur à celle inhibitrice de la XO. Alors que l'ECh a une IC<sub>50</sub> de la réduction du cyt c presque double de celle inhibitrice de la XO.

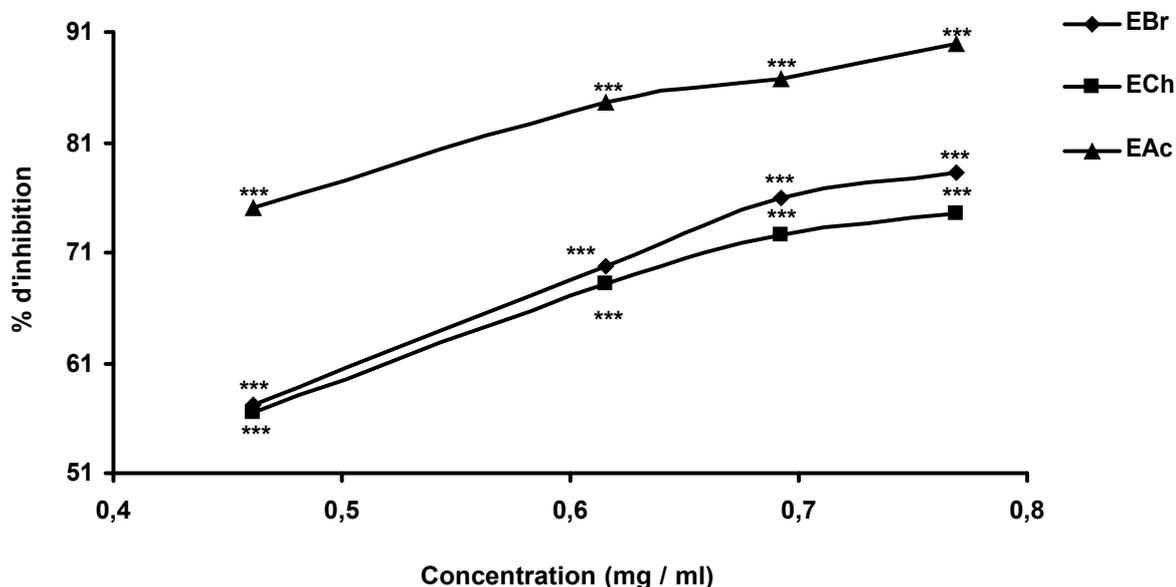


**Figure 25:** Les concentrations des extraits d'*A. iva* qui inhibent 50 % de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50 % du cyt c par l' $O_2^{\circ-}$  produit par cette enzyme. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

L'effet scavenger des radicaux libres par les différents constituants des plants est peut être dû aux acides phénoliques (Kimura et al., 1985; Hatono et al., 1989) et aux flavonoïdes (Hatono et al., 1989). Plusieurs études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Jovanovic et al., 1994; Cotelle et al., 1996; Bors et al., 1997; Cos et al., 1998; Dugas et al., 2000). Les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants: la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> adjacente à la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> (Rice-Evans et al., 1996; Furuno et al., 2002). La quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996). Donc, la richesse de l'ECh en flavonoïdes non glycosylés (**Tableau 5**) peut montrer que son effet inhibiteur de la réduction du cyt c le plus puissant est dû à l'effet scavenger sur l' $O_2^{\circ-}$  et à l'effet inhibiteur de la XO.

## 5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits d'*Ajuga iva* par la méthode de DPPH (effet scavenger)

Dans le test de DPPH, la cinétique de décoloration de ce radical a été suivie à 517 nm après addition de 50  $\mu$ l de chacune des concentrations des extraits d'*A. iva*. L'effet scavenger des trois extraits sur le radical DPPH est très significatif ( $p < 0.001$ , comparant avec le contrôle) et d'une manière dose-dépendante (Figure 26). Le Tableau 8 représente les concentrations des différents extraits et standards qui piègent 50 % du radical DPPH ( $IC_{50}$ ). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Brand-Williams et al., 1995; Tsimogiannis and Oreopoulou, 2004; Atoui et al., 2005). L'EAc possède l'effet scavenger le plus puissant parmi les trois extraits ( $p < 0.001$ ) avec une valeur de  $IC_{50} = 228.01 \pm 2.26 \mu\text{g} / \text{ml}$ , suivi par l'EBr ( $IC_{50}$  de  $415.06 \pm 0.59 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), et enfin l'ECh qui est le plus faible parmi ces extraits avec une  $IC_{50}$  d'environ  $466.33 \pm 3.20 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Comparant avec le BHT les extraits (EAc, EBr et ECh) ont un effet scavenger inférieur de 8, 11 et 14 fois, respectivement.



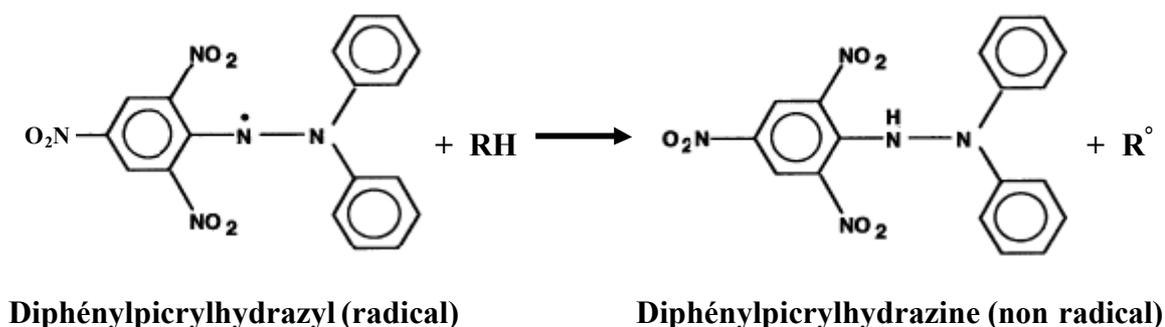
**Figure 26:** Effet scavenger des extraits d'*A. iva* sur le radical DPPH. Chaque point représente la moyenne ( $n = 3$ ). \*\*\*  $p < 0.001$ , comparant avec le contrôle.

**Tableau 8:** Les concentrations des extraits d'*A. iva* et des composés phénoliques qui inhibent 50 % du radical DPPH.

Les échantillons	IC <sub>50</sub> (µg / ml)
EBr	415.06 ± 0.59
ECh	466.33 ± 3.20
EAc	228.01 ± 2.26
BHT	31.87 ± 0.64
Rutine	4.25 ± 0.18
Quercétine	3.22 ± 0.029
Acide gallique	0.58 ± 0.01

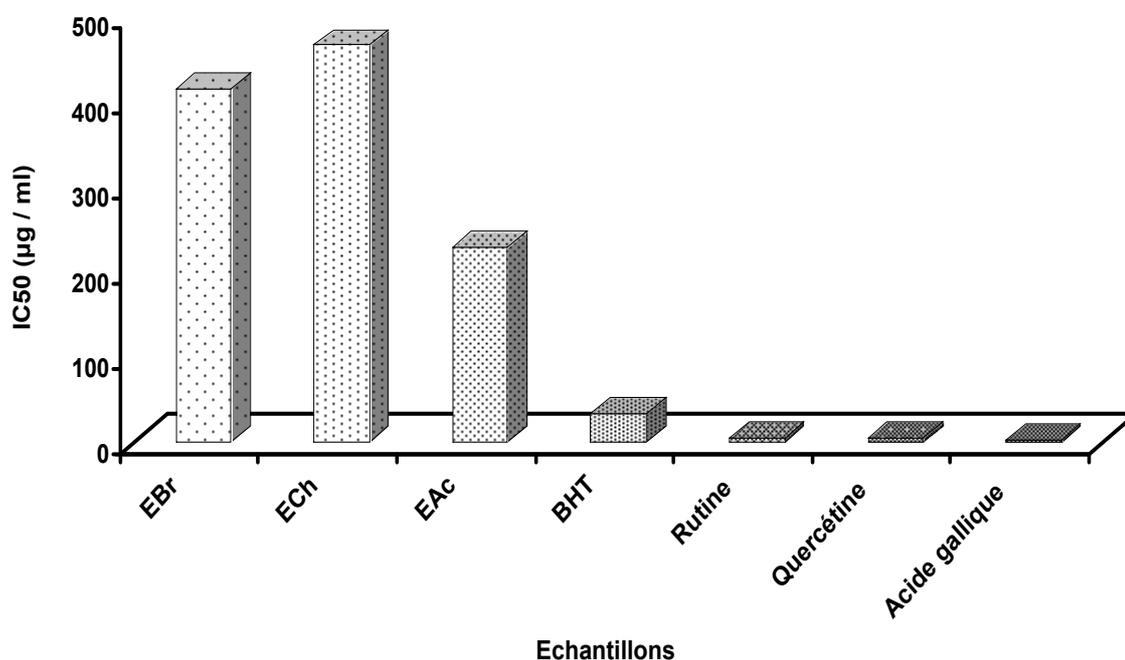
Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (Oyaizu, 1986; Soares et al., 1997; Dorman et al., 2003; Tepe et al., 2005). Il a été trouvé que l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol, les tannins et les flavonoïdes provoquent la réduction et la décoloration du radical libre diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) en lui donnant un hydrogène pour former le diphénylpicrylhydrazine (**Figure 27**) (Blois, 1958; Yokozawa et al., 1998).



**Figure 27:** La réduction du DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2004).

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'EAc, qui représente la fraction la plus riche en polyphénols, possède l'effet scavenger le plus puissant par rapport aux autres extraits. Par contre, l'ECh qui est le plus riche en flavonoïdes, représente l'effet scavenger le plus faible (**Tableau 8, Figure 28**). Les composés phénoliques (acide gallique, quercétine et rutine) possèdent une activité anti-radicalaire très élevée et supérieure à celle du BHT. Le plus actif est l'acide gallique avec une  $IC_{50}$  d'environ  $0.58 \pm 0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$ , ensuite la quercétine et la rutine qui ont des  $IC_{50}$  de  $3.22 \pm 0.029$  et  $4.25 \pm 0.18 \mu\text{g} / \text{ml}$ , respectivement.



**Figure 28:**  $IC_{50}$  du radical DPPH des différents extraits d'*A. iva* et des composés phénoliques. Chaque valeur représente la moyenne ( $n = 3$ ).

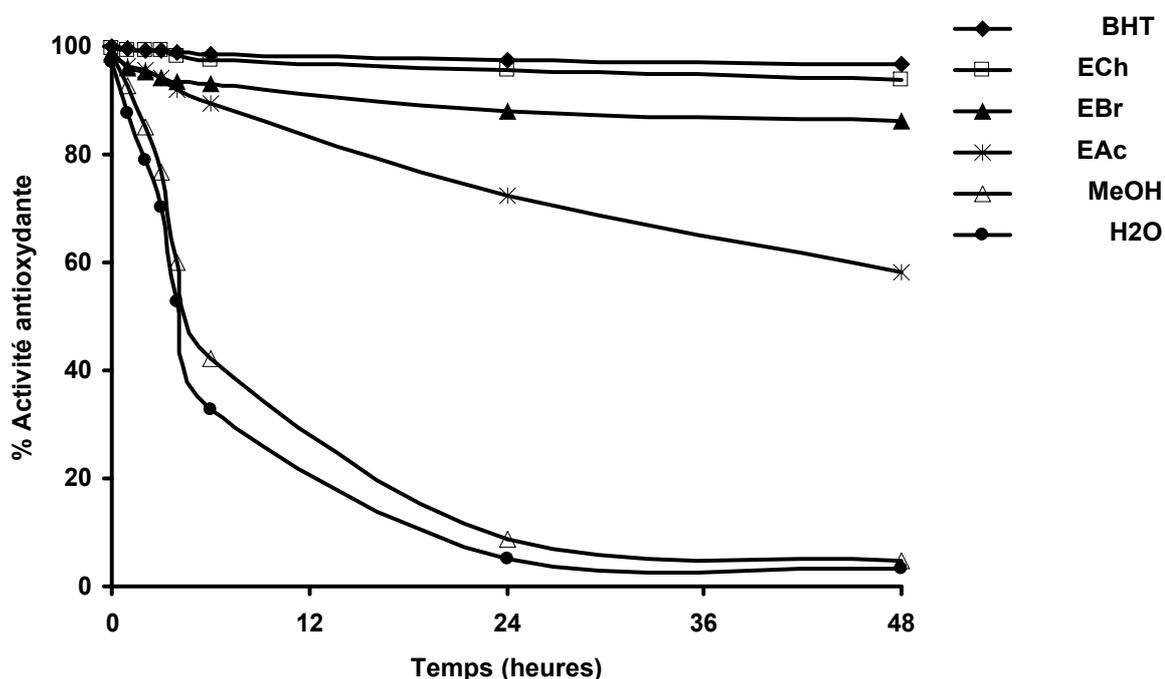
Les résultats du présent travail sont relativement en accord avec les études suivantes: Kumaran et Karunakaran (2007) ont montré que l'effet scavenger des extraits méthanoliques de 5 espèces du genre *Phyllanthus* sur le radical DPPH est en ordre suivant: *Phyllanthus debilis* (87.24 %) > acide ascorbique (77.75 %) > *P. urinaria* (73.18 %) > BHT (72.20 %) > *P. virgatus* (63.21 %) > *P. maderaspatensis* (48.90 %) > *P. amarus* (38.67 %) à concentration de 25 µg / ml. De plus, Dastmalchi et ses collaborateurs (2008) ont déterminé que l'extrait éthanolique de *Melissa officinalis* L. est capable de piéger le radical DPPH de manière dose-dépendante, les IC<sub>50</sub> calculées sont ordonnées comme suit: acide gallique (32.72 ± 0.6 µg / ml) > acide caféique (59.6 ± 2.6 µg / ml) > quercétine (83.0 ± 10.5 µg / ml) > *M. officinalis* (134.16 ± 3.09 µg / ml).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Molyneux, 2004; Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006; Kouri et al., 2007). Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet et al., 1997). L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy (Heim et al., 2002).

## 6. Test de $\beta$ -carotène / acide linoléique

L'activité antioxydante des différents extraits d'*A. iva* a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la décoloration du  $\beta$ -carotène à 490 nm. Les résultats des pourcentages de l'activité antioxydante en fonction du temps sont représentés dans la **Figure 29**.

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique a été déterminé par le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique. Ce test mesure la capacité de l'extrait à inhiber la formation des radicaux libres hydroperoxydes diene conjugués pendant l'oxydation de l'acide linoléique (Tepe et al., 2005). En absence des antioxydants, les radicaux libres formés provoquent l'oxydation du  $\beta$ -carotène et donc sa décoloration. Par contre, la présence des antioxydants dans l'extrait minimise l'oxydation du  $\beta$ -carotène qui conserve sa couleur (Tepe et al., 2005).



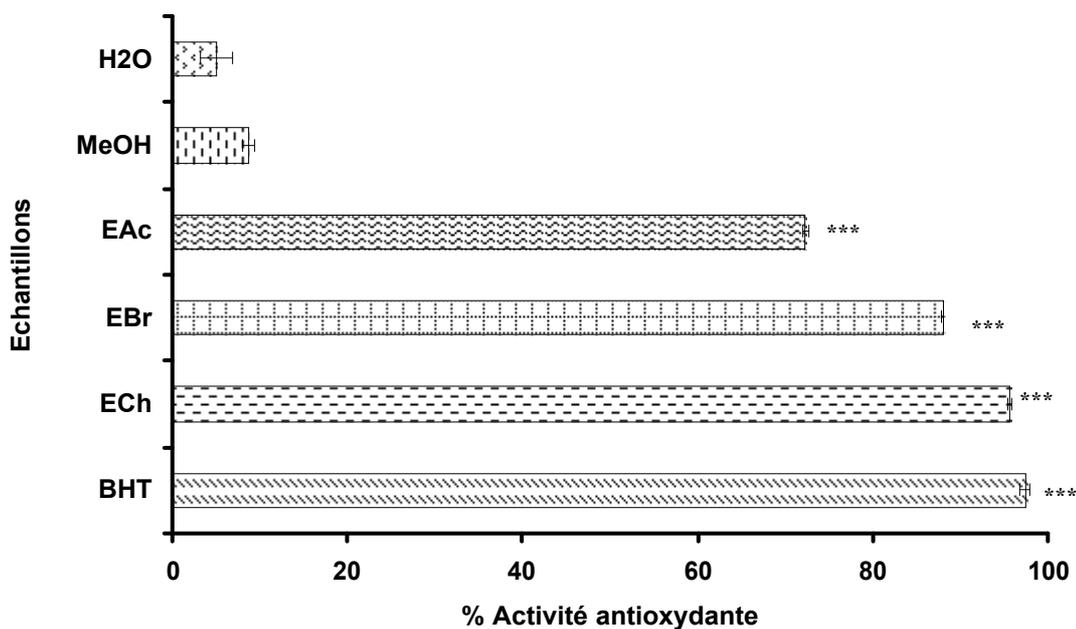
**Figure 29:** Activité antioxydante des extraits d'*A. iva* par rapport au BHT, MeOH et H<sub>2</sub>O par le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique. Chaque point représente la moyenne (n = 3).

D'après les résultats (**Tableau 9, Figure 30**), tous les extraits d'*A. iva* inhibent l'oxydation du  $\beta$ -carotène très significativement ( $p < 0.001$ , comparant avec le contrôle), et d'une façon très importante. Cet effet est dû soit à l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique ou au piégeage des radicaux hydroperoxydes formés durant la peroxydation de l'acide linoléique (effet scavenger) (Tepe et al., 2005; Aslan et al., 2006). La valeur du pourcentage de l'activité antioxydante à 24 h (AA %) la plus élevée parmi les trois extraits est de l'ECh ( $95.64 \pm 0.15 \%$ ), il est le meilleur inhibiteur de l'oxydation du  $\beta$ -carotène ( $p < 0.001$ , comparant avec les autres extraits), suivi par l'EBr qui possède une activité antioxydante élevée ( $87.97 \pm 0.10 \%$ ), et enfin l'EAc qui exerce l'effet antioxydant le plus faible parmi les trois extraits d'*A. iva* (AA % =  $72.30 \pm 0.35 \%$ ).

**Tableau 9:** Effet antioxydant des différents extraits d'*A. iva* par le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique.

Echantillons	AA (%)
EBr	$87.97 \pm 0.10$ ***
ECh	$95.64 \pm 0.15$ ***
EAc	$72.30 \pm 0.35$ ***
BHT	$97.40 \pm 0.55$ ***

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*\*  $p < 0.001$ , comparant avec le contrôle.



**Figure 30:** Activité antioxydante des l'extrait d'*A. iva* et du BHT, MeOH et H<sub>2</sub>O (à 24 h), par le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*\* p < 0.001, comparant avec le contrôle.

Plusieurs études ont montré que l'effet antioxydant des sources naturels est dû à leurs composés phénoliques (Hayase and Kato, 1984; Velioglu et al., 1998; Yang et al., 2002; Nagai et al., 2003). Dans le présent travail, l'ECh qui est le plus riche en flavonoïdes provoque l'effet antioxydant le plus élevé parmi les extraits d'*A. iva*. Par contre, l'EBr, le plus pauvre en flavonoïdes, est plus actif que l'EAc (**Figures 30**).

Ces résultats sont en accord avec ceux montrés dans plusieurs recherches (Amarowicz et al., 1993; Tsuda et al., 1993; Sun and Ho, 2005; Othman et al., 2007). Abdille et ses collaborateurs (2005) ont déterminé que l'extrait méthanolique, l'extrait de l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux des fruits de *Dillenia indica* ont représenté une activité antioxydante de 80.2 %, 55.5 % et 45.5 %, respectivement, à concentration de 100  $\mu$ g / ml.

## Discussion générale

Les résultats de notre présent travail montrent que les deux extraits d'*A. iva* (ECh et EAc) ont un effet relativement élevé sur la production de l'acide urique et la réduction du cyt c, ce qui est peut être dû à la richesse des deux extraits en polyphénols et en flavonoïdes. La Phe 1009 de l'enzyme se réagit avec le cycle hexane de la xanthine et la Phe 914 se réagit avec le cycle pentane de la xanthine, l'hypothèse qui peut être mise en évidence est que les cycles A et C du flavonoïde exercent une interaction avec la Phe 1009 et la Phe 914 de l'enzyme pour l'inhiber (Enroth et al., 2000).

La diminution de la production de l'acide urique est suivie par une diminution de la production de l'anion superoxyde. Donc, l'inhibition de la réduction du cyt c par les extraits de *A. ivas* est dû soit à l'inhibition de la XO ou à l'effet scavenger sur le radical superoxyde, ce qui est en accord avec les résultats de Fridovich (1970). Wu et Ng (2008) ont démontré que les extraits de *Momordica charantia abbreviata* possèdent un effet inhibiteur de la XO et un effet scavenger sur le superoxyde très élevés. Les résultats de notre travail ont montrés que l'ECh possède un effet scavenger proche à celui de l'inhibition de la XO, alors que les deux extraits (EAc et EBr) ont un effet inhibiteur plus élevé que leur effet scavenger sur le superoxyde.

Parmi les méthodes non enzymatiques qui peuvent être utilisées pour évaluer l'activité antioxydante; le DPPH et  $\beta$ -carotène / acide linoléique. La technique de DPPH a été utilisée pour évaluer l'effet scavenger des extraits d'*A. iva* sur le radical libre DPPH: l'EAc représente l'effet scavenger le plus puissant, suivi par l'EBr. L'ECh, qui a l'effet scavenger le plus puissant sur le radical superoxyde, exerce l'effet scavenger faible sur le radical DPPH. Ces résultats sont en accord avec Ardestani et Yazdanparast (2007), qui ont montré que l'extrait

de l'acétate d'éthyle de *Teucrium polium* représente l'activité anti-DPPH la plus élevée, suivi par l'extrait éthanolique.

Dans notre présent travail, en comparant les IC<sub>50</sub> des extraits d'*A. iva* avec celles du composé antioxydant synthétique BHT et les standards, il est à noter que les extraits de la plante possèdent une activité anti-radicalaire jugée très élevée. Mazza et Oomah (2000), ont montré, que les extraits des feuilles de *Ginkgo biloba* possèdent une activité antioxydante très élevée avec une IC<sub>50</sub> de 930 µg / ml. Les extraits d'*A. iva*, selon nos résultats, ont des IC<sub>50</sub> légèrement supérieurs à 200 µg/ml, ce qui provoquent un effet scavenger sur le radical DPPH plus puissant que celui de *Ginkgo biloba*.

Selon le test de β-carotène / acide linoléique, l'oxydation du β-carotène a été effectivement inhibée par les trois extraits d'*A. iva*. L'ECh, qui exerce l'effet scavenger le plus faible sur le radical DPPH, possède l'activité inhibitrice de l'oxydation du β-carotène la plus élevée. L'EAc, qui représente l'effet scavenger le plus puissant sur le radical DPPH, provoque l'effet antioxydant le plus faible.

Les lipides membranaires sont riches en acides gras poly-insaturés, principalement l'acide arachidonique et l'acide linoléique, qui sont la cible privilégiée des radicaux libres (Sharififar et al., 2008). Le radical libre est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé par la suite en radical peroxyde (Favier, 2003). Cette réaction est appelée peroxydation lipidique, elle forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et al., 1992).

Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution: soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui sont éliminés par voie pulmonaire à cause de leur volatilité (Favier, 2003). Après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, le radical peroxyde peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (Ahmad, 1995).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'attaque des lipides circulants aboutissant à l'oxydation des LDL (lipoprotéines de densité légère) qui sont captées par des macrophages en formant le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Peynet et al., 2005; Ramel et al., 2004). L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane en modifiant donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

La capacité antioxydante des plantes est principalement due à leur richesse en composés phénoliques, qui sont capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique (Amic et al., 2003). La présence et le nombre de groupements OH libres sont des facteurs déterminants de l'activité antioxydante des polyphénols (Sharififar et al., 2008).

Sharififar et al (2008) ont montré que l'extrait méthanolique de *Pelargonium endlicherianum* inhibe l'oxydation de l'acide linoléique à  $72.6 \pm 2.96 \%$ , suivi par *Hieracium cappadocicum* ( $55.1 \pm 2.33 \%$ ) et *Verbascum viedemannianum* ( $52.5 \pm 3.11 \%$ ). L'extrait méthanolique de *Centaurea mucronifera* exerce l'effet antioxydant le plus faible ( $35.2\% \pm 3.04 \%$ ) par rapport au BHT ( $96.6 \pm 1.29 \%$ ) (Tepe et al. 2006).

En 2007, Chenni et ses collaborateurs ont montrés que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* diminue les endommagements tissulaires dus au stress oxydatif chez les rats traités par des doses élevées de cholestérol. Bouderbala et ses collaborateurs (2008) ont montré que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* peut réduire le stress oxydant et diminuer la peroxydation lipidique chez des rats hypercholestérolémiques. Il a été suggéré que la défense antioxydante chez les rats hypercholestérolémiques traités par *Ajuga iva* peut être due aux flavonoïdes et iridoïdes présents dans cette plante (Ghedira et al., 1991),

Les résultats obtenus par notre étude nous ont permis de conclure que les extraits d'*Ajuga iva* contiennent des composés phénoliques qui ont la capacité à inhiber la XO et à exercer un effet scavenger sur les radicaux libres ( $O_2^{\circ}$  et DPPH) relativement élevée, avec une activité antioxydante et inhibitrice de la peroxydation lipidique très importante. Ce qui explique et confirme les utilisations de cette plante dans la médecine traditionnelle et surtout comme plante anti-inflammatoire et anti-rhumatoïde. Mais cette étude reste préliminaire et il faut d'autres études complémentaires approfondies qui se résument dans les points suivants: (i) séparation, identification et caractérisation des composés actifs dans les trois extraits par des méthodes fiables, et évaluation de leur activité antioxydante en utilisant différentes techniques *in vitro*, (ii) une étude *in vivo* pour traiter l'arthrite provoquée chez les rats est souhaitable, partant du fait qu'un extrait ou une substance isolée de l'extrait peuvent être très actifs *in vitro* mais perdent cette activité une fois pénétrés dans le corps, et vice versa, (iii) étude toxicologique et pharmacologique de la plante et la possibilité de l'utiliser soit comme médicament pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XOR et/ou scavenge les radicaux libres et/ou l'inhibition de la peroxydation lipidique, ou comme additif antioxydant naturel dans les produits alimentaires au lieu d'utiliser les antioxydants synthétiques afin de retarder la peroxydation lipidique dans les aliments.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadeh S., Killacky J., Benboubetra M. and Harrison R. (1992). Purification and partial characterisation of xanthine oxidase from human milk. *Biochem. Biophys.* **1117**, 25-32.
- Abdille M.H., Singh R.P., Jayaprakasha G.K. and Jena B.S. (2005). Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry* **90**, 891-896.
- Adachi T., Fukushima T., Usami Y. and Hirano K. (1993). Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem. J.* **289**, 523-527.
- Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., and Potapovitch A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1763-1769.
- Afolayan A.J. and Meyer J.J.M. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **57**, 177-181.
- Ahmad S. (1995). Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. 1<sup>st</sup> Ed. *Chapman & Hall*. New York. pp: 1-457.
- Amarowicz R., Wanasundara U., Wanasundara J. and Shahidi F. (1993). Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a  $\beta$ -carotene-linoleate model system. *Journal of Food Lipids* **1**, 111-117.
- Amaya Y., Yamazaki K., Sato M., Noda K., Nishino T. and Nishino T. (1990). Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type of the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J. Biol. Chem.* **265**, 14170-14175.
- Amić D., Davidović -Amić D., Bešlo D. and Trinajstić N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta* **76**, 55-61.
- Ardestani A. and Yazdanparast R. (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycooxidation. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 2402-2411.
- Aruoma O.I. (1993). Use of DNA damage as a measure of pro-oxidant actions of antioxidant food additives and nutrient components. In "Halliwell B., Aruoma O.I. (Eds.), DNA and Free Radicals". *Ellis Horwood*, London. pp: 315-327.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F. and Özkan H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm. Biol.* **44**, 247-252.
- Atawodi S.E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* **4**, 128-133.

- Atmani D., Benboubetra M. and Harrison H. (2004). Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. *J. Dairy Res.* **71**, 7-13.
- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G. and Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* **89**, 27-36.
- Augustin A.J., Boker T., Blumenroder S.H., Lutz J., and Spitznas M. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 3897-3904.
- Avis P.G., Bergel F. and Bray R.C. (1956). Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part III. Estimations of the cofactors and the catalytic activities of enzyme fractions from cow's milk. *Journal of the Chemistry Society*, 1219-1226.
- Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood.* **93**, 1464-1476.
- Baghiani A., Arrar L. and Benboubetra M. (2002). Purification and comparative kinetic study of the milk molybdoflavoenzyme, xanthine oxidoreductase, from different species. In "Chapman S., Perham R. Scrutton N. and Weber R. (Eds.), Flavins and flavoproteins 2002". *Agency for Scientific Publications*, Berlin. pp: 837-844.
- Baghiani A., Harrison R. and Benboubetra M. (2003). Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry* **111**, 407-414.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res.* 1-6.
- Balaban R.S., Nemoto S. and Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Bandhopadhyay U., Das D. and Banerjee R.K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science* **77**, 658-666.
- Barriere C., Centeno D., Lebert A., Leroy-Setrin S., Berdague J.L. and Talon R. (2001). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 181-185.
- Bartsch H. and Nair J. (2000). Ultrasensitive and specific detection methods for egzocyclic DNA adducts: Marker for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology* **153**, 105-114.
- Batanouny K.H., Abou Tabl S., Shabana M. and Soliman F. (1999). Wild medicinal plants in egypt. *Academy of Scientific Research and Technology*. International Union for Conservation (IUCN). Egypt.
- Battelli M.G., Abbondanza A. and Stirpe F. (1992). Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes: conversion from D to O form and leakage from cells. *Chem.-Biol. Interactions* **83**, 73-84.

- Baynes J.W. and Thorpe S.R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**, 1-9.
- Belviranlı M. and Gökbel H. (2006). Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur. J. Gen. Med.* **3**, 126-131.
- Ben Jannet H., Al Mourabit A., Gateau-Olesker A., Marazano C. and Mighri Z. (1999). Enantioselective synthesis of natural biologically active ivaide A: 1,3-di-(R)- $\beta$ -hydroxy-glyceride glycerol. *Tetrahedron Asymmetry* **10**, 2381-2386.
- Ben Jannet H., Harzallah-skhiry F., Mighri Z., Simmonds M.S. and Blaney W.M. (2000). Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neo-clerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Fitoterapia* **71**, 105-112.
- Benboubetra M., Baghiani A., Atmani D. and Harrison H. (2004). Physicochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J. Dairy Sci.* **87**, 1580-1584.
- Berry C.E. and Hare J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **555**, 589-606.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapirstein H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.* **82**, 390-393.
- Bieber J.D. and Terkeltaub R.A. (2004). Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthrit. Rheum.* **50**, 2400-2414.
- Blake D.R., Stevens C.R., Sahinogla T.M., Ellis G., Gaffney K., Edmonds S., Benboubetra M., Harrison R., Jawed S., Kanezler J., Miller T.M., Winyord P.G. and Zhang Z. (1997). Xanthine oxidase; four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 812-816.
- Blois M.S. (1958). Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature* **4617**, 1199-1200.
- Bondet V., Williams W.B. and Berset C. (1997). Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie* **30**, 609-615.
- Bondi M.L., Al-Hillo M.R.Y., Lamara K., Ladjel S., Bruno M., Piozzi F. and Simmonds M.S.J. (2000). Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**, 1023-1025.
- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P. and Delattre J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. In "Delattre J, Durand G, Jardillier JC. (Eds.), Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires". *Médecine-sciences, Flammarion*. Paris. pp: 59-81.
- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Beaudeau J.L., Peynet J., Legrand A. and Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann. Biologica et Clinica* **59**, 453-459.
- Bors W., Michel C. and Stettmaier K. (1997). Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. **6**, 343-355.

- Bouderbala S., Lamri-Senhadjia M., Prostb J., Lacaille-Duboisc M.A. and Bouchenak M. (2008). Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine* **15**, 453-461.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Seddik K. and Arrar L. (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research* **23**, 283-288.
- Boveris A., Oshino N., ChanceB. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**, 617-630.
- Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., Foidart J.M., De Pestel G. and Mareel M. (1991). Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. *Clin. Exp. Metastasis* **9**, 13-25.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **28**, 25-30.
- Bray R.C. (1975). Molybdenum iron-sulfer flavin hydroxylases and related enzymes. In " Boyer P.D (Eds.), The enzymes" 3<sup>rd</sup> Ed. *Academic Press*, New York. pp: 299-419.
- Brownlee M., Vlassara H. and Cerami A., (1984). Non-enzymic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of Internal Medicine* **101**, 527-530.
- Bruneton J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. *Lavoisier*. Paris. pp: 278-279.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Ed. Editions médicales internationales, *éditions Tec & Doc Lavoisier*. Paris. p: 1120.
- Burdon R.H. and Gill V. (1993). Cellular generated active oxygen species and Hella Cell proliferation. *Free Rad. Res. Comm.* **19**, 203-213.
- Burits M. and Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* **14**, 323-328.
- Cadenas E. and Davies J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222-230.
- Cao G., Sofic E. and Prior R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol.* **22**, 749-760.
- Cerutti P.A. (1994). Oxy-radicals and cancer. *Lancet* **344**, 862.
- Céspedes C.L., El-Hafidi M., Pavon N. and Alarcon J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of *Chilean blackberry Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry* **107**, 820-829.
- Chenni A., Ait Yahia D., Boukortt F.O., Prost J., Lacaille-Dubois M.A. and Bouchenak M. (2007). Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Ethnopharmacol.* **109**, 207-213.

- Chiang H.C., Lo Y.J. and Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibitions* **8**, 61-71.
- Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H. and Kim S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* **163**, 1161-1168.
- Comhair S.A. and Erzurum S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol.* **283**, 246-255.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van-Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J. and Vanden Berghe D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **61**, 71-76.
- Costantino L., Albasini A., Rastelli G. and Benvenuti S. (1992). Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med.* **58**, 342-345.
- Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 569-590.
- Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. and Gaydou E.M. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 35-43.
- Cottiglia F., Loy G., Garau D., Floris C., Casu M., Pompei R. and Bonsignore L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* **8**, 302-305.
- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobiol agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 564-582.
- Critchfield J.W., Butera S.T. and Folks T.M. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 12-39.
- Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* **80**, 1144-1152.
- Da Silva S.L., Da Silva A., Honório K.M., Marangoni S., Toyama M.H. and 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**, 1-7.
- Della Corte E. and Stirpe F. (1968). The regulation of rat liver xanthine oxidase: activation by proteolytic enzymes. *European Journal of Biochemistry Letters.* **2**, 83-84.
- Della Corte E. and Stirpe F. (1972). The regulation of rat liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.* **126**, 739-745.
- Della Corte E., Gozzetti G., Novello F. and Stirpe F. (1969). Properties of the xanthine oxidase from human liver. *Biochem. Biophys. Acta.* **191**, 164-166.

- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. and Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **65**, 337-353.
- Dorman H.J.D., Peltoketo A., Hiltunen R. and Tikkanen, M.J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* **83**, 255-262.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Dugas A.J., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H. and Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod.* **63**, 327-331.
- El Hilaly J. and Lyoussi B. (2002). Hypoglycaemic effect of the liophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **80**, 109-113.
- El Hilaly J., Lyoussi B., Wibo M. and Morel N. (2004). Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* **93**, 69-74.
- El-Hilaly J., Tahraoui A., Israili Z.H. and Lyoussi B. (2006). Hypocholesterolemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 441-448.
- Enomoto A., Kimura H. and Chairoungdua A. (2002). Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature.* **417**, 447-452.
- Enroth C., Eger B.T., Okamoto K., Nishino T., Nishino T. and Pai E.F. (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10723-10728.
- Erben-Russ M., Bors W. and Saran M. (1987). Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.* **52**, 393-412.
- Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* **24**, 851-874.
- Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. and Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 341.
- Evans W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 647-652.
- Faure P. and Bonnefont-Rousselot D. (2005). Stress oxydant, diabète sucré et produits de glycation avancée. In "Delattre J, Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (Eds.), Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques". Editions médicales internationales, Lavoisier édition, TEC & DOC, Paris. pp: 354-376.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L. and Giachetti D. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* **416**, 123-129.
- Ferrandiz M.L. and Alcaraz M.J. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* **32**, 283-288.
- Ferrari A.M., Sgobba M., Gamberina M.C. and Rastelli G. (2007). Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylated coumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 1028-1031.
- Ferrari C.K.B., (2001). Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal* **8**, 175-184.
- Ferraz Filha Z.S., Vitolo I.F., Fietto L.G., Lombardi J.A. and Saúde-Guimarães D.A. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ( Arnica). *Journal of Ethnopharmacology* **107**, 79-82.
- Fouché J.G., Marquet A. and Hambuckers A. (2000). Les plantes médicinales, de la plante au médicament. In "Sart-Tilman (Eds.), Observatoire du Monde des Plantes". Editions médicales internationales, *Lavoisier édition, TEC & DOC*, Paris.
- Freeman B.A., Young S.L. and Crapo J.D. (1983). Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J. Biol. Chem.* **258**, 12534-12542.
- Fridovich I. (1970). Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **245**, 4053-4057.
- Friedl H.P., Till G.O., Ryan U.S. and Ward P.A. (1989). Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* **3**, 2512-2518.
- Fulbert J.C. and Cals M.J. (1992). Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, **49**, 66- 77.
- Furuno K., Akasako T. and Sugihara N. (2002). The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19-23.
- Gabor M. (1986). Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **213**, 471.
- Galati G. and O'Brien P.J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine* **37**, 287-303.
- Ghedira K., Chemli R., Richard B., Zeches M. and Le-Men-Olivier L. (1991). Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle de Tunisie: étude des parties aériennes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* **25**, 100-111.

- Godber B.L.J., Doel J.J., Durgan J., Eisenthal R. and Harrison R. (2000). A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.* **475**, 93-96.
- Govindarajan R., Vijayakumar M. and Pushpangadan P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of *Ayurveda*. *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 165-178.
- Govindarajan R., Vijayakumar M., Rao C.V., Kumar V., Rawat A.K.S. and Pushpangadan P. (2004). Action of *Asparagus racemosus* against streptozotocin-induced oxidative stress. *Natural Product Sciences* **10**, 177-181.
- Graham H.D. (1992). Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 801-805.
- Granger D.N., Rutili G. and McCord J.M. (1981). Role of superoxide radical in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. **81**, 22-29.
- Grankvist K., Marklfund S. and Taljedal I.B. (1981). Superoxide dismutase is prophylactic against alloxan diabetes. *Nature* **294**, 158-161.
- Hale A.L. (2003). Screening potato genotypes for antioxidant, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah Strains using aflp and microsatellite marker analysis. *Genetics*. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. p: 260.
- Halimi A.K. (2004). Les plantes médicinales en Algérie. 1<sup>ère</sup> édition. *BERTI Editions*, Alger. pp: 156-157.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nut. Rev.* **52**, 253-265.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. In "Free radicals in biology and medicine". 3<sup>rd</sup> Ed. *Oxford. University Press*. pp: 1-543.
- Halliwell B., and Gutteridge J.M.C. (1989). Free radical in biology and medicine. 2<sup>nd</sup> Ed. *Clarendon Press*, Oxford University.
- Hanasaki Y., Ogawa S. and Fukui S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Boil. Med.* **16**, 845-850.
- Hancock J.T., Salisbury V., Ovejero-Boglione M.C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R. and Harrison R. (2002). Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**, 3308-3310.
- Harborne J.B. and Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *phytochemistry* **55**, 481-504.
- Harman D. (1998). Aging: phenomenon and theories. *American New York Academy of Sciences* **854**, 1-7.
- Harris C.M. and Massey V. (1997a). The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics and steady-state mechanism. *J. Boil. Chem.* **272**, 28335-28341.

- Harris C.M. and Massey V. (1997b). The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen-reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J. Boil. Chem.* **272**, 8370-8379.
- Harris M.D., Siegel L.B. and Alloway J.A. (1999). Gout and hyperuricemia. *American Family Physician* **59**, 925-934.
- Harrison R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine.* **33**, 774-797.
- Hatono T., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Fujita Y., Yasuhara T., et al. (1989). Effects of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **37**, 2016-2021.
- Hayase F. and Kato H. (1984). Antioxidative components of sweet potatoes. *Journal of Natural Science Vitaminology* **30**, 37-46.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
- Hille R. (1996). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.
- Hille R. and Anderson R.F. (1991). Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* **266**, 5608-5615.
- Hille R. and Massey V. (1981a). Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J. Boil. Chem.* **256**, 9090-9095.
- Hille R. and Massey V. (1981b). Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **256**, 9090-9095.
- Hille R. and Nishino T. (1995). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* **9**, 995-1003.
- Hogg N. (1998). Free radicals in disease. *Seminar in Reproductive Endocrinology* **16**, 241-248.
- Horiuchi H., Ota M., Nishimura S., Kaneko H., Kasahara Y., Ohta T., and Komoriya K. (2000). Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice. *Life Sci.* **66**, 2051-2070.
- Huang Y.T., Ghio A.J., Nozik-Grayck E. and Piantadosi C.A. (2001). Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lungs. *American Journal of Physiology.* **280**, 474-481.
- Hunt J.V., Smith C.C.T. and Wolff S.P. (1990). Auto-oxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* **39**, 1420-1424.
- Ichida K., Amaya Y., Noda K., Minoshima S., Hosoya T., Sakai O., Shimizu N. and Nishino T. (1993). Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase):

- structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* **133**, 279-284.
- Iio M., Moriyama A., Matsumoto Y., Takaki N. and Fukumoto M. (1985). Inhibition of Xanthine oxidase by flavonoids by folate compounds and amethopterin. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 12-15.
- Ishibuchi S., Morimoto H., Oe T., Ikebe T., Inoue H., Fukunari A., Kamezawa M., Yamada I. and Naka Y. (2001). Synthesis and structure-activity relationships of 1-phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **11**, 879-882.
- Izzo A.A. (1996). PAF and the digestive tract. A review. *J. Pharmacol.* **48**, 1103-1111.
- Jarasch E.D., Grund C., Bruder G., Heid H.W., Keenan T.W. and Franke W.W. (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*. **25**, 67-82.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B. and Simic M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4846-4851.
- Kanter M., Meral I., Dede S., Cemek M., Ozbec H., Uygan I., and Gunduz H. (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl<sub>4</sub>- treated rats. *J. Vet. Med. A.* **50**, 264-268.
- Kaul T.N., Middletown E. and Ogra P.L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* **15**, 71-79.
- Kemertelidze E. P., Tsitsishvili V. G., Alaniya M. D., and Sagareishvili T. G. (2000). Structure-function analysis of the radioprotective and antioxidant activity of flavonoids. *Chemistry of Natural Compounds*. **36**, 54-59.
- Kimura Y., Okuda T., Hatono T., Agata I., and Arichi S. (1985). Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **33**, 2028-2034.
- Kinsky N. (1989). Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 617.
- Knecht K.T. and Mason R.P. (1988). In vivo radical trapping and biliary secretion of radical adducts of carbon tetrachloride-derived free radical metabolites. *Drug Metab. Dispos.* 813-817.
- Kong L.D, Cai Y., Huang W.W., Cheng C.H. and Tan R.X. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 199-207.
- Kooij A., Bosch K.S., Frederiks W.M. and Van Noorden C.J.F. (1992). High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology* **62**, 143-150.

- Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H. and Oreopoulou V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **8**, 155-162.
- Koyama K., Kaya M., Ishigaki T., Tsujita J., Hori S., Seino T. and Kasugai A. (1999). Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **80**, 28.
- Krane S.M., Conca W., Stephenson M.I., Amento E.P. and Goldring, M.B. (1990). Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **580**, 340-354.
- Krause K.H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 28-29.
- Krenitsky T.A., Spector T. and Hall W.W. (1986). Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 108-119.
- Krinsky N.I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 561-87.
- Kumaran A. and Karunakaran J.R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *L.W.T.* **40**, 344-352.
- Kuwabara Y., Nishino T., Okamoto K., Matsumara T., Eger B.T., Pai E.F. and Nishino T. (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 8170-8175.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larocca L.M., Giustacchini M., Maggiano N., Ranelletti F.O. Piantelli M., Alcini E. and Capelli A. (1994). Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *J. Urol.* **152**, 1029-1033.
- Lefkowitz D.L., Gelderman M.P., Fuhrmann S.R., Graham S., Starnes J.D., Lefkowitz S.S., Bollen A. and Moguelevsky N. (1999). Neutrophilic lysozyme-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clinical Immunology* **91**, 145-155.
- Lin C.M., Chen C.S., Chen C.T., Liang Y.C. and Lin J.K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. And Biophys. Res. Commun.* **294**, 167-172.
- Linder N., Rapola J. and Raivio K.O. (1999). Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory Invest.* **79**, 967-974.
- Lotito S.B. and Frei B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine* **41**, 1727-1746.

- Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V. and Bíró L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* **47**, 119-125.
- Makimura M., Hirasawa M., Kobayashi K., Indo J., Sakanaka S., Taguchi T. and Otake S. (1993). Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J. Periodontol.* **64**, 630-636.
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.
- Marnett L.J. (1987). Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* **8**, 1365.
- Massey V. and Edmondson D. (1970). On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* **245**, 6595-6598.
- Masuoka N. and Kubo I. (2004). Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1688**, 245-249.
- Mates J.M., Perez-Gomez C. and Nunez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**, 595-603.
- Mather I.H. (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* **83**, 203-247.
- Mauro S. (2006). The role of antioxidants in disease prevention. *Nutrition and coexisting disease* **12**, 533-535.
- Mazza G. and Oomah B.D. (2000). Chemistry, pharmacology and clinical applications of St. John's wort and *Ginkgo biloba*. In "Herbs, Botanicals and Teas". *Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, PA, U.S.A.* pp: 131-176.
- Mbaveng A.T., Ngameni B., Kuete V., Simo I.K., Ambassa P., Roy R., Bezabih M., Etoa F.O.X., Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Meyer J.J.M., Lall N. and Beng V.P. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **116**, 483-489.
- Mc Cord J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine.* **312**, 159-163.
- Mc Cord J.M. and Fridovich I. (1968). The reduction of cytochrom c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **243**, 5753-5760.
- Mecocci P., Polidori M.C., Troiano L., Cherubini A., Cecchetti R. and Pini, G. (2000). Plasma antioxidants and longevity: a study on health centenarians. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 1243-1248.
- Medić -Šarić M., Jasprica I., Smolčić -Bubalo A. and Mornar A. (2004). Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica Chemica Acta* **77**, 361-366.

- Middleton E., J.R., Kandaswami C. and Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.
- Middleton E.J. (1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* **34**, 344-348.
- Middleton E.J. and Drzewiecki G. (1984). Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Biopharm.* **33**, 3333-3338.
- Mitchinson M.J. and Ball R.Y. (1987). Macrophages and atherogenesis. *Lancet* **2**, 146-148.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- Montagnier L., Olivier R. and Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. *Marcel Dekker, New-York*.
- Moorhouse P.C., Grootvelt M., Halliwell B., Quinlan J.G. and Gutteridge M.C.J. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *Europ. J. of Biochem. Lett.* **213**, 23-28.
- Morel Y., Mermoud N. and Barouki R. (1999). An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NFI. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6825-6832.
- Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A. and O'Brien P.J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic. Boil. Med.* **34**, 243-253.
- Moriwaki Y., Yamamoto T., Suda M., Takahashi S., Agbedana O.E., Hada T. and Higashino K. (1993). Purification and immunohistochemical localization of human xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* **1164**, 327-330.
- Morris C.J., Earl J.R., Trenam C.W. and Blake D.R. (1995). Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **27**, 109-122.
- Morris M.E. and Zhang S. (2006). Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences* **78**, 2116-2130.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M.J. and Parajó J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* **72**, 145-171.
- Murray K.N., Watson J.G. and Chaykin S. (1966). Catalysis of the direct transfer of oxygen from nicotinamide N-oxide to xanthine by xanthine oxidase. *J. Boil. Chem.* **241**, 4798-4801.
- Nagai T., Reiji I., Hachiro I. and Nobutaka S. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry* **80**, 29-33.
- Nakamura M. and Yamazaki I. (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *The Journal of Biochemistry* **92**, 1279-1286.

- Newman P.R., Timmerman B.N. and Marby T.J. (1974). Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.
- Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K. and van Leeuwen P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**, 418-425.
- Nikolic J., Kocic G. and Jevtovic-Stojmenov T. (2006). Effect of bioflavonoid lespeflan on xanthine oxidase activity in mercury chloride toxicity. *Pharmacologyonline* **3**, 669-675.
- Nishino T. and Nishino T. (1997). The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J. Biol. Chem.* **272**, 29859-29864.
- Nishino T. and Tamura I. (1991). The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Advances in Experimental Biology and Medicine.* **309**, 327-333.
- Nostro A., Germanò M.P., D'Angelo V., Marino A. and Cannatelli M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters en Microbiologie Appliquée* **30**, 379.
- Nuki G. (2006). Gout. *Metabolic and Genetic Arthropathies.* **34**, 417-423.
- O'Connell J.E. and Fox P.F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal* **11**, 103-120.
- Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 38388-38393.
- Olson J.S., Ballou D.P., Palmer G. and Massey V. (1974a). The mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Boil. Chem.* **249**, 4363-4382.
- Olson J.S., Ballou D.P., Palmer G. and Massey V. (1974b). The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen. *J. Boil. Chem.* **249**, 4350-4362.
- Othman A., Ismail A., Abdul Ghani N. and Adenan I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* **100**, 1523-1530.
- Owen P.L. and Johns T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 149-160.
- Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* **44**, 307-315.
- Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabó C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.* **58**, 87-114.

- Packer L., Tritschler H.J. and Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 359-378.
- Page S., Powell D., Benboubetra M., Stevens C.R., Blake D.R., Selase F., Wolstenholme A.J. and Harrison R. (1998). Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**, 191-202.
- Parks D.A. and Granger D.N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and pathology. *Acta. Physiol. Scand. [Suppl.]* **548**, 87-99.
- Parks D.A., Williams T.K. and Beckman J.S. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol.* **254**, G768-G744.
- Pascual-Villalobos M.J. and Robledo A. (1998). Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products* **8**, 183-194.
- Pascual-Villalobos M.J. and Robledo A. (1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern. *Spain Biochemical Systematics and Ecology* **27**, 1-10.
- Pea F. (2005). Pharmacology of drugs for hyperuricemia: mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib. Nephrol.* **147**, 35-46.
- Peluso M.R. (2006). Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med.* **231**, 1287-1299.
- Perez H.D., Weksler B.B. and Goldstein I.M. (1990). Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generating system. *Inflammation.* **4**, 313-328.
- Peynet J., Beaudeau J.L. and Legrand A. (2005). Stress oxydant et athérosclérose. In "Delattre Beaudeau J. and Bonnefont-Rousselot J.L.D. (Eds.), Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques". *Lavoisier, édition TEC & DOC éditions médicales internationales*. Paris. pp: 312-351.
- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.
- Pinkus R., Weiner L.M. and Daniel V. (1996). Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kB and glutathione S-transferase gene expression. *Journal of Biology and Chemistry* **271**, 13422-13429.
- Potapovich A.I. and Kostyuk V.A. (2003). Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry (Moscow)* **68**, 514-519.
- Price M.P. and Butler L.G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**, 1268-1273.
- Psotová J., Lasovský J. and Vičar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers* **147**, 147-153.

- Ramel A., Wagner K.H. and Elmadfa I. (2004). Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr* **43**, 2-6.
- Rastelli G., Costantino L. and Albasini A. (1997). A model of the interaction of substrates and inhibitors with xanthine oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3007-3016.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Plant Science* **2**, 152-159.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., and Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**, 933-956.
- Robak J. and Gryglewski R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 837-841.
- Rott K.T. and Agudelo C.A. (2003). Gout. *J. Am. Med. Assoc.* **289**, 2857-2860.
- Rouquette M., Page S., Bryant R., Benboubetra M., Stevens C.R., Blake D.R., Whish W.D., Harrison R. and Tosh D. (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localized on the outer surface of human endothelial cells in culture. *FEBS Lett.* **426**, 397-401.
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. and Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **177**, 67-80.
- Sanders S., Eisenthal R.S. and Harrison R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase – reneration of superoxyde anion. *Eur. J. Biochem.* **245**, 541-548.
- Schardinger F. (1902). Über das Verhalten der Kuhmilch genen Methylenblau und seine verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Untersuch Nahrungs Genussmittel* **5**, 1113-1121.
- Schlesinger N. (2004). Management of acute and chronic gouty arthritis: present state-of-the-art. *Drugs.* **64**, 2399-2416.
- Schmeda-Hirschmann G., Zuniga J., Dutra-Behrens M. and Habermehl G. (1996). Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae). *Phytotherapy Research* **10**, 260-262.
- Schreck R. and Baeuerle P.A. (1991). A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends in Cellular Biology.* **1**, 39-42.
- Seiss H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical applications. *American Journal of Medicine* **91**, 375-385.
- Sharififar F., Dehghan-Nudeh G. and Mirtajaldini M. (2008). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 1-19.
- Simmonds M.S.J. and Blaney W.M. (1992). Labiate-insect interactions: effects of labiate derived compounds on insect behaviour. In “Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), Advances in Labiatae Science”, *Royal Botanic Gardens, Kew.* pp: 375-392.

- Skibo E.B. (1986). Non competitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at functional flavin adenine dinucleotide cofactor. *Biochemistry* **25**, 4189-4194.
- Soares J.R., Dins T.C.P., Cunha A.P. and Ameida L.M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research* **26**, 469-478.
- Spencer J.P.E., Abd El Mohsen M.M. and Rice-Evans C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **423**, 148-161.
- Squadrito G.L. (2000). Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **376**, 333-337.
- Stevens C.R., Miller T.M., Clinch J.G., Kanczler J.M., Bodamyali T. and Blake D.R. (2000). Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet*. **356**, 829-830.
- Stewart R.C., Hille R. and Massey V. (1984). Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and pH-dependent redox behaviour of the molybdenum-arsenite center. *J. Biol. Chem.* **259**, 14426-14436.
- Stirpe F. and Della Corte E. (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase – conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Boil. Chem.* **244**, 3855-3863.
- Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R. and Culotta V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **276**, 38084-38089.
- Sun T. and Ho C.T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* **90**, 743-749.
- Sweeney A.P., Wyllie S.G., Shalliker R.A. and Markhan J.L. (2001). Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology* **75**, 273-277.
- Taibi G., Paganini A., Gueli M.C., Ampola F. and Nicotra C.M. (2001). Xanthine oxidase catalyzes the synthesis of retinoic acid. *J. Enz. Inh.* **16**, 275-285.
- Tan S., Radi R., Gaudier F., Evens R.A., Rivera A., Kirk K.A. and Parks D.A. (1993). Physiologic levels of uric acid inhibits xanthine oxidase in human plasma. *Pediatrics in Research*. **34**, 303-307.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G. and Mathé G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* **56**, 200-207.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* **90**, 333-340.

- Tepe B., Munevver S., Askin A., Onder Y. and Atalay S. (2006). Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora Bektas. *Food Chemistry* **98**, 9-13.
- Terada L.S., Leff J.A., Guidot D.M., Willingham D.M. and Repine J.E. (1991). Inactivation of xanthine oxidase by hydrogen peroxide involves site-directed hydroxyl radical formation. *Free Radicals Biology and Medicine*. **10**, 61-68.
- Terkeltaub R.A. (2003). Clinical practice: Gout. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1647-1655.
- Topham R.W., Walker M.C. and Calish M.P. (1982). Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 1240-1246.
- Tordera M., Ferrandiz M.L. and Alcaraz M.J. (1994). Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Z. Naturforsch.* **49**, 235-240.
- Truglio J.J., Theis K., Leimkühler S., Rappa R., Rajagopalan K.V. and Kisker C. (2002). Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure*. **10**, 115-125.
- Tsimogiannis D.I. and Oreopoulou V. (2004). Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **5**, 523-528.
- Tsimogiannis D.I. and Oreopoulou V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **7**, 140-146.
- Tsuda T., Makino Y., Kato H., Osawa T. and Kawakishi S. (1993). Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**, 1606-1608.
- Turrens J.F., Freeman B.A. and Crapo J.D. (1982). Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 411-421.
- Umamaheswari M., Asok-Kumar K., Somasundaram A., Sivashanmugam T., Subhadradevi V. and Ravi T.K. (2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology* **109**, 547-551.
- Unno T., Sugimoto A. and Kakuda T. (2004). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Journal of Ethnopharmacology* **93**, 391-395.
- Usuda N., Reddy M.K., Hashimoto T., Rao M.S. and Reddy J.K. (1988). Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Laboratory Invest.* **58**, 100-111.
- Valentao P., Fernndes E., Canvalho E., Andrade P.B., Seabra R.M. and Bastos M.L. (2002). Antioxidant activity of *Hypericum androsaenium* infusion scavenging effect on

- superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1324-1327.
- Van Acker S.A.B.E., Van Balen G.P., Van den Berg D.J., Bast A. and Van der Vijgh W.J.F. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* **56**, 935-943.
- Van Acker S.A.B.E., Van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der Vijgh W.J.F. and Bast A. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 331-342.
- Van den Munckhof R.J.M., Vreeling-Sindelarova H., Schellens J.P.M., Van Noorden C.J.F. and Frederiks W.M. (1995). Ultrastructural localization of xanthine oxidase activity in the digestive tract of the rat. *Histochem. J.* **27**, 897-905.
- Van Hoorn D.E.C., Nijveldt R.J., Van Leeuwen P.A.M., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D.B.A. and Van Norren K. (2002). *Europ. J. of Pharm.* **451**, 111-118.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. and Oomah B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4113-4117.
- Wang J. and Mazza G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4183-4189.
- Ward J.F., Evans J.W. and Calabro-Jones P.M. (1987). Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *British Journal of Cancer* **55**, 105-112.
- Waud W.R. and Rajagopalan K.V. (1976a). Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-dependent (type D) and O<sub>2</sub>-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 354-364.
- Waud W.R. and Rajagopalan K.V. (1976b). The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD<sup>+</sup>-dependent form (type D) to an O<sub>2</sub>-dependent form (type O). *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 365-379.
- Wessner M., Champion B., Girault J.P., Kaouadji N., Saidi B. and Lafont R. (1992). Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry-Oxford* **31**, 3785-3788.
- Williams C.A. and Harborne J.B. (1994). The Flavonoids. Advances in research since 1986. In "Harborne J.B.". *Chapman & Hall*, London. pp: 337-385.
- Woolfolk C.A. and Dawnard J.S. (1977). Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity among bacteria. *Journal of Bacteriology* **130**, 1175-1191.
- Wortmann R.L. (2005). Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr. Opin. Rheumatol.* **17**, 319-324.
- Wright R.M., Vaitailis G.M., Wilson C.M., Repine T.B., Terada L.S. and Repine J.E. (1993). cDNA cloning, characterization and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/ xanthine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10690-10694.

- Wu S.J. and Ng L.T. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *L.W.T.* **41**, 323-330.
- Xia M., Dempski R. and Hille R. (1999). The reductive half-reaction of xanthine oxidase-reaction with aldehyde substrats and identification of the catalytically labile oxygen. *J. Biol. Chem.* **274**, 3323-3330.
- Xu P., Huecksteadt T. and Hoidal J.R. (1996). Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics* **34**, 173-180.
- Xu P., Huecksteadt T. Harrison R. and Hoidal J.R. (1994). Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 998-1004.
- Yang J.H., Lin H.C. and Mau J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* **77**, 229-235.
- Yasuhiro T., Kumiko H.A., Hideki H., Lin Z., Yoshinori K., Shiro K. and Michael A.B. (2005). *Life Sciences.* **76**, 1835-1847.
- Yokoda M., Kitta T., Kikawa Y., Ogorochi T., Narumiya S. and Kawai C. (1988). Stimulated arachidonate metabolism during foam cell transformation of mouse peritoneal macrophages with oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* **81**, 720-729.
- Yokozawa T., Chen C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G.I. and Nishioka I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology* **56**, 213-222.
- Yoshikawa T. and Naito Y. (2000). The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radical Research* **33**, 785-794.
- You Z.L., Shi D.H. and Zhu H.L. (2006). The inhibition of xanthine oxidase by the Schiff base zinc (II) complex. *Inorganic Chemistry Communications* **9**, 642-644.
- Young J.L., Boswell R.B. and Nies A.S. (1974). Severe allopurinol hypersensitivity. Association with thiazides and prior renal compromise. *Arch. Intern. Med.* **134**, 553-559.
- Zhang Z., Naughton D., Winyard P.G., Benjamin N., Blake D.R. and Symons M.C.R. (1998). Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 767-772.
- Zhu J.X., Wang Y., Kong L.D., Yang C. and Zhang X. (2004). Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology* **93**, 133-140.



## RESUME

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits de la partie aérienne de la plante *Ajuga iva* (EAI), utilisée en médecine traditionnelle en Algérie, sur la xanthine oxydase (XO) et de ses propriétés antioxydantes. La XO a été purifiée du lait bovin avec un rendement de  $\square\square\square\square$  mg / L, un rapport protéine / flavine de 5.15, et avec une bande majeure d'environ 150 KDa, en SDS-PAGE, indiquant une bonne pureté de l'enzyme. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée a été de 2055.05 nmol / min / mg protéine. L'analyse des extraits méthanolique (EBr), chloroformique (ECh) et acétate d'éthyle (EAc) a montré que l'EAc représente la fraction la plus riche en polyphénols ( $35.83 \pm 0.69$  mg EAG / g d'extrait sec), suivi par l'ECh et l'EBr ( $30.58 \pm 0.2$  et  $17.38 \pm 0.29$  mg EAG / g d'extrait sec, respectivement). Alors que l'ECh contient la teneur en flavonoïdes la plus élevée ( $9.64 \pm 0.33$  mg EQ / g d'extrait sec), suivi par l'EAc et l'EBr avec  $7.72 \pm 0.19$  et  $4.92 \pm 0.30$  mg EQ / g d'extrait sec, respectivement. L'ECh inhibe la XO ( $IC_{50} = 0.134 \pm 0.00032$  mg / ml) et la réduction du cytochrome c ( $IC_{50} = 0.23 \pm 0.0017$  mg / ml), suivi par l'EAc avec des  $IC_{50}$  de la XO et de la réduction du cyt c de  $0.185 \pm 0.0019$  et  $1.046 \pm 0.0055$  mg / ml, respectivement. Enfin, l'EBr qui a un faible effet sur la XO ( $IC_{50} = 0.367 \pm 0.0041$  mg / ml), possède l'effet inhibiteur de la réduction du cyt c le plus faible avec une  $IC_{50}$  de  $3.34 \pm 0.018$  mg / ml. Le potentiel antioxydant a été confirmé par les méthodes non enzymatiques. L'EAc possède l'effet scavenger sur le radical DPPH le plus élevé ( $IC_{50} = 228.01 \pm 2.26$   $\mu$ g / ml), suivi par l'EBr et l'ECh avec des  $IC_{50}$  de  $415.06 \pm 0.59$  et  $466.33 \pm 3.20$   $\mu$ g / ml, respectivement. Dans le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique, les EAI ont une activité antioxydante très importante. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante la plus élevée était celle de l'ECh ( $95.64 \pm 0.15$  %), suivi par l'EBr et l'EAc avec  $87.97 \pm 0.10$  % et  $72.30 \pm 0.35$  %, respectivement. Les résultats obtenus suggèrent que ces produits naturels peuvent être utilisés pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XO, le piégeage des radicaux libres et / ou l'inhibition de la peroxydation lipidique.

**Mots clés:** Xanthine oxydase, stress oxydatif, antioxydants, flavonoïdes, plantes médicinales, *Ajuga iva*, effet scavenger, DPPH, peroxydation lipidique,  $\beta$ -carotène / acide linoléique.

## SUMMARY

This study was conducted to search for XO inhibitors from *Ajuga iva* shoot extracts (AISE) traditionally used in folk medicine in Algeria. XO was purified from fresh bovine milk with yields of  $\square\square\square\square$  mg / L, protein / flavine ratio of 5.15 and a single major band, on SDS-PAGE, of approximately 150 KDa, indicating a high purity of the purified enzyme. The specific activity of the purified enzyme was of 2055.05 nmol / min / mg protein. The analysis of methanol (CrE), chloroform (ChE) and ethyl acetate (EaE) extracts, showed that the EaE has significant amount of polyphenols ( $35.83 \pm 0.69$  mg EGA / g dry extract), followed by ChE and CrE ( $30.58 \pm 0.2$  and  $17.38 \pm 0.29$  mg EGA / g dry extract, respectively). The ChE has the highest flavonoids content ( $9.64 \pm 0.33$  mg EQ / g dry extract), followed by EaE and CrE with  $7.72 \pm 0.19$  et  $4.92 \pm 0.30$  mg EQ / g dry extract, respectively. The ChE showed the highest inhibitory properties on the XO activity ( $IC_{50} = 0.134 \pm 0.00032$  mg / ml) and on the cytochrome c reduction ( $IC_{50} = 0.23 \pm 0.0017$  mg / ml), followed by EaE with  $IC_{50}$  of XO inhibitory activity and an  $IC_{50}$  of the inhibition of cyt c reduction of  $0.185 \pm 0.0019$  and  $1.046 \pm 0.0055$  mg /ml, respectively. Finally, CrE had the lowest inhibitory effect on XO activity and on cyt c reduction with  $0.367 \pm 0.0041$  and  $3.34 \pm 0.018$  mg / ml, respectively. The antioxidant potential was confirmed with the non enzymatic methods, DPPH assay and  $\beta$ -carotene / linoleic acid bleaching assay. The highest DPPH radical scavenging activity was observed with EaE ( $IC_{50} = 228.01 \pm 2.26$   $\mu$ g / ml), followed by CrE and ChE with  $IC_{50}$  of  $415.06 \pm 0.59$  and  $466.33 \pm 3.20$   $\mu$ g / ml, respectively. The  $\beta$ -carotene / linoleic acid bleaching assay revealed that AISE have a very important antioxidant activity. Results showed that ChE has the highest antioxidant activity ( $95.64 \pm 0.15$  %), followed by CrE and EaE with  $87.97 \pm 0.10$  % and  $72.30 \pm 0.35$  %, respectively. These results suggest that these natural products could be used to treat lot of diseases, where inhibition of XO, free radical scavenging activity and / or inhibition of lipid peroxidation are necessary.

**Keywords:** Xanthine oxidase, oxidative stress, antioxidants, flavonoids, medicinal plants, *Ajuga iva*, scavenger effect, lipid peroxidation,  $\beta$ -carotene / linoleic acid.

**Nom:** ADJADJ

**Prénom:** Moufida

**Date de soutenance:** 20 / 06 / 2009

**Thème: Propriétés Antioxydantes et Activité Inhibitrice de la Xanthine Oxydase des Extraits de la Plante Médicinale *Ajuga iva***

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits de la partie aérienne de la plante *Ajuga iva* (EAI), utilisée en médecine traditionnelle en Algérie, sur la xanthine oxydoréductase (XO) et de ses propriétés antioxydantes. La XO a été purifiée du lait bovin avec un rendement de  $\square\square\square\square$  mg / L, un rapport protéine / flavine de 5.15, et avec une bande majeure d'environ 150 KDa, en SDS-PAGE, indiquant une bonne pureté de l'enzyme. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée a été de 2055.05 nmol / min / mg protéine. L'analyse des extraits méthanolique (EBr), chloroformique (ECh) et acétate d'éthyle (EAc) a montré que l'EAc représente la fraction la plus riche en polyphénols ( $35.83 \pm 0.69$  mg EAG / g d'extrait sec), suivi par l'ECh et l'EBr ( $30.58 \pm 0.2$  et  $17.38 \pm 0.29$  mg EAG / g d'extrait sec, respectivement). Alors que l'ECh contient la teneur en flavonoïdes la plus élevée ( $9.64 \pm 0.33$  mg EQ / g d'extrait sec), suivi par l'EAc et l'EBr avec  $7.72 \pm 0.19$  et  $4.92 \pm 0.30$  mg EQ / g d'extrait sec, respectivement. L'ECh inhibe l'activité de la XO ( $IC_{50} = 0.134 \pm 0.00032$  mg / ml) et la réduction du cytochrome c ( $IC_{50} = 0.23 \pm 0.0017$  mg / ml), suivi par l'EAc avec des  $IC_{50}$  de la XO et de la réduction du cyt c de  $0.185 \pm 0.0019$  et  $1.046 \pm 0.0055$  mg / ml, respectivement. Enfin, l'EBr qui a un faible effet sur la XO ( $IC_{50} = 0.367 \pm 0.0041$  mg / ml), possède l'effet inhibiteur de la réduction du cyt c le plus faible avec une  $IC_{50}$  de  $3.34 \pm 0.018$  mg / ml. Le potentiel antioxydant a été confirmé par les méthodes non enzymatiques. L'EAc possède l'effet scavenger sur le radical DPPH le plus élevé ( $IC_{50} = 228.01 \pm 2.26$   $\mu$ g / ml), suivi par l'EBr et l'ECh avec des  $IC_{50}$  de  $415.06 \pm 0.59$  et  $466.33 \pm 3.20$   $\mu$ g / ml, respectivement. Dans le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique, les EAI ont une activité antioxydante très importante. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante la plus élevée était celle de l'ECh ( $95.64 \pm 0.15$  %), suivi par l'EBr et l'EAc avec  $87.97 \pm 0.10$  % et  $72.30 \pm 0.35$  %, respectivement. Les résultats obtenus suggèrent que ces produits naturels peuvent être utilisés pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XOR, le piégeage des radicaux libres et / ou l'inhibition de la peroxydation lipidique.

**Mots clés:** XO, stress oxydatif, antioxydants, flavonoïdes, plantes médicinales, *Ajuga iva*, effet scavenger, DPPH, peroxydation lipidique,  $\beta$ -carotène / acide linoléique.

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Farhat Abbes, Sétif.

**Membres du Jury:**

**Président:** Dr. KHELIFI TOUHAMI Fatima M.C., Université de Constantine

**Rapporteur:** Dr. BAGHIANI Abderrahmane M.C., Université de Sétif

**Examineurs:** Dr. ABIDLI Nacira M.C., Université de Constantine

Pr. ARRAR Lekhmici Pr., Université de Sétif