

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Tlemcen
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

**Laboratoire de recherche de Physiologie,
Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition**

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie
Option : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Etude *in vitro*. de l'effet antioxydant des complexes Flavonoïdes – Métaux : Relation structure activité

Présentée par : CHERRAK Sabri Ahmed

Devant le jury :

Présidente :	MERZOUK Hafida	Professeur, Université de Tlemcen
Examineurs :	AOUES ABDELKADER,	Professeur, Université d'Oran
	KHARROUBI Omar,	Professeur, Université d'Oran
	BOUCHERIT Zahia	Professeur, Université de Tlemcen
Directrice :	MOKHTARI Nassima	Professeur, Université de Tlemcen
Co-Directeur :	EL HABIRI Mourad	Professeur, Université de Strasbourg

Année universitaire : 2016–2017

A mes parents

A ma femme, mes enfants et ma famille

A mes amis et aux membres du laboratoire PPABIONUT.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Mme MOKHTARI Nassima, professeur au département de Biologie à l'Université de Tlemcen, pour son appui constant durant la réalisation de cette thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour son encadrement de qualité et pour m'avoir accordé sa confiance. Merci pour avoir toujours été disponible et pour avoir été à mon écoute, pour m'avoir guidé tout en me laissant libre dans mes choix. Merci tout particulièrement pour votre soutien scientifique mais aussi humain durant la rédaction qui a été particulièrement difficile

Je remercie tout particulièrement Mme MERZOUK Hafida, professeur à l'Université de Tlemcen et directrice de Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (PPABIONUT) qui a fait tout ce qui été possible pour faciliter la réalisation de cette thèse, et pour son aide précieuse et ces conseils inestimables. Je la remercie également d'avoir accepté de présider ce jury et d'avoir donné de son temps pour examiner ce travail. Soyez assurée madame de mon respect le plus profond.

J'exprime mon estime et mes vifs remerciements aux honorables membres de jury pour avoir accepté d'examiner et juger ce modeste travail :

Aux examinateurs : **Pr AOUES Abdelkader**, **Pr KHARROUBI Omar** et **Pr BOUCHERIT Zahia** Je suis très honorée de votre investissement dans la lecture et l'examen de cette Thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mr ELHABIRI Mourad, professeur à l'Université de Strasbourg, de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de chimie bioorganique et médicinal de l'Université de Strasbourg et d'avoir mis à ma disposition tout ce qui était nécessaire pour la réalisation de cette thèse. Je le remercie également d'avoir accepté de codiriger ce travail et pour le temps consacré durant la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier vivement l'ensemble de l'équipe du laboratoire de chimie bioorganique et médicinal de l'Université de Strasbourg pour leur aide et pour leur gentillesse notamment le Pr Elisabeth DAVIOUD-CHARVET et Mlle Angeline CHERBONNEL.

Je remercie finalement les membres du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Abréviations

AG:Acides gras

ATOX1 : Protéine antioxydante 1;

ATP7A : Protéine de Menkes;

Cat: Catalase

CCS : Chaperonne à cuivre de la superoxyde dismutase;

CE₅₀ : Concentration efficace à 50%

ConA: Concanavalline A

COX : Cytochrome c oxydase;

COX17 : Protéine d'assemblage de la cytochrome c oxydase;

CTR1 : Protéine de transport du cuivre;

Cu : Cuivre

DPPH :2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EC : Epicatéchine

EGCG : Epigallo catéchine gallate

ERO : Espèces réactives oxygénées

ESI-MS : Spectrométrie de masse en mode electrospray

Fe : Fer

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH: Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC-MS/MS: Liquid chromatography–mass spectrometry

LDL : Low density lipoprotein

LMCT : Transfert de charge du ligand vers le métal

MDA: Malondialdehyde

Mn: Manganèse

MT : Métallothionéine

MTT : 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide.

MW : Molecular weight

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : Monoxyde d'azote

NTA : Acide nitrilotriacétique

O₂^{•-} : Anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

PBS : Tampon phosphate salin

pH: Potentiel hydrogen

PYP :Pyrimidopurinone

Quercétine-3'4'OH :3,5,7-tri-O-méthyl-quercétine

Quercétine-35OH :7,3',4'-tri-O-méthyl-quercétine

Quercétine-3OH : 5,7,3',4'-tétra-O-méthyl-quercétine

Quercétine-5OH :3,7,3',4'-tétra-O-méthyl-quercétine

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SCO1/SCO2 : protéines de synthèse de la cytochrome oxydase

Se: Sélénium

SH : Groupement thiol

SOD : Superoxyde dismutase

TBA: Acide thiobarbiturique

TBARs : Thiobarbituric acid reactants

TCA: Acide trichloroacétique

TTL: Test de transformation lymphoblastique

UDP : Uridine di phosphate

Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail <i>et al.</i> , 2002)	17
Figure 2 : Production des Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote au cours du métabolisme (Sergent <i>et al.</i> , 1997).....	18
Figure 3 : Coopération entre antioxydants endogène et antioxydants exogènes (Benfeito <i>et al.</i> , 2013)	19
Figure 4 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés(Favier, 2003)	20
Figure 5 : Destruction membranaire par attaque des ERO (Pincemail & Defraigne, 2003) ..	21
Figure 6 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier 2003).....	23
Figure 7 : Principales classes de dommages de l'ADN (Frelon, 2001)	25
Figure 8 : Structure de base et structure chimique générale de différents flavonoïdes	31
Figure 9 : Piégeage d'un radical libre par les flavonoïdes	33
Figure 10 : Métabolisme du cuivre dans la cellule en général.(Guiraud <i>et al.</i> , 2008)	38
Figure 11 : Sites de coordination possibles sur la structure de quelques flavonoïdes(Symonowicz & Kolanek, 2012)	41
Figure 12 : Structures chimiques de la quercétine, rutine, (+)-catéchine et de 4 analogues polyméthylés de la quercétine (les parties en gris et gras désignent les unités de coordination bidentées potentielles).	44
Figure 13 : Processus d'ionisation par ESI (Gaskell, 1997).....	47
Figure 14 : Schéma du SM Agilent 6120.	48
Figure 15 : Principe d'un analyseur quadripôle.	49
Figure 16 : Isolement des lymphocytes sur gradient histopaque.....	52
Figure 17 : Titrage spectrophotométriques des complexes ferriques de la 3,5,7-tri-O-méthylquercétine (noté quercétine ^{3'4'} OH).....	57
Figure 18 : Spectres électroniques des complexes ferriques de la quercétine ^{3'4'} OH.	57
Figure 19 : Courbes de distribution des espèces formées lors de la complexation de la quercétine ^{3'4'} OH par le FeNTA.....	58
Figure 20 : Spectre de masse en mode electrospray des complexes ferriques de la quercétine ^{3'4'} OH (noté LH ₂) enregistré en mode négatif en présence de FeNTA.	58
Figure 21 : Evolution de l'absorbance du DPPH (cinétique rapide) en présence de différents volumes de rutine. [DPPH]=125µM, [Rutine]=4mM.	61
Figure 22 : Evolution de l'absorbance du DPPH (cinétique rapide) en présence de différents volumes d'acide ascorbique. [DPPH]=125µM, [acide ascorbique]=4 mM.	61
Figure 23 : Evolution de l'absorbance du DPPH (cinétique lente) en présence de différents volumes de quercétine ^{3'4'} OH. [DPPH]=125µM, [Q ^{3'4'} OH]=1mM.....	62
Figure 24 : Activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH• des flavonoïdes étudiés et du standard acide ascorbique.....	63
Figure 25 : Taux d'hémolyse d'une solution de globules rouges à 5% supplémentés en métaux (400 µM) en absence et en présence de quercétine (100 et 200 µM) à 37°C.	64

Figure 26 : Taux d'hémolyse d'une solution de globules rouges à 5% supplémentés en métaux (400 μ M) en absence et en présence de (+)catéchine (100 et 200 μ M) à 37 °C.	65
Figure 27 : Taux d'hémolyse d'une solution de globules rouges à 5% supplémentés en métaux (400 μ M) en absence et en présence de rutine (100 et 200 μ M) à 37 °C.	65
Figure 28 : Teneurs en GSH d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 μ M) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 μ M) à 37 °C.	67
Figure 29 : Activité de la catalase d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 μ M) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 μ M) à 37 °C.	67
Figure 30 : Activité SOD d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 μ M) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 μ M) à 37°C.	69
Figure 31 : Teneurs en MDA d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 μ M) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 μ M) à 37 °C.	69
Figure 32 :Teneurs en PC d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 μ M) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 μ M) à 37°C.	70
Figure 33 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μ M de Fe ²⁺ pour les différents flavonols étudiés à 37°C et 5% CO ₂	72
Figure 34 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μ M de Fe ²⁺ pour les différents flavanols étudiés à 37°C et 5% CO ₂	72
Figure 35 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μ M de Cu ² pour les différents flavonols étudiés à 37°C et 5% CO ₂	73
Figure 36 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μ M de Cu ² pour les différentes flavanols étudiés à 37°C et 5% CO ₂	73
Figure 37 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μ M de Zn ²⁺ pour les différents flavonols étudiés à 37°C et 5% CO ₂	74
Figure 38 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μ M de Zn ²⁺ pour les différents flavanols étudiés à 37°C et 5% CO ₂	74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes	32
Tableau 2 : Constantes de stabilité des complexes du FeNTA, du Cu et du Zn avec la rutine, la (+)-catéchine, la quercétine et ses analogues O-méthylés. ^a	59
Tableau 3 : Concentrations efficaces (CE _{50±ET}) des flavonoïdes étudiés et du standard (acide ascorbique).	62
Tableau 4 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Fe ²⁺ pour les différents flavonols étudiés	76
Tableau 5 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Fe ²⁺ pour les différents flavanols étudiés	77
Tableau 6 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Cu ²⁺ pour les différents flavonols étudiés.....	79
Tableau 7 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Cu ²⁺ pour les différents flavanols étudiés.....	80
Tableau 8 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Zn ²⁺ pour les différents flavonols étudiés.....	82
Tableau 9 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Zn ²⁺ pour les différents flavanols étudiés	83

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	4
Liste des figures	6
Liste des tableaux	8
Table des matières	9
Introduction	11
Etat de l'art	15
1. Stress Oxydant.....	15
1.1. Génération des ERO	15
1.2. Les défenses anti-oxydantes.....	27
2. Les flavonoïdes	30
3. Les métaux	36
3.1. Le fer.....	36
3.2. Le cuivre	37
3.3. Le zinc.....	39
4. Complexes flavonoïdes-Métaux.....	40
Matériel et méthodes	43
1. Etude physico-chimique	43
1.1. Préparation des solutions :	44
1.2. Titrage des flavonoïdes par le FeNTA, le Cu(II) et le Zn(II) par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis. à pH 7,4	46
1.3. Caractérisation des complexes Flavonoïdes-Métaux par ESI-MS.....	46
1.4. Détermination de l'activité antiradicalaire par piégeage du radical DPPH	49
2. Etudes <i>in vitro</i> sur les globules rouges.....	50
2.1. Préparation des échantillons de globules rouges humains:.....	51
2.2. Test d'hémolyse :	51
3. Viabilité des Lymphocytes <i>in vitro</i> :	51
3.1. Isolement des lymphocytes humains.....	51
3.2. Test de transformation lymphoblastique (TTL).....	52

3.3. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT.....	53
4. Détermination des marqueurs du stress oxydatif	54
4.1. Dosage du glutathion réduit	54
4.2. Dosage de l'activité de la catalase	54
4.3. Dosage de l'activité superoxyde dismutase	54
4.4. Dosage du malondialdehyde (MDA).....	55
4.5. Dosage des protéines carbonylées.....	55
5. Analyse statistique.....	55
Résultats et interprétations	56
1. Absorptions et constantes de stabilité des complexes	56
2. Propriétés antiradicalaires	60
3. Etude <i>in vitro</i> sur les Globules rouges	63
3.1. Test d'hémolyse	63
3.2. Paramètres du stress oxydatif.....	66
4. Etude <i>in vitro</i> sur les lymphocytes	71
4.1. Indice de prolifération.....	71
4.2. Paramètres du stress oxydatif.....	75
Discussion	84
Conclusion.....	92
Bibliographie.....	94
Annexes.....	108

Introduction

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, peut entraîner des dommages cellulaires importants par génération d'espèces réactives oxygénés (ERO). De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont démontré le rôle des ERO dans le développement de plusieurs processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogenèse (Beaudeau *et al.*, 2006; Waris & Ahsan, 2006; Polidori *et al.*, 2007). Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme utilise des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (e.g. la superoxyde dismutase), de vitamines (A, C et E), d'oligoéléments (e.g. le zinc), de protéines (e.g. la ferritine).

En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO. Le stress oxydant survient lorsqu'un déséquilibre dans cette balance prooxydants/antioxydants se produit en faveur des ERO. Plusieurs paramètres peuvent influencer les potentiels antioxydants d'un individu comme les habitudes alimentaires, la consommation d'alcool, les caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit (Durackova, 2010; Tong *et al.*, 2015).

De nombreuses études ont démontré la relation entre les risques de développer des maladies cardiovasculaires ou un cancer et des concentrations sanguines faibles en antioxydants (vitamine A, C ou E), ou des concentrations élevées en marqueurs d'oxydation lipidiques ou de l'oxydation de l'ADN. Ceci justifie pleinement la détermination des marqueurs du stress oxydant chez des personnes avec une alimentation non équilibrée notamment en fruits et légumes qui sont une source importante d'antioxydants (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Les fruits et légumes comme le reste des plantes se distinguent par leur capacité à synthétiser un nombre très important de métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (polyphénols) (Morazzoni, 2014). Les polyphénols sont les composés les plus nombreux avec une diversité structurale remarquable. Les polyphénols (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante. Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et légumes mais également les produits transformés comme le chocolat et le thé (Cheynier *et al.*, 2015).

Introduction

L'effet protecteur des polyphénols a été attribué à leurs propriétés antioxydantes, susceptibles de prévenir des dommages oxydatifs moléculaires et cellulaires induisant diverses pathologies (cancers, diabète de type 2, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives). Si leur pouvoir antioxydant peut s'exercer au niveau du tube digestif, où ils sont largement majoritaires lors de la digestion, leurs effets antioxydants directs au niveau plasmatique sont peu probables *in vivo* en raison de leur faible absorption intestinale et de leur métabolisation intense par l'organisme conduisant à leur élimination plus facile (Roufogalis *et al.*, 2012). En revanche, plusieurs travaux (Nijveldt *et al.*, 2001; M. Zhu & Fahl, 2001) suggèrent que les polyphénols ont la capacité de réguler une diversité de processus cellulaires et moléculaires par interaction avec des cibles protéiques, leur conférant des propriétés anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-carcinogéniques et neuroprotectrices. Les polyphénols sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires impliqués dans le syndrome métabolique (hyperglycémie, taux de lipides élevé, insulino-résistance, obésité et hypertension artérielle) (Amiot *et al.*, 2009).

Cet effet curatif est attribué aux microconstituants des fruits et légumes dont les flavonoïdes sont les principaux représentants. En effet les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres générés par le stress oxydant, mais sont également capables de chélater de nombreux métaux (Ferrali *et al.*, 1997).

L'interaction entre les flavonoïdes et les ions de métaux de transition tels que le fer le zinc et le cuivre, est un sujet d'actualité. Plusieurs études (Ravichandran *et al.*, 2014; Selvaraj *et al.*, 2014a; Kasprzak *et al.*, 2015) ont démontré que le phénomène de chélation des métaux par les polyphénols représente un grand intérêt biologique. Il pourrait jouer un rôle important dans le pouvoir antioxydant des polyphénols. En effet, les ions du fer et du cuivre sont susceptibles d'entrer dans des cycles redox, qui dans des conditions aérobies, produisent des espèces oxygénées réactives ou ERO (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle etc...).

Les polyphénols sont susceptibles d'inhiber ce stress oxydant, non seulement en piégeant les ERO par réduction, mais aussi en formant avec les ions du fer et du cuivre des complexes inertes. Ainsi, les polyphénols sont capables de protéger les lipides polyinsaturés contre les phénomènes d'oxydation générateurs de radicaux et aldéhydes lipidiques responsables du développement des maladies évoquées plus haut (Selvaraj *et al.*, 2014b).

Introduction

Cependant, la complexation métallique des polyphénols peut limiter l'absorption intestinale du fer (effet antinutritionnel) et ainsi favoriser les désordres liés à une carence en fer. Ce phénomène est assez significatif dans les populations des pays en voie de développement dont l'alimentation est pauvre en fer (Baye Yimam, 2013).

Vraisemblablement, les complexes fer-polyphénols formés au cours de la digestion ne sont pas capables de traverser la barrière des cellules intestinales. Les ions du fer ou du cuivre sont susceptibles d'initier l'oxydation à l'air des polyphénols. Ce processus, appelé auto-oxydation, est mal connu et dépend a priori de multiples paramètres : la concentration et la nature des polyphénols et de l'ion métallique, la présence d'agents complexants capables d'entrer en compétition avec les polyphénols, le pH, la température....(Nkhili *et al.*, 2009)

Si la réduction des ERO par les polyphénols est effectivement un mécanisme d'action antioxydante, l'auto-oxydation des polyphénols, potentiellement génératrice d'ERO, peut être une source de toxicité (effet pro-oxydant). En outre, l'auto-oxydation peut être une voie majeure de dégradation des polyphénols au sein d'extraits naturels et de préparations alimentaires, particulièrement au cours de traitements thermiques (procédés technologiques, cuisson) (Nkhili *et al.*, 2009).

Actuellement, grâce au développement des méthodes d'extraction et des techniques d'analyses physico-chimiques et biologiques, une meilleure connaissance de la composition des plantes d'importance alimentaire et des aliments qui en dérivent, est possible. La recherche d'extraits végétaux riches en molécules à fort pouvoir antioxydant et l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques comme les complexes métalliques de polyphénols s'impose en tant qu'alternative aux traitements conventionnels parfois inefficaces et souvent toxiques pour les cellules.

C'est dans ce contexte que la présente étude a été mise en place. Notre travail comporte trois axes principaux.

- Le premier axe porte sur l'étude des interactions entre trois flavonoïdes de l'alimentation et quatre flavonoïdes de synthèse avec les ions du fer du cuivre et du zinc. Des études physico-chimiques sur la stabilité et le pouvoir antioxydant ont été réalisées sur trois flavonoïdes abondants dans l'alimentation et représentatifs des principales classes : la catéchine (flavanol ou tanin monomérique), la quercétine (3,3',4',5,7- pentahydroxyflavone) et la rutine (un glycoside de la quercétine) et sur des

Introduction

dérivés méthylés de la quercétine, afin de déterminer la relation entre la structure du flavonoïde et son pouvoir antioxydant ainsi que les sites de chélation potentiels de ces composés.

- Le second axe est focalisé sur les effets *in vitro* d'une surcharge en métaux en présence et en absence de flavonoïdes sur une solution de globules rouges. On s'est intéressé à l'effet hémolytique des métaux sur les globules rouges, ainsi qu'aux interactions entre ces métaux et les flavonoïdes. On a également évalué les paramètres du statut oxydant (Protéines carbonylées et Malondialdéhyde) et d'autres paramètres du statut antioxydant (Glutathion réduit, activité de la catalase et de la superoxyde dismutase).
- Dans le troisième et dernier volet notre attention a porté sur un deuxième modèle cellulaire le lymphocyte. On a entrepris une autre étude *in vitro* pour évaluer l'effet des métaux précédemment cités et ces cellules. Nous avons choisi dans cette partie de d'élargir notre gamme de flavonoïdes en testant également l'épicatéchine et l'épigallo-catéchine-gallate deux membres importants de la famille des flavanols.

Etat de l'art

1. Stress Oxydant

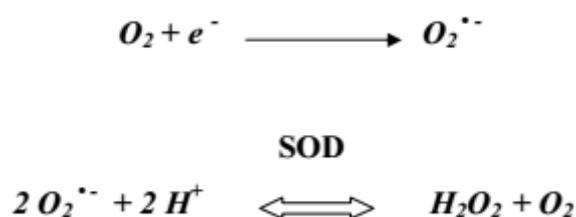
1.1. Génération des ERO

L'oxygène est une molécule indispensable à la vie des organismes dits aérobies qui utilisent des réactions d'oxydoréduction reposant sur des interactions entre donneurs d'électrons (réducteurs) et des accepteurs d'électrons (oxydants).

L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée avec la production d'adénosine triphosphate (ATP)

Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est cependant pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) (*Figure 1*) particulièrement réactionnelles (Koppenol, 2001). Dans une première étape, le radical libre anion superoxyde est formé, ce qui conduit par la suite à la production d'autres ERO comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux, des dérivés nitrés, ...

Si l'anion superoxyde est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, que ce soit spontanément ou en présence d'une dismutase, phénomène au cours duquel l'anion superoxyde dismute en eau oxygénée :



La réaction de Fenton est initiée suite à la formation initiale de l'anion superoxyde qui est à l'origine du phénomène radicalaire car en donnant le peroxyde d'hydrogène il peut alors se transformer en radical hydroxyle :



Etat de l'art

Le peroxyde d'hydrogène est susceptible de réagir avec le radical superoxyde en donnant également le radical hydroxyle selon la réaction de Haber-Weiss :



La durée de vie des radicaux libres est très courte (10^{-4} s). Ils sont instables et très réactifs car ils cherchent un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire. Ceci se fait au coût de la création d'un nouveau radical libre et alors une propagation en chaîne a lieu (Milane *et al.*, 2004).

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses anti-oxydantes. L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile. Les systèmes de régulation se composent d'enzymes (superoxyde dismutases (SODs), catalase, glutathion peroxydases (GPx's), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine...), de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone, ...) et d'oligoéléments (Pincemail & Defraigne, 2003).

En effet, certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu,Zn-SOD, MnSOD, SeGPx). Le zinc est également un inducteur des métallothionéines (Coyle *et al.*, 2002), protéines à activité antioxydante et un inhibiteur des réactions de production d'ERO induite par le cuivre.

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'endonucléases de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail *et al.*, 2002).

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en flavonoïdes (quercétine, rutine, resvératrol, pycnogénol) qui se retrouvent en grande quantité dans le vin rouge, le thé vert, les légumes et dans des extraits de Ginkgo biloba, de myrtille et d'algues marines (Aviram & Fuhrman, 2002).

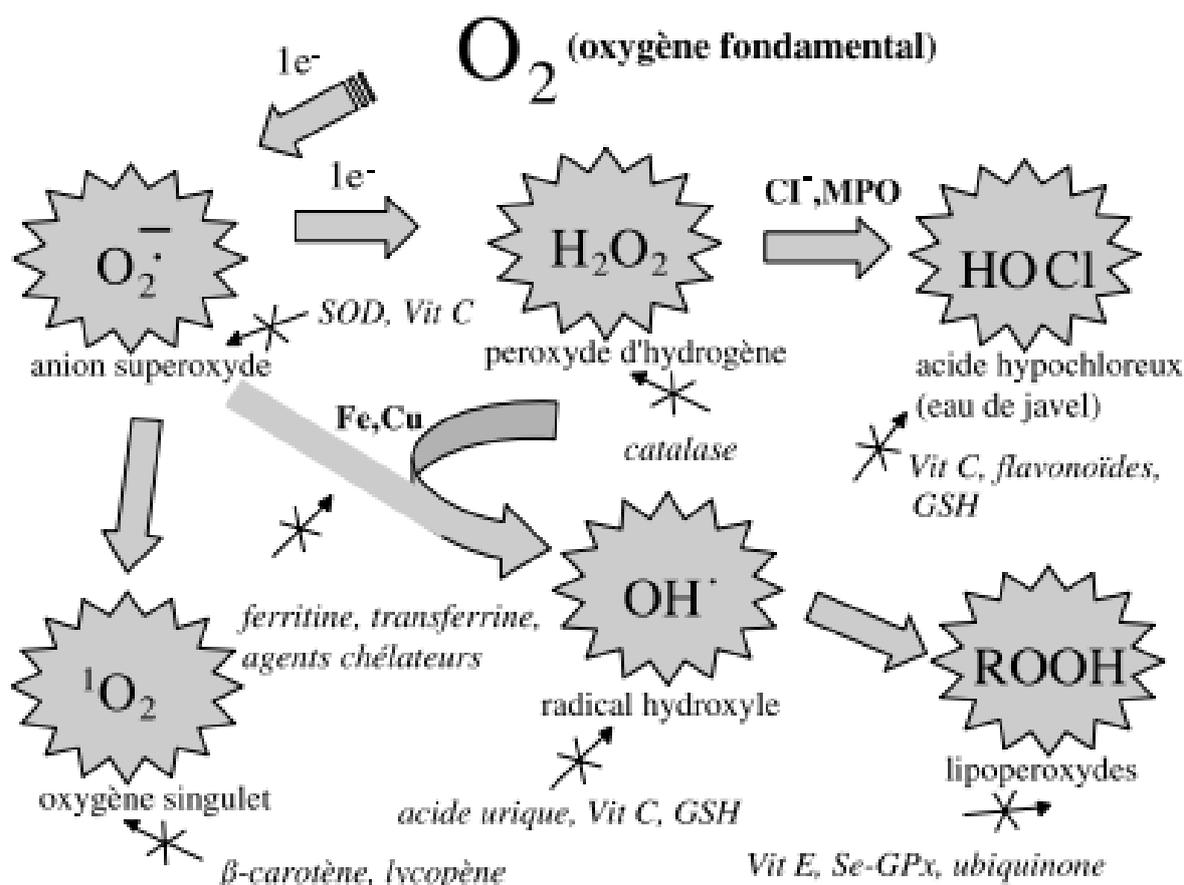


Figure 1 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail *et al.*, 2002)

Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers menant à l'installation de plusieurs pathologies (Gutteridge & Quinlan, 1992).

Ce stress oxydant (*Figure 2*) peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (vieillesse), d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...) (Curtin *et al.*, 2002)

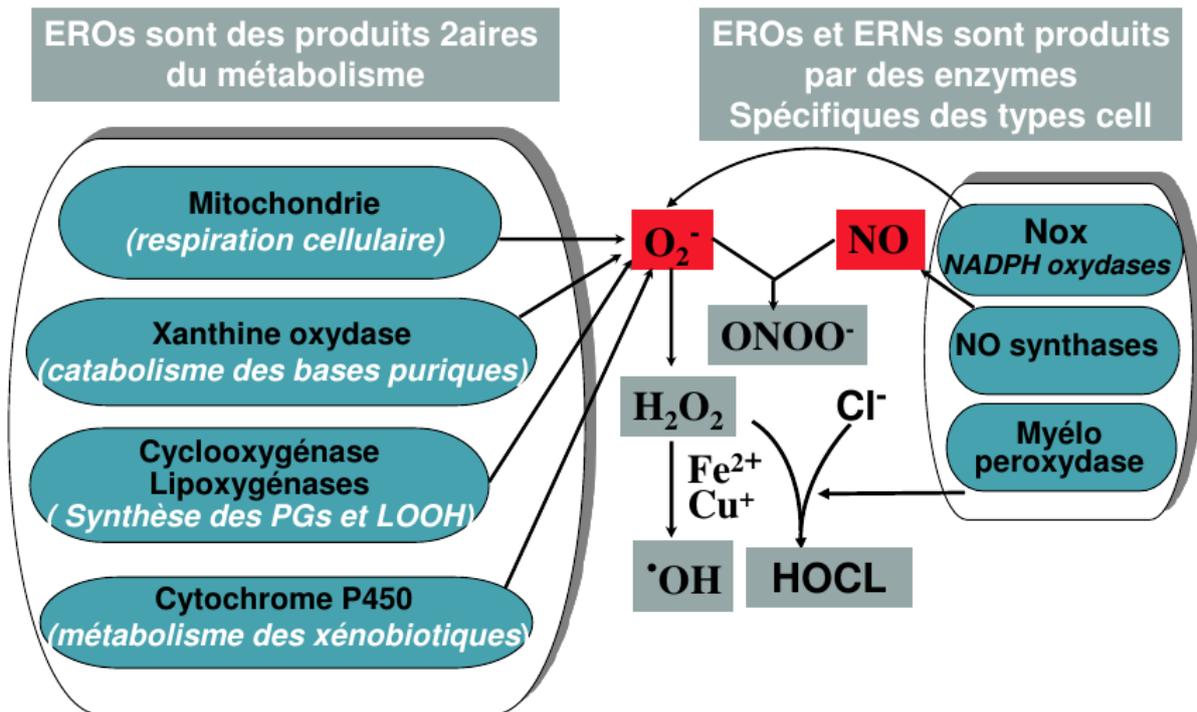


Figure 2 : Production des Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote au cours du métabolisme (Sergent *et al.*, 1997)

De part leur nature instable, les ERO sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants (*Figure 3*). Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule (Nzengue *et al.*, 2008).

Les métaux comme le cuivre et le fer ont été largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène par OH^\cdot ou $O_2^{\cdot-}$ à des esters d'acides gras insaturés isolés ou constituants des membranes lipidiques (Ercal *et al.*, 2001; Tweeddale *et al.*, 2007).

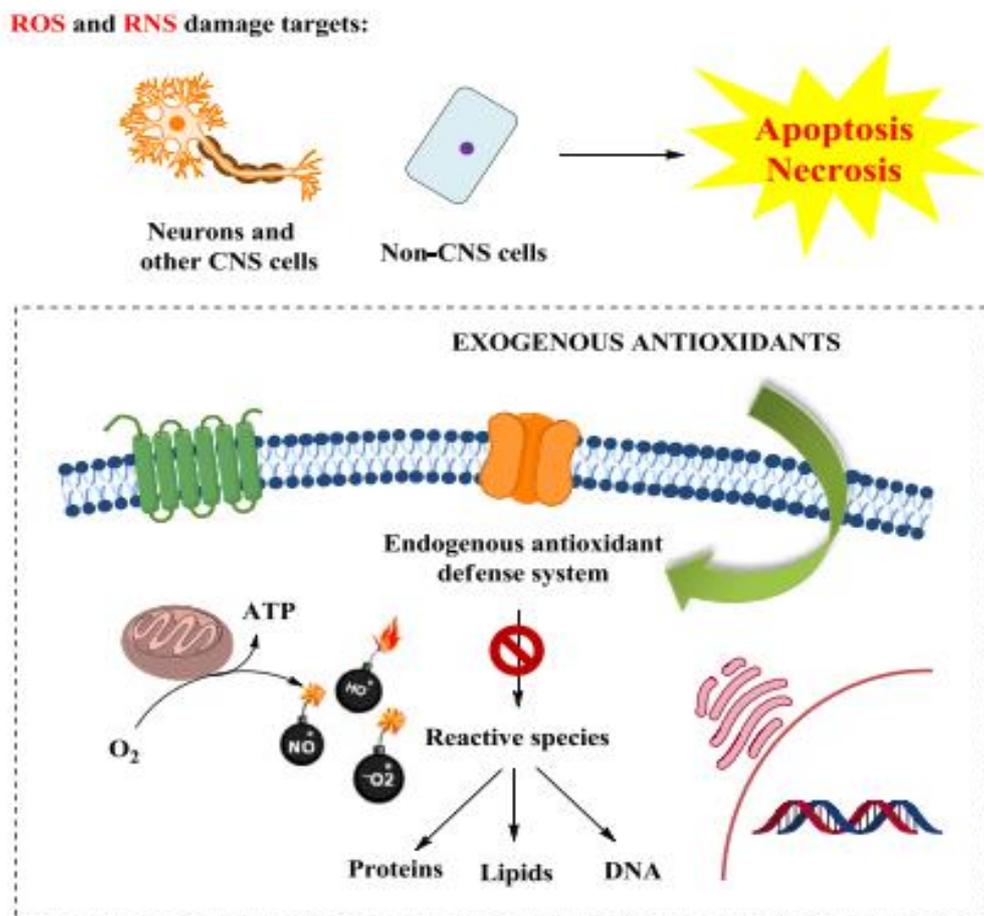


Figure 3 : Coopération entre antioxydants endogène et antioxydants exogènes (Benfeito *et al.*, 2013)

Le radical carboné du constituant lipidique tend alors à se stabiliser par un réarrangement conduisant au diène conjugué (*Figure 4*). Celui-ci réagit avec l'oxygène moléculaire et forme un radical peroxyde, lui-même susceptible d'arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras. Un nouveau radical lipidique est ainsi généré, maintenant la réaction en chaîne. Il se produit ainsi des hydroperoxydes de lipides.

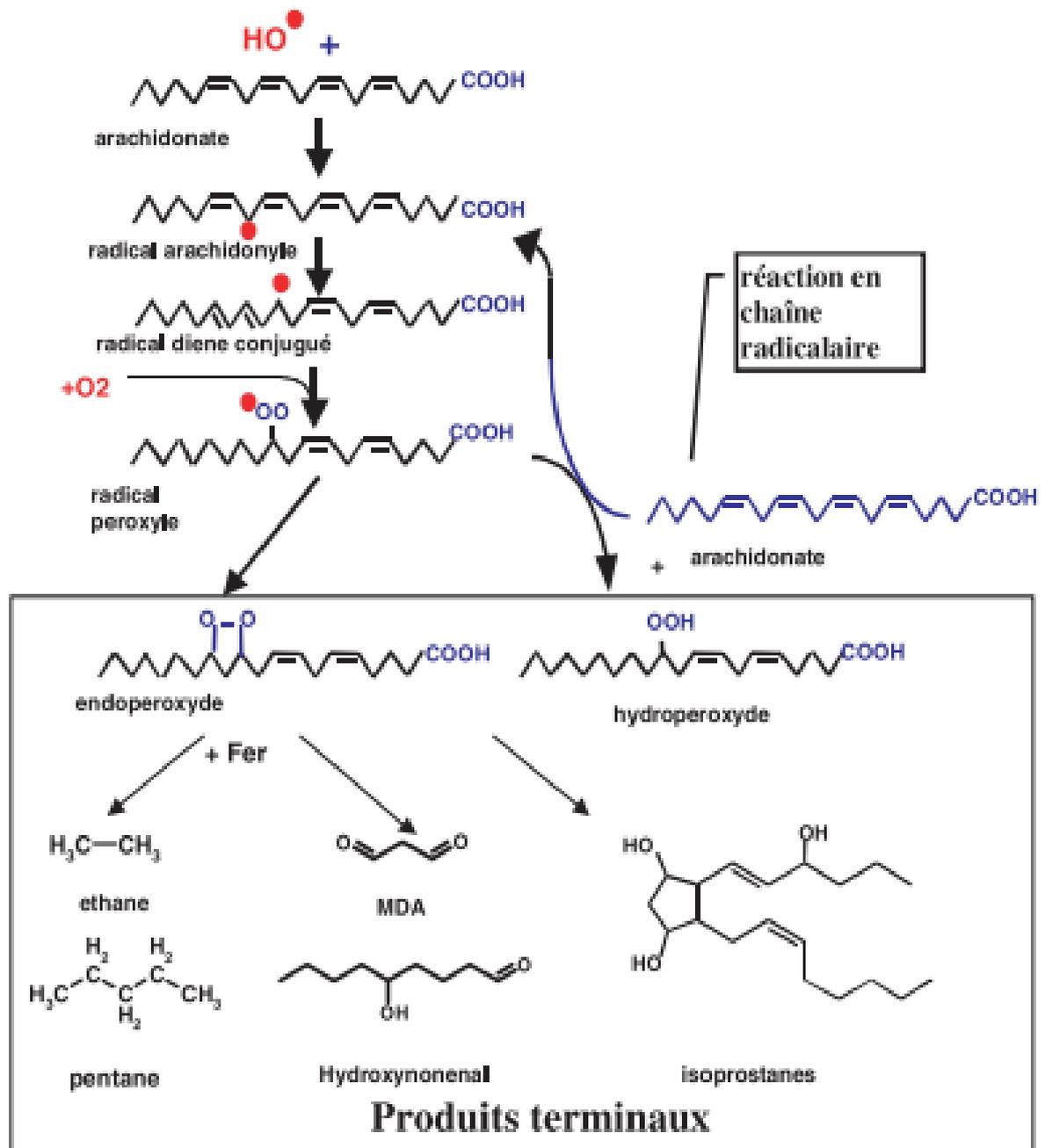


Figure 4 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)

Etat de l'art

Les hydroperoxydes lipidiques sont peu stables dans les conditions physiologiques et de nombreux composés (métaux de transition, leurs complexes et des molécules telles que les hémoprotéines...) catalysent leur décomposition (Esterbauer *et al.*, 1991; Marnett, 1999).

Un des principaux produits de dégradation est le malonedialdéhyde (MDA) qui altère la fluidité et la fonction des membranes, dont la composition en acides gras insaturés module l'oxydabilité (Chen *et al.* 1994). Ce produit est détecté grâce à l'acide thiobarbiturique (formation de thiobarbituric acid reactants ou TBARs) (Hermann *et al.*, 2015). On attribue par ailleurs aux peroxydes lipidiques un rôle toxique par réaction avec les thiols ou amines des protéines cellulaires et un rôle mutagène.

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques ou d'autres éléments contenant des lipides (*Figure 5*). Il apparaît une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane ainsi qu'une inactivation de récepteurs et d'enzymes membranaires. Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules. Le cerveau est un organe cible de la peroxydation lipidique car il est très riche en acides gras polyinsaturés.

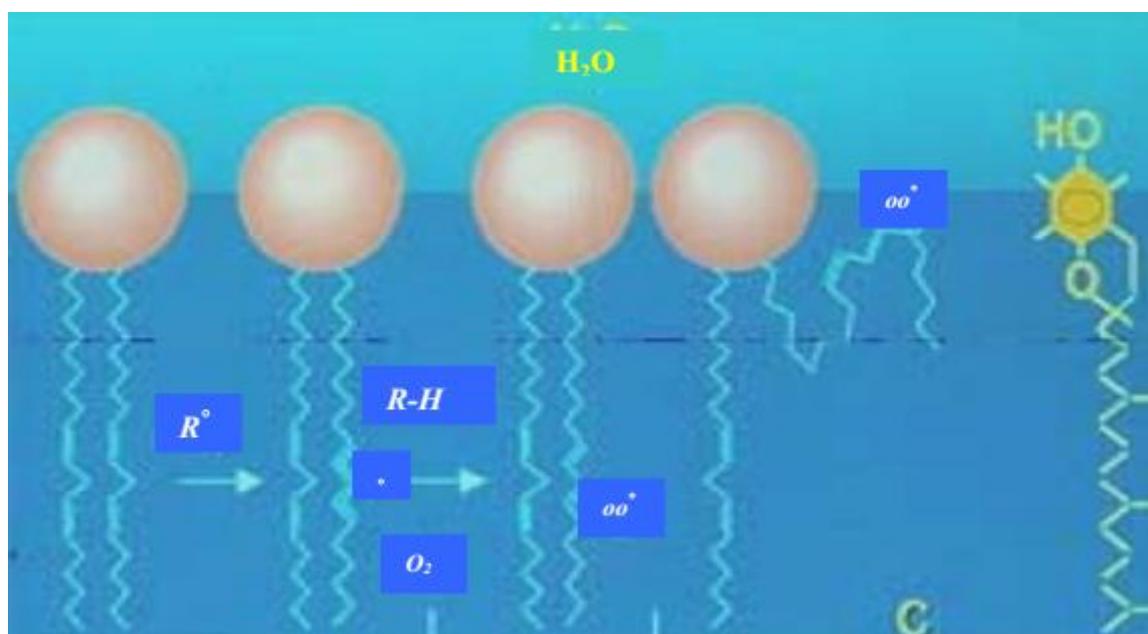


Figure 5 : Destruction membranaire par attaque des ERO (Pincemail & Defraigne, 2003)

Etat de l'art

La production de MDA et sa réaction avec l'ADN pour former les adduits mutagènes fournissent un lien entre la peroxydation lipidique et les pathologies. Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Blair, 2001). Le MDA peut réagir avec les bases de l'ADN. En effet, les atomes de carbone des deux liaisons carbonyle du MDA sont électrophiles ; ils peuvent réagir avec les atomes nucléophiles de la guanine, de l'adénine et de la cytosine (Falletti *et al.*, 2007).

La réaction du MDA avec les atomes d'azote de la guanine (dG) permet la formation de plusieurs types d'adduits parmi lesquels on trouve l'adduit pyrimidopurinone, M1G (ou PyP). Les interactions de l'adénine ou de la cytosine (dA et dC) avec un des équivalents carbonyles du MDA forment des adduits oxopropenyles (M1A et M1C). Cependant, la production de l'adduit M1G est 5 fois supérieur aux quantités de M1A ou M1C (Niedernhofer *et al.*, 2003).

Le stress oxydant touche également les protéines (*Figure 6*) qui subissent des modifications oxydatives notamment les acides aminés soufrés et les acides aminés aromatiques, entraînant des modifications structurales, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases (Squier, 2001).

Ces modifications s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus et altèrent la fonction des organes (Levine & Stadtman, 2001). L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols. Ces altérations concernent particulièrement les enzymes antioxydantes qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH). L'intégrité des membranes cellulaires est également menacée par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (Gruber *et al.*, 2006) (récepteurs ou enzymes). Ces protéines, en perdant leurs propriétés biologiques, deviennent très hydrophobes et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

Les carbonyles sont utilisés comme un marqueur de l'oxydation des protéines et de façon générale comme un marqueur du stress oxydant. La réaction entre les produits carbonylés et la 2-4-dinitrophénylhydrazine conduit à la formation de 2-4-dinitrophénylhydrazones. Celles-ci peuvent être mesurées par spectrophotométrie ou par immunochimie (Augustyniak *et al.*, 2015).

Etat de l'art

Des études suggèrent que les radicaux alcoyle dérivés des protéines sont à l'origine des pontages avec les bases de l'ADN alors que les radicaux peroxyde engendrent des dommages oxydatifs. Cet exemple de l'endommagement de l'ADN par les radicaux de protéines et des lipides illustre la notion d'effets génotoxiques indirects du stress oxydant. Ce n'est plus l'ADN la cible initiale, mais une autre biomolécule dont la dégradation conduit à des dommages de l'ADN (Shacter, 2000; Stadtman & Levine, 2000).

Les sucres sont également touchés par les attaques des ERO (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} ou des radicaux peroxydes d'AG), avec abstraction d'hydrogène au niveau d'une des liaisons CH-OH. Le radical alkyle ($\cdot C-OH$) ainsi formé se combine immédiatement avec de l'oxygène pour former un carbonyle ($C=O$) et expulser un radical hydroperoxyde ($\cdot OOH$). L'opération se prolonge jusqu'à former un composé dicarboxylé (Spiteller, 2006).

Par auto-oxydation des sucres comme le glucose des composés dicarboxylés sont formés (contenant deux $C=O$), dont les plus connus sont les glyoxal et les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines par réaction de Maillard et altérer les propriétés chimiques de celles-ci. Ceci a été démontré chez des diabétiques et a été corrélé avec la sévérité de la maladie au travers des protéines glycosylées (Glomb & Monnier, 1995).

La glyco-oxydation des sucres et la glycation des protéines a également été mise en évidence dans les agglomérats de protéines caractéristiques de certaines maladies neurodégénératives (Sayre *et al.*, 2004).

Enfin dernière molécules touchée par les ERO, l'ADN peut être endommagée de différentes façons (*Figure 7*). On peut noter quatre classes principales de dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN (Hayakawa *et al.*, 1991), les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques. La *Figure 7* illustre ces différents dommages.

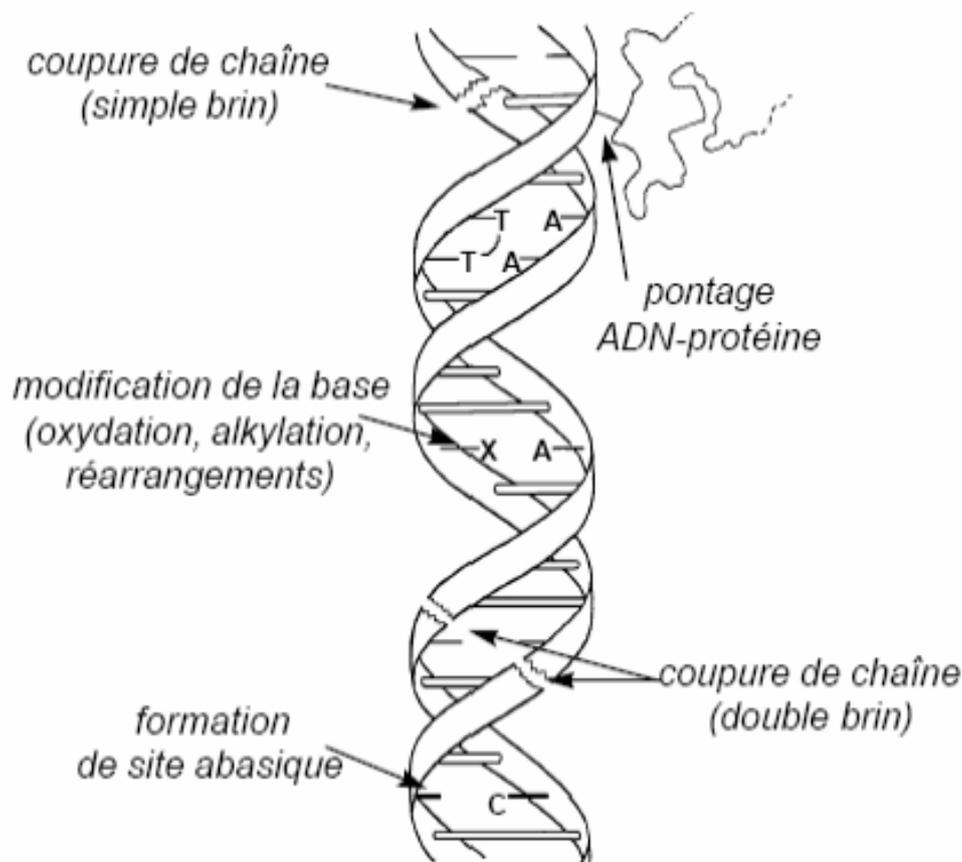


Figure 7 : Principales classes de dommages de l'ADN (Frelon, 2001)

Les modifications peuvent être dues à l'attaque des radicaux hydroxyles sur le cycle aromatique des pyrimidines. Le radical OH^\bullet est très électrophile et donc s'additionne préférentiellement en position 5 du cycle de la thymine et la cytosine. Il existe également une réaction minoritaire d'addition en position 6. Cette addition conduit à la formation des radicaux 5-hydroxy-6-yle ou 6-hydroxy-5-yle. Le radical OH^\bullet peut également réagir avec le groupement méthyle de la thymine en arrachant un atome d'hydrogène, conduisant à la formation d'un radical allylique.

Ces radicaux formés vont réagir avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes. Ceux-ci sont transformés en hydroperoxydes par dismutation s'ils le peuvent ou après une étape de réduction par un agent réducteur pouvant être le radical superoxyde, suivie d'une réaction de protonation ($\text{RO}_2^\bullet \rightarrow \text{RO}_2\text{H}$). Les hydroperoxydes, qui ont été isolés et caractérisés dans le cas de la thymidine (Tremblay *et al.*, 1999) et de la 2'-désoxycytidine, sont instables, particulièrement en présence de métaux de transition. Leur décomposition conduit à la formation de divers produits stables dont les diols et les uréates. Les réactions d'oxydation à

Etat de l'art

un électron qui impliquent uniquement la formation du radical cation pyrimidique conduisent à des produits finaux stables qui sont identiques à ceux générés par l'action du radical hydroxyle. Les rendements relatifs de formation sont très différents car la formation du radical cation des bases ne correspond pas au mécanisme principal dans le cas d'une attaque par HO°. Parallèlement, l'addition d'électrons a été observée et peut conduire, en l'absence d'oxygène, à la formation de radicaux 5,6-dihydropyrimid-5-yle. Ces radicaux peuvent être réduits ou oxydés pour donner respectivement les 5,6-dihydropyrimidines, et la base normale. Dans ces mêmes conditions anoxiques, les radicaux 5-hydroxy-6-hydropyrimid-6-yle et 6-hydroxy-5-hydropyrimid-5-yle sont les précurseurs des produits stables monohydroxylés

Les bases puriques sont elles plus sensibles aux espèces réactives de l'oxygène, en particulier la guanine. Le premier mécanisme conduisant à la formation de 8-OHdG à partir de la guanine implique l'arrachement d'un électron à la guanine et la formation d'un cation radical. Le radical ainsi formé peut s'hydrater pour générer un radical neutre intermédiaire ou peut perdre un proton pour donner naissance à un radical neutre oxydant. Le radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguan-7-yle produit par la réaction d'hydratation pourra être oxydé ou réduit pour conduire respectivement à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OHdG) et de la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) (Cadet *et al.*, 2001).

D'autre part, le radical oxydant formé par déprotonation du cation radical de la guanine est le précurseur de l'oxazolone (Cadet *et al.*, 2001).

Dans ce phénomène, l'importance du radical hydroxyle a été démontrée. En effet, l'addition du radical HO° en position 8 de la guanine conduit à la formation de la 8-OHdG et des FapyGua par l'intermédiaire du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguan-7-yle. Enfin, l'autre mécanisme de formation est celui qui met en jeu l'oxygène singulet. L'oxygène singulet conduit spécifiquement à la formation de la 8-OHdG. A l'inverse du radical hydroxyle, qui peut interagir avec l'ensemble des bases, l'oxygène singulet réagit avec la guanine uniquement (Cadet *et al.* 2001). L'oxygène singulet réagit avec la guanine par addition [4 + 2] sur les positions 4 et 8 du cycle purique ce qui forme un endoperoxyde. Cet endoperoxyde conduit à la 8-hydroperoxy-7,8-dihydroguanine qui peut être réduit en 8-OHdG (Valko *et al.*, 2006). La mesure de la 8-OHdG est aujourd'hui utilisée comme biomarqueur du stress oxydant sur l'ADN. De plus le développement de nouvelles techniques de dosages notamment

par HPLC-MS/MS permet de mesurer spécifiquement les différents types de dommages après hydrolyse de l'ADN (Collins, 2000).

Une catégorie majeure de dommages oxydatifs de l'ADN est représentée par les cassures simple brin qui résultent principalement de l'arrachement initial par le radical HO[•] d'un atome d'hydrogène sur le résidu 2-désoxyribose en positions C3, C4 ou C5 et à un degré moindre sur le carbone 2. L'arrachement d'un atome d'hydrogène en position 1 du 2-désoxyribose par HO[•] conduit à la formation de 2-désoxyribonolactone. Cette lésion que l'on peut considérer comme un site abasique oxydé est susceptible de former un lien covalent avec plusieurs enzymes de réparation de l'ADN (Roupioz *et al.*, 2002).

Ces différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autres dans les phénomènes de cancérisation (Feng *et al.*, 2003). En effet, la 8-OHdG est considérée comme une lésion pré-mutagénique car elle peut conduire, en l'absence de réparation, à une transversion GC → TA (Bohr, 2002).

De très nombreuses études ont donc étudié l'effet que le stress oxydant pourrait avoir dans l'initiation et le développement des cancers. Il a vite été démontré que l'existence d'un stress oxydant chez les malades peut être à la fois due à l'effondrement des défenses antioxydantes et à l'augmentation des produits issus du stress oxydant. En effet, des dérivés d'oxydation de l'ADN (preuve de l'existence d'un stress oxydant) sont retrouvés dans le sang et les tissus des malades cancéreux (Nakabeppu, 2014). Le malondialdéhyde est retrouvé en quantité importante dans le sang des enfants cancéreux (Khoubnasabjafari *et al.*, 2016). L'activité de l'enzyme Mn-SOD est augmentée dans la muqueuse des malades atteints d'adénocarcinome de l'estomac, sans doute en réaction à la présence excessive des ERO (Jansen *et al.*, 2000).

1.2. Les défenses anti-oxydantes

L'organisme possède un arsenal important pour se défendre contre les agressions causées par le stress oxydant. Des enzymes comme les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT), les glutathions peroxydases (Gpx), appuyées par l'action des enzymes glutathions réductases (GR) et glucose-6-phosphate déshydrogénases, font partie du système de défense contre les ERO.

Etat de l'art

La SOD décompose 2 molécules de superoxyde en O_2 et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) moins toxiques. Le H_2O_2 sera à son tour transformé en O_2 et H_2O par la catalase; ou en H_2O par la glutathion peroxydase, qui désintoxique le H_2O_2 , avec l'aide du glutathion réduit (GSH). Le glutathion réduit, sert de substrat à la Gpx pour former du glutathion oxydé (GSSG) et un oxydant désactivé par réduction. Avec l'aide d'une glutathion réductase et de $NADPH + H^+$, le GSH sera régénéré à partir du GSSG. En plus d'éliminer directement les ERO, les enzymes antioxydants participent à la régulation du stress oxydant. L'activité des enzymes antioxydants dépend de cofacteurs minéraux, qui sont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe), et sont qualifiés d'antioxydants non enzymatiques indirects (Elosua *et al.*, 2003; Sayre *et al.*, 2004; Vergani *et al.*, 2004).

Bien qu'elle soit à l'origine de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la superoxyde dismutase a un effet antioxydant; en son absence, les singulets d'oxygènes et les peroxy-nitrites augmentent, pendant que les réducteurs cellulaires (vitamine C, les GSH et le NADPH) diminuent (Sayre *et al.*, 2004).

Le Cu et le Zn font partie des SOD cytosoliques et le Mn fait partie des SOD mitochondriales. Il existe aussi des SOD extracellulaires. Le ratio plasmatique de Cu/Zn est important pour l'activité de la SOD et la diminution des cofacteurs enzymatiques entraînent une baisse de l'activité des SOD (Finaud *et al.*, 2006). La SOD en plus de la dismutation du superoxyde, est également efficace contre les peroxy-nitrites et agira plutôt à niveau intracellulaire (Finaud *et al.*, 2006).

La glutathion peroxydase (Gpx) est une enzyme antioxydante du plasma, des fluides extracellulaires et du cytosol, dépendante du sélénium et dont l'action permet d'éliminer le H_2O_2 produit, de façon à éviter sa participation comme pro-oxydant. Elle convertit aussi les hydroperoxydes lipidiques en des alcools non toxiques et de ce fait participe à l'interruption de la chaîne de peroxydation lipidique. La consommation du sélénium est souvent insuffisante dans les pays développés, ce qui induit une diminution de l'activité des enzymes Se-dépendants. L'action des Gpx dépend aussi de la disponibilité en GSH, GR et en NADPH, ce qui démontre bien que le système antioxydant endogène agit en interdépendance (Sies, 1997; Sayre *et al.*, 2004).

Etat de l'art

La catalase (CAT) est une enzyme dépendante du Fe, qui entre en compétition avec la Gpx pour l' H_2O_2 , son utilisation devient importante quand les quantités d' H_2O_2 sont élevées (Finaud *et al.*, 2006).

Il existe également des mécanismes de défense non enzymatique basés sur des molécules de petite taille comme le glutathion réduit (GSH) Le GSH est formé à base d'un tripeptide ($\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$ ou acide glutamique-cystéine-glycine). Sous l'action de la Gpx il désintoxique les ERO (H_2O_2 , peroxy-nitrites, peroxydes lipidiques, ...) en formant du GSSG (glutathion oxydé) composé de deux molécules de GSH (Douris *et al.*, 2009). Le GSH est un antioxydant abondant dans l'organisme où il joue un important rôle de protection des tissus et des protéines transporteuses d'ions redox actifs comme l'hémoglobine, la transferrine, la ferritine, l'albumine. Le GSH est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées. Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic,...) (Patrick, 2006).

L'acide urique autre molécule anti-oxydante est le produit final du métabolisme des purines. Il augmente dans le plasma lors d'efforts physiques intenses, ou lors d'une hypoxie (Baillie *et al.*, 2007). et il pourrait contribuer à 35-60% de la capacité antioxydante totale (Johnson *et al.*, 2009). L'acide urique oxydé peut être régénéré par la vitamine C.

De plus l'organisme peut compter sur de nombreuses molécules anti-oxydantes d'origine alimentaire. Les vitamines E et C sont de puissants antioxydants.

La vitamine E peut être stockée dans nos graisses corporelles et dans les membranes de nos cellules (qui sont composées de lipides) où elle est particulièrement rapide pour désamorcer les radicaux libres. La vitamine E a la particularité de pouvoir être régénérée après son oxydation par un radical libre. En effet, le glutathion et la vitamine C réagissent avec les tocophérols oxydés pour les régénérer en tocophérols actifs, prêts à stopper une nouvelle attaque radicalaire (Nagaoka *et al.*, 2007).

Les polyphénols ; molécules présentes abondamment dans les plantes ; ont des structures chimiques extrêmement variées. La diversité de ces phytonutriments et leurs nombreuses propriétés sont telles que la communauté scientifique s'y est intéressée de manière de plus en plus importante ces dernières années, notamment dans la prévention des maladies provoquées par le stress oxydatif. Les flavonoides, les lignanes, les stilbènes et les

tannins sont des polyphénols. On les trouve naturellement dans les fruits et légumes et plus particulièrement dans le soja, le raisin, la pomme, la myrtille ainsi que dans le thé.

2. Les flavonoïdes

Les composés polyphénoliques des végétaux constituent un groupe d'une très grande diversité dont les flavonoïdes font partie.

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. Ce groupe de composés est en effet défini par une structure générale en C15, caractérisée par un enchaînement C6-C3-C6 (*Figure 8*). Ils peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (Di Carlo *et al.*, 1999)

Les flavonoïdes comprennent les flavonoïdes "stricto sensu", composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2 alors que les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes ((Bruneton, 2009). Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue :

- les flavones et les flavonols
- les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols.

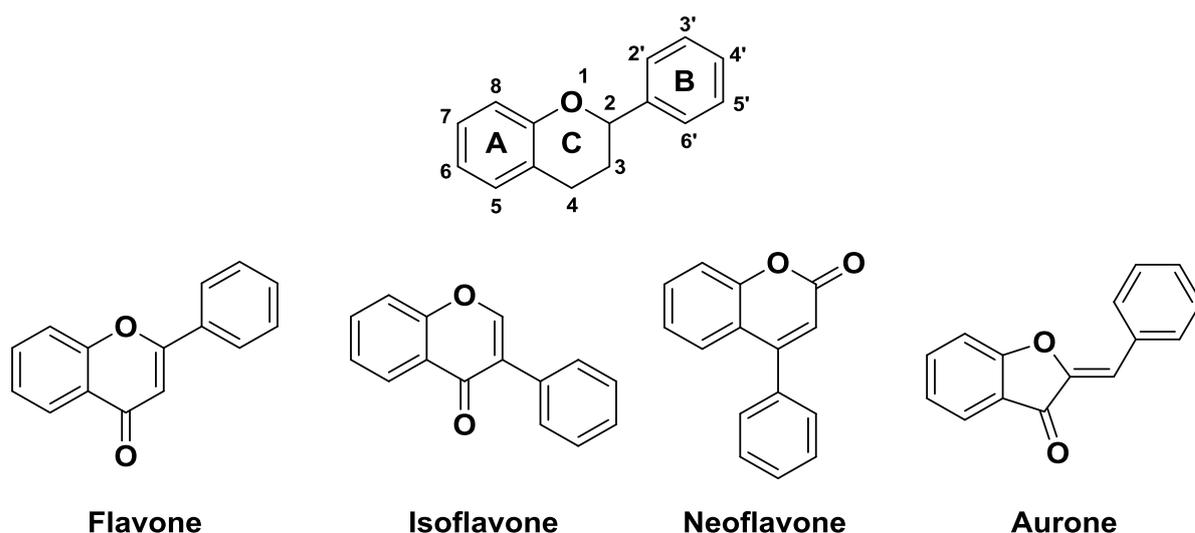


Figure 8 : Structure de base et structure chimique générale de différents flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (Iwashina, 2000).

Flavones et flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine. Les flavanones (naringénine) et les flavanols (catéchine) ainsi que les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte

Le *tableau 1* représente la distribution des principaux flavonoïdes retrouvés dans les fruits et légumes.

Etat de l'art

Tableau 1 : Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes (Chebil et al., 2006)

Famille	Molécules principales	Distribution
Flavone	apigénine, lutéoline, chrysin	pomme, céleri, grains de céréale, (teneur = 5-100 mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), <i>Petroselinum sativum</i> , <i>Apium graveolens</i> ...
Flavanone	hespéritine, naringine, taxifoline	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg) <i>Eucalyptus globulus</i>
Flavonol	quercétine, myricétine et kaempférol	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg) <i>Pueraria labata</i> , <i>Stellaria media</i>
Isoflavones	génistéine et daidzéine	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) <i>Vitis vinifera</i>
Flavan-3-ol	(+)-catéchine, (-)-épicatéchine (-)-épigallocatechine et leurs esters de gallate	fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)
Anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH^\bullet), anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :

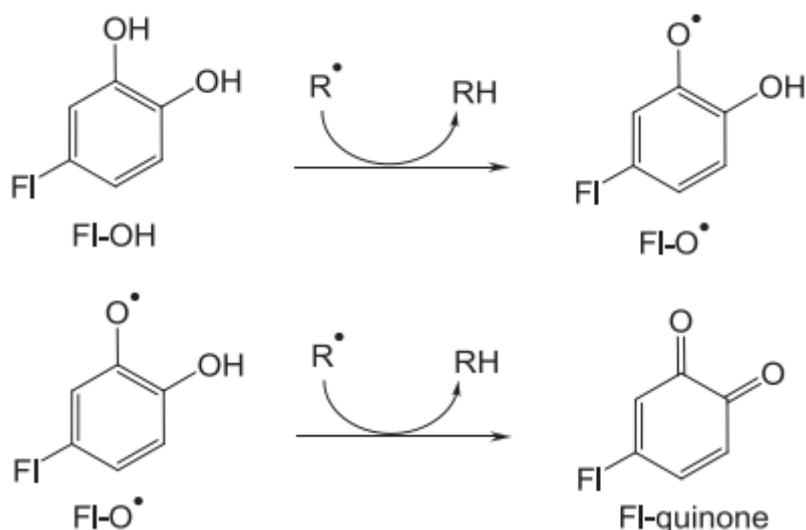


Figure 9 : Piégeage d'un radical libre par les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leurs groupements hydroxyles fortement réactifs. Ils sont également doués d'une activité chélatrice envers les ions métalliques (notamment libérés par les protéines de fixation ou de transport endogènes).

Les capacités antioxydantes des flavonoïdes sont nettement supérieures à celles des vitamines. Les flavonoïdes sont capables de neutraliser les radicaux libres directement par donation d'atome d'hydrogène. Les radicaux sont ainsi inactivés suivant la réaction *Figure 9*. Les activités *in vitro* des flavonoïdes dépendent du positionnement des groupements fonctionnels au niveau de sa structure. La configuration et le nombre de groupements hydroxyles influencent de manière conséquente l'activité anti-oxydante (Heim *et al.*, 2002).

La configuration des hydroxyles du cycle B est le paramètre le plus important pour l'activité anti-oxydante (Burda & Oleszek, 2001). Les substitutions au niveau du cycle A n'ont-elles que peu d'impact sur le piégeage du radical superoxyde par exemple (Amic *et al.*, 2007).

Etat de l'art

L'activité *in vitro* est augmenté suite à la polymérisation de monomères de flavonoïdes comme les tannins ou les polymères de catéchines ce qui est dû au nombre élevé de groupements hydroxyles présents dans la structure.(Lotito *et al.*, 2000).

La glycosylation des flavonoïdes réduit en général le pouvoir antioxydant *in vitro* par rapport à l'aglycone (B. Mishra *et al.*, 2003; Cavia-Saiz *et al.*, 2010).comme il a été observé pour plusieurs paires de flavonoïdes aglycone et génine (Quercétine/Rutine ; Hespéretine/Hespéridine...). En effet, l'ajout d'un sucre dans la structure de la quercétine diminue significativement sa capacité à neutraliser l'anion superoxyde(Sun *et al.*, 2010) et sa capacité à réduire le Fe(III) en Fe(II) (test du FRAP) (Firuzi *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes sont doués de nombreuses autres propriétés dont l'une des plus importantes est la capacité d'inhiber de nombreuses activités enzymatiques notamment celles de l'aldose réductase (Fernández *et al.*, 2005), de la phospholipase A2 (Kim *et al.*, 2001) et des enzymes de l'inflammation : la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase (Chi *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes inhibent les enzymes responsables de la formation de l'anion superoxyde comme la xanthine oxydase et la protéine kinase C (Ursini *et al.*, 1994). Les flavonoïdes exercent également une activité inhibitrice *in vitro* envers la production de NO (monoxyde d'azote) dans de nombreuses lignées cellulaires. Le NO est produit par oxydation de la L-Arginine réaction catalysée par la NO synthase. Le NO est un composé essentiel pour le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins, mais à grande concentration il peut être source de stress oxydant (Huk *et al.*, 1998). Le NO est toxique suite à la formation de peroxydinitrite après combinaison avec $O_2^{\cdot -}$ (Rubbo *et al.*, 1994).

Cet effet s'exerce probablement par inhibition de l'expression de la NO synthase et non par inhibition de son activité. L'apigénine, la diosmétine,et la lutéoléine sont parmi les flavones qui ont montré l'activité inhibitrice la plus élevée envers la NO synthase (Olszanecki *et al.*, 2002). Les flavonoïdes sont également capables de piéger l'anion superoxyde et le peroxydinitrite directement grâce au groupement catéchol en position 3' et 4' (Carocho & Ferreira, 2013).

Les flavonoïdes peuvent également activer les enzymes antioxydantes. Notamment en régulant l'expression des gènes des enzymes de détoxification de la phase II (glutathion S-transferase, et UDP-glucuronosyl transferase), qui sont la principale ligne de défense contre les molécules électrophiles (Nerland, 2007). Les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux

possédant un groupement hydroxyle en position 3 sur le cycle C comme la quercétine et la myricétine.

Un autre rôle essentiel des flavonoïdes est la régénération de l' α -tocophérol un anti-oxydant majeur au niveau de la membrane cellulaire et pour les LDL (Hirano *et al.*, 2001). Hirano *et al* ont suggéré que les flavonoïdes agissent en donneur d'hydrogène pour le radical α -tocophéryl qui est un pro-oxydant potentiel. De plus en interagissant avec l' α -tocophéryl, les flavonoïdes retardent l'oxydation des LDL. Les catéchines en effet régénèrent l' α -tocophérol de manière plus efficace que l'acide ascorbique. On observe également une régénération graduelle de l' α -tocophérol au niveau des LDL humaines en présence d'extraits de catéchines de thé vert (Q. Y. Zhu *et al.*, 1999).

Enfin, de nombreux auteurs ont montré qu'une augmentation de l'effet antioxydant au niveau du plasma ou du sérum était observée suite à la consommation d'aliments riches en flavonoïdes. Cette élévation serait en relation avec l'augmentation des taux d'acide urique (anti-oxydant le plus important du plasma) induite par la consommation de flavonoïdes (Cao *et al.*, 1998).

Cependant, les flavonoïdes sont susceptibles de provoquer un effet pro-oxydant. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de génération d'ERO comme le peroxyde d'hydrogène. En effet ces composés sont capables de réduire les métaux comme le Fe^{3+} pour donner Fe^{2+} lequel réagira avec O_2 ou H_2O_2 avec génération d'initiateurs de l'oxydation (Kessler *et al.*, 2003). A terme cela pourrait engendrer une atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*.

Certains flavonoïdes particulièrement réducteurs peuvent manifester une activité prooxydante en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ERO. Ils sont capables par exemple de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , ou le Cu^{2+} en Cu^+ , et peuvent ainsi enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle. Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par autoxydation des ions de basse valence. Par leurs effets pro-oxydants, certains flavonoïdes peuvent promouvoir la dégradation oxydante de l'ADN. La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions métalliques libres, c'est-à-dire non liés aux protéines.

Autre inconvénient, seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être réabsorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes réabsorbés (Scheline, 1991). La muqueuse intestinale et le rein interviennent accessoirement dans ce métabolisme. Une fois réabsorbés, les flavonoïdes vont influencer plusieurs fonctions biologiques dont la synthèse protéique, la différenciation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, apportant des effets bénéfiques dans différentes pathologies chez l'Homme.

3. Les métaux

3.1. Le fer

Le fer est un métal de transition dont les états d'oxydation les plus courants sont Fe(II) et Fe(III), il est à la fois indispensable à toute forme de vie, essentiellement pour assurer le transport d'oxygène ou catalyser des réactions de transfert d'électrons, de fixation d'azote ou de synthèse d'ADN, mais il est aussi toxique de par sa capacité à réagir avec l'oxygène et à catalyser la production de formes radicalaires (Crichton & Pierre, 2001).

Les aliments les plus riches en fer sont les abats, les viandes et les légumes secs, mais les légumes verts (notamment les épinards) sont plutôt pauvres en fer

Le Fe(III) est peu soluble dans l'eau, il faut donc de puissants chélateurs pour le solubiliser à pH physiologique. Le corps humain contient entre 3,5 et 4 grammes de fer dont 65% est sous forme d'hémoglobine au sein des globules rouges (Pierre *et al.*, 2002).

Ce fer héminique est continuellement recyclé suite à la phagocytose et au catabolisme des globules rouges sénescents par les macrophages tissulaires (Gozzelino et Arosio, 2016).

La concentration en fer dans l'organisme est régulée au niveau de l'absorption car l'excrétion est très faible. Le fer issu de l'alimentation est sous deux formes, le fer non-héminique (céréales et légumes) faiblement biodisponible car sous forme interchangeable et le fer héminique (viandes) plus biodisponible car sous forme de métallo porphyrines (Tapiero *et al.*, 2001; Whittington & Kowdley, 2002).

L'équilibre du statut en fer est très dépendant des niveaux de besoin en fer de l'organisme, qui varient au cours de la vie. Ces besoins sont plus élevés chez les enfants et les adolescents du fait de la croissance rapide, chez les femmes, de la puberté à la ménopause, du fait des pertes supplémentaires en fer dues aux menstruations, et chez les femmes enceintes à cause des besoins du fœtus et des transformations de l'organisme de la femme (Gozzelino et Arosio, 2016).

Le fer est indispensable à un grand nombre de protéines comme les hémoprotéines, et est stocké dans l'organisme sous forme de ferritine. La transferrine, une glycoprotéine synthétisée dans le foie, est chargée du transport du fer dans le plasma (Kienzl *et al.*, 1999).

Lors d'une surcharge en fer, il y a saturation des ferritines ce qui conduit fatalement à un stress oxydatif suite aux réactions de Fenton, mais peu également conduire à des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Ke & Qian, 2003).

3.2. Le cuivre

Le cuivre est également un métal de transition dont les états d'oxydation les plus courants sont Cu(I) et Cu(II). Sa concentration plasmatique est de 0,8 à 1,2 mg/mL. Le transport du cuivre (*Figure 10*) dans l'organisme est assuré à 90% par la céruléoplasmine, le reste étant pris en charge par l'albumine et la transcupréine (Tapiero *et al.*, 2003).

Les aliments les plus riches en cuivre sont les légumineuses, les noix, les céréales et les abats (foie et reins) (Lönnerdal, 1996).

Suite à la maladie de Wilson une accumulation de cuivre est observée au niveau du foie et du cerveau. La maladie de Menkes, conduit elle à un défaut d'absorption intestinale causant donc une carence en cuivre (Sarkar, 1999).

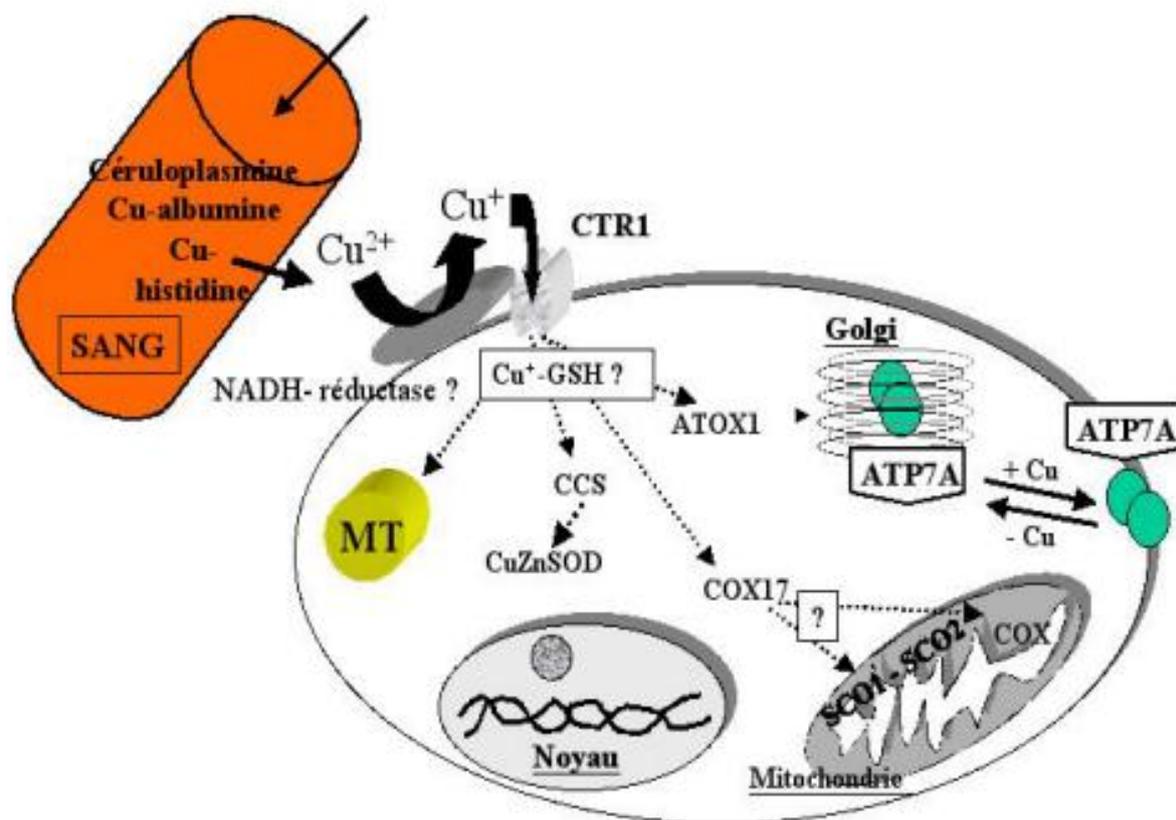


Figure 10 : Métabolisme du cuivre dans la cellule en général. (Guiraud et al., 2008)

ATOX1 : protéine antioxydante 1; *ATP7A* protéine Menkes; *CCS* : chaperonne à cuivre de la superoxyde dismutase; *COX* : cytochrome c oxydase; *COX17* : protéine d'assemblage de la cytochrome c oxydase; *CTR1* : protéine de transport du cuivre; *GSH* glutathion réduit; *MT* : métallothionéine; *SCO1/SCO2* : protéines de synthèse de la cytochrome oxydase (Guiraud, Horn, Favier EMC, 2003)

Le cuivre est largement distribué dans la nature et c'est un élément essentiel à la vie. Le corps humain adulte en contient 80 mg. Il intervient, à l'état physiologique, dans les défenses antioxydantes par l'intermédiaire des enzymes telles : la superoxyde dismutase à cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD) cytoplasmique (Chaves *et al.*, 2007). Il possède deux degrés d'oxydation +I et +II. La forme Cu²⁺, est la plus stable et le pouvoir pro-oxydant du couple Cu⁺/Cu²⁺ est utilisé dans divers réactions d'oxydoréduction par de nombreuses enzymes cuprodépendantes (Linder *et al.*, 1999). L'entrée du cuivre dans la cellule se fait essentiellement par des mécanismes qui dépendent des canaux membranaires. La réduction de Cu²⁺ en Cu⁺ par des réductases membranaires favorise cette entrée.

Une fois dans la cellule, le Cu^+ est distribué par les différentes protéines chaperonnes à Cu vers les différents compartiments cellulaires (Itoh *et al.*, 2009).

Le cuivre peut s'accumuler et devenir toxique pour la cellule. Les mécanismes de toxicité sont à la fois liés au stress oxydant et aux interactions directes avec les composants cellulaires. En effet, le Cu^+ réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour générer le radical hydroxyle (HO^\bullet) (Manzl *et al.*, 2004), un radical très réactif et qui peut causer des dommages cellulaires. $\text{Cu(I)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu(II)} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}$

Les effets toxiques du cuivre peuvent également résulter de l'affinité des ions Cu^{2+} pour l'ADN. L'autre mécanisme de toxicité du cuivre en excès est la modification des structures en doigts de zinc de certains facteurs de transcription qui ne peuvent plus se lier à l'ADN (Peña *et al.*, 1999).

3.3. Le zinc

Le zinc est un métal qui n'a pas de propriétés redox, il est toujours sous forme Zn(II). C'est le cofacteur de plus d'une centaine d'enzymes mais joue également un rôle structural. Il est principalement transporté dans l'organisme grâce à l'albumine. Il est stocké dans le foie où il est lié au métallothionéines (M. J. Salgueiro *et al.*, 2000).

Si une surcharge en zinc est très rarement observée, les carences en zinc dues aux malnutritions sont devenues un actuellement un problème à l'échelle mondiale. Les teneurs en zinc sont faibles au niveau de la plus part des aliments. Et même si sa teneur au niveau des céréales est plus élevée sa biodisponibilité reste faible car il est associé aux phytates (M. a. J. Salgueiro *et al.*, 2002).

Le zinc (Zn) est un métal physiologique qui intervient dans les grandes voies métaboliques, soit comme cofacteur, soit comme constituant de la structure d'enzymes telles que la phosphatase alcaline, la glutamate déshydrogénase ou la superoxyde dismutase (action anti-oxydante) etc. Il agit comme constituant structural d'un grand nombre de facteurs de transcription, ce qui explique son rôle pivot dans le contrôle de l'expression génique (Kindermann *et al.*, 2005). Le nombre d'enzymes à zinc est impressionnant, on a identifié jusqu'à présent plus de 200 enzymes à Zn. Cependant, le Zn peut inhiber des enzymes comme la protéine tyrosine phosphatase et la caspase-3 (Chimienti *et al.*, 2001; Roohani *et al.*, 2013). Le zinc intervient aussi dans la croissance et la prolifération cellulaire, dans la réponse

immunitaire (Schroeder 1990), dans la reproduction, dans le métabolisme d'hormones et dans la protection contre les radicaux libres (Chimienti *et al.*, 2001). L'homéostasie du zinc cellulaire repose sur un équilibre entre des systèmes d'import permettant son entrée dans la cellule, des systèmes de sortie vers l'extérieur, des systèmes de stockage et d'échange et notamment les métallothionéines (MTs). Les MTs contrôlent l'homéostasie du zinc et du cuivre en stockant ou en échangeant ces oligoéléments avec d'autres protéines (Roohani *et al.*, 2013).

D'autres études ont suggéré une production indirecte des ERO par le zinc. Cette production induite des ERO est liée à l'inhibition de la glutathion peroxydase, à la diminution du taux intracellulaire de GSH et à l'oxydation du glutathion (Bishop *et al.*, 2007). Sensi and Jeng (2004) ont démontré que le zinc en excès est potentiellement neurotoxique. Les effets neurotoxiques impliquent plusieurs voies de signalisation, incluant la génération mitochondriale et extra-mitochondriale des ERO et la perturbation de l'activité des enzymes métaboliques liées à l'activation de l'apoptose et/ou la nécrose. En effet, la séquestration du zinc en excès par la mitochondrie se traduirait par son dysfonctionnement ; dysfonctionnement caractérisé par un relargage prolongé des ERO (Sensi & Jeng, 2004). Les radicaux libres ainsi générés ont un impact sur les composants cellulaires (Nzengue, 2008).

4. Complexes flavonoïdes-Métaux

Certains flavonoïdes spécifiques sont connus pour chélater le fer et le cuivre, éliminant ainsi un facteur de causalité pour le développement des radicaux. La quercétine est capable de prévenir les effets délétères de l'oxydation induite dans la membrane érythrocytaire par un certain nombre d'agents oxydants qui causent la libération du fer dans sa forme libre, rédox active (Ferrali *et al.*, 1997). Les sites de liaison des métaux aux flavonoïdes sont situés dans le cycle B, au niveau des groupes 3-hydroxyle et 4-oxo dans le cycle hétérocyclique C, ainsi qu'au niveau des groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les groupes C et A

La fraction de catéchol dans le cycle B s'est révélée être la plus importante pour la chélation des métaux. La quercétine en particulier, est connue pour ses propriétés de chélation et de stabilisation du fer et du Cd(II) (Ravichandran *et al.*, 2014).

En présence de métaux les flavonoïdes peuvent former des complexes appelés chélates (Figure 11). Ces complexes peuvent avoir d'importants effets en tant qu'anti-oxydants.

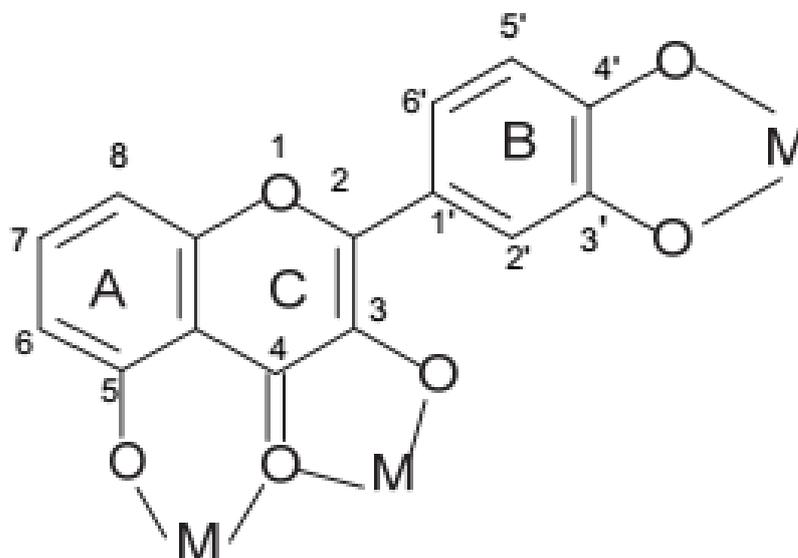


Figure 11 : Sites de coordination possibles sur la structure de quelques flavonoïdes(Symonowicz & Kolanek, 2012)

Plusieurs travaux ont montré que les complexes flavonoïdes-métaux avaient des propriétés antiradicalaires plus puissantes que le flavonoïde seul (Kostyuk *et al.*, 2001; de Souza *et al.*, 2003). En effet, Kostyuk *et al.*, 2001 ont démontré que la rutine, la quercétine, ou la catéchine complexées avec le Fe(II), le Fe(III), le Cu(II) ou le Zn(II) sont plus efficaces que les flavonoïdes libres grâce à l'acquisition d'un centre additionnel de dismutation.

Ces complexes ont montré une efficacité accrue quant à la protection *in vitro* des globules rouges contre un stress oxydant induit par l'amiant. Ces mêmes auteurs ont démontré que le complexe rutine-Cu était le plus efficace *in vivo* contre la peroxydation des lipides dans les tissus pulmonaires.

Une autre étude (Moridani *et al.*, 2003) a montré que les complexes flavonoïdes-Fe(III) sont plus efficaces pour protéger des hépatocytes de rats.

Etat de l'art

En utilisant le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) une autre étude (de Souza & De Giovanni, 2004) a démontré que les complexes métalliques de la quercétine, de la rutine et de la galangine étaient plus efficaces que les flavonoïdes libres.

Les effets de ces complexes métalliques ne se réduisent pas au pouvoir antioxydant, en effet, grâce à ce pouvoir antioxydant certains complexes ont montré des pouvoirs antibactériens contre plusieurs souches dont *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (Tang *et al.*, 2004; Kopacz *et al.*, 2005)

Cependant, les informations sur les compositions et les structures sont souvent incomplètes et parfois contradictoires. Les résultats dépendent largement des conditions expérimentales et des types d'essais utilisés (*in vitro*, *in vivo*...)

Matériel et méthodes

Le présent travail traite dans un premier temps de l'étude des propriétés physico-chimiques des complexes flavonoïdes-métaux. Cette partie a été réalisée dans le laboratoire de chimie bioorganique et médicinal de l'Université de Strasbourg. Dans la deuxième partie de ce travail (effectué au laboratoire PPABIONUT, Université de Tlemcen) nous avons réalisé une étude *in vitro* sur deux modèles cellulaires (les globules rouges et les lymphocytes) afin d'évaluer le potentiel pro-oxydant/anti-oxydant de ces complexes métalliques.

1. Etude physico-chimique

Cette partie est dédiée à l'étude physicochimique de trois flavonoïdes (quercétine, rutine et catéchine) ainsi qu'à quatre dérivés de la quercétine : la 3,5,7-tri-O-méthyl-quercétine (notée quercétine-3'4'OH), la 5,7,3',4'-tétra-O-méthyl-quercétine (notée quercétine-3OH), la 7,3',4'-tri-O-méthyl-quercétine (notée quercétine-35OH) et la 3,7,3',4'-tétra-O-méthyl-quercétine (notée quercétine-5OH) (*Figure 12*).

La (+)-catéchine ($C_{15}H_{14}O_6$, MW = 290,27 g mol⁻¹) extraite à partir du thé vert par l'équipe du Dr. A. P. Davies (Unilever, Bedford, UK) est un composé représentatif de la famille des flavanols (Davis *et al.*, 1996). La quercétine dihydrate ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, MW = 338,27 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich, 98%) et la rutine trihydrate ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$, MW = 664,56 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich, 95%) appartiennent tous deux à la famille des flavonols. Les dérivés méthylés de la quercétine ont été synthétisés selon la littérature (JURD, 1962; Shi *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015).

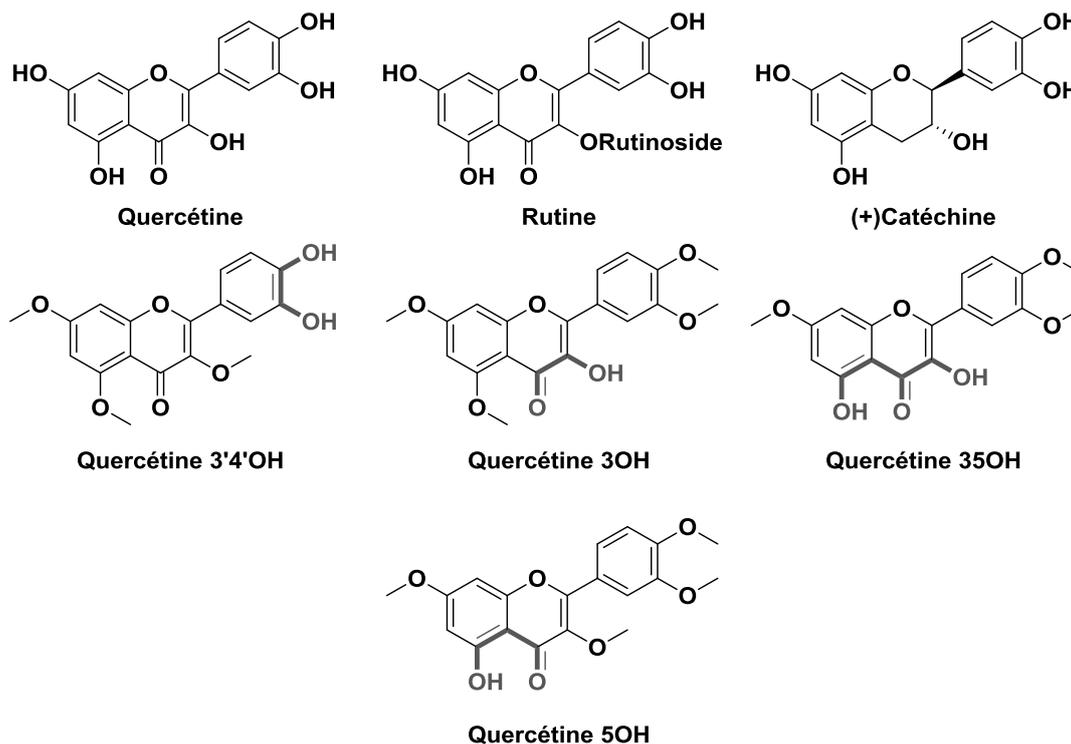


Figure 12 : Structures chimiques de la quercétine, rutine, (+)-catéchine et de 4 analogues polyméthylés de la quercétine (les parties en gris et gras désignent les unités de coordination bidentées potentielles).

Les flavonoïdes étudiés ainsi que les dérivés de quercétine ont été dissouts dans un mélange composé de 80% de méthanol de qualité spectrophotométrique (Merck, p.a.) et de 20% d'eau (m/m).

1.1. Préparation des solutions :

L'eau distillée est purifiée à travers des colonnes échangeuse d'ions (Bioblock Scientific R3-83002, M3-83006) puis à travers une colonne de charbon actif (Bioblock Scientific ORC-83005). L'eau distillée purifiée obtenue ainsi que le méthanol sont désoxygénés par de l'argon débarrassé de CO₂ et d'O₂ au moyen d'une cartouche filtrante Sigma Oxiclear cartridge) avant d'être utilisés. Toutes les solutions stocks ont été préparées par pesée des produits solides au moyen d'une balance analytique AG 245 Mettler Toledo (précision 0,01 mg).

Le cuivre(II) perchlorate hexahydrate (Cu(ClO₄)₂•6H₂O, MW = 370,54 g mol⁻¹), le zinc(II) perchlorate hexahydrate (Zn(ClO₄)₂•6H₂O, MW = 327,38 g mol⁻¹) et le fer(III) perchlorate hydrate (Fe(ClO₄)₃•xH₂O, MW = 354,20 g mol⁻¹) obtenus commercialement chez

Matériels et Méthodes

Alfa Aesar ont été utilisés pour préparer les solutions stocks ($\sim 5-8 \times 10^{-2}$ M) dans de l'eau saturée en argon.

Les concentrations en métaux des différentes solutions ont été déterminées selon les méthodes de titrages colorimétriques classiques comme décrit ci-dessous.

Les solutions cuivriques ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) ont été acidifiées avec 0,1 M HClO_4 pour éviter la précipitation des hydroxydes et leur concentrations vérifiées par titrage colorimétrique avec une solution $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ (Merck, Titriplex III, 0.1 M) en utilisant de l'acétate d'ammonium (Prolabo, Rectapur) comme tampon et du PAR (4-2(2-Pyridylazo)résorcinol monosodium sel monohydrate) comme indicateur.

Les concentrations des solutions stock $\text{Zn}(\text{II})$ ont été également vérifiées par titrage colorimétrique avec une solution $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ (Merck, Titriplex III, 0,1 M), en utilisant de l'acétate d'ammonium (Prolabo, Rectapur) comme tampon et des comprimés tampon (Merck) comme indicateur.

Les concentrations des solutions stock de $\text{Fe}(\text{III})$ ont été vérifiées par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis. ($\epsilon^{240} = 4.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et $\epsilon^{260} = 2.88 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en solution aqueuse diluée avec de l'acide perchlorique; 4% v/v of HClO_4 à 70%) (Bastian *et al.*, 1956).

Les solutions stock de FeNTA ($\sim 10^{-3}$ M) ont été préparées en mélangeant des quantités équimolaires de $\text{Fe}(\text{III})$ sous forme de perchlorate et du NTA (NTA = acide nitrilotriacétique). Une quantité appropriée de NTA est d'abord pesée puis placée dans une fiole où l'on additionne lentement une solution de perchlorate de $\text{Fe}(\text{III})$. Le NTA est présent en léger excès afin d'assurer la complexation de la totalité du $\text{Fe}(\text{III})$ et ainsi éviter la formation de tris(hydroxyde) de fer(III) insoluble à pH 7,4. La fiole est ensuite complétée avec notre solvant méthanol/eau.

Une solution 0.1 M de tampon hépes ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, $\text{MW} = 238,30 \text{ g.mol}^{-1}$) est préparée à pH 7,4 dans un solvant mixte méthanol/eau (80/20 en poids). La standardisation et la vérification de la linéarité ($2,00 < \text{p}[\text{H}] < 13,60$) de l'électrode de pH combinée utilisée pour vérifier le pH de la solution d'hépes est effectuée en utilisant des solutions tampons selon les méthodes classiques (Gelsema *et al.*, 1966; Alfenaar & De Ligny, 1967).

Le pH de la solution d'hépes est ensuite ajusté à pH 7,4 par ajout de petits volumes d'une solution de NaOH très concentrée.

1.2. Titrage des flavonoïdes par le FeNTA, le Cu(II) et le Zn(II) par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis. à pH 7,4

Des microvolumes de solutions concentrées de FeNTA, de Cu(II) et de Zn(II) sont ajoutés à 2 mL de la solution de flavonoïde ($2-5 \times 10^{-5}$ M) dans une cuve optique Hellma en quartz suprasil de 1 cm de trajet optique. Le spectre UV-Vis. correspondant est enregistré entre 230 nm et 800 nm pour suivre la formation des complexes métalliques au moyen d'un spectrophotomètre d'absorption UV-Vis. Cary 50 (Varian) qui est maintenu à (25.0 ± 0.2) °C. Les données spectrophotométriques ont été ensuite analysées grâce à un logiciel de traitement statistique Specfit (Gampp *et al.*, 1985a, 1985b, 1986) qui ajuste les absorptions et les constants de stabilité des espèces formées à l'équilibre selon l'algorithme de Marquardt (Marquardt, 1963; Maeder & Zuberbuehler, 1990).

1.3. Caractérisation des complexes Flavonoïdes-Métaux par ESI-MS

Une étude par spectrométrie de masse en mode electrospray a été mise en œuvre afin de caractériser les différents complexes métalliques formés avec nos ligands. Afin d'évaluer leurs stœchiométrie, nous avons préparé deux solutions, une pour chaque polyphénol et une solution stock de Cu(II) ou de Fe(III). Un mélange mixte méthanol/eau, 80/20 % en poids ou du méthanol pur sans sel de fond, ni tampon ont été utilisés selon la nature et la solubilité du polyphénol. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un analyseur à trappe d'ions (Agilent Technologie 6120 quadripole LC/MS) équipé d'une source d'ions electrospray ESI. Les solutions de complexe de rapport ML 1:1 (M= Cu(II), FeNTA, L = rutine, quercétine ou quercétine3OH) de concentrations connues de 5 à $8,7 \times 10^{-5}$ M ont été préparées. Chacune de ces solutions a été introduite dans la source du spectromètre de masse avec un pousse-seringue (Kd Scientific) à un débit de $300 \mu\text{L h}^{-1}$. Pour aider à la nébulisation, une assistance pneumatique, du gaz N₂ chauffé à 250 °C avec un débit de 6 L/min a été utilisé. La tension de sortie de capillaire ($V_{\text{cap exit}}$) a été fixée à 5kV tandis que celle du skimmer (V_s) a été variée entre 50 V et 300 V afin d'optimiser la réponse du signal. Les spectres ont été enregistrés en mode positif ou en mode négatif pour des rapports m/z compris entre 100 et 1500.

1.3.1. Principe de la spectroscopie de masse par electrospray

Nous avons utilisé la spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI). L'ESI est un processus d'ionisation douce qui transforme les ions, majoritairement préformés en solution, en ions en phase gazeuse. Le mécanisme du processus d'ionisation par ESI peut être décrit de la façon suivante : L'analyte en solution est introduit dans la source à travers un capillaire métallique (Figure 13). Ce dernier est porté à un potentiel électrique élevé positif ou négatif de 3 à 6 kV. Deux étapes ont lieu lors de la formation des ions par ESI. La première est la formation d'un nuage de gouttelettes (spray) au bout de l'aiguille sous l'action du champ électrique appliqué à la sortie du capillaire. Un flux de gaz (N_2 la plupart du temps, gaz de nébulisation) qui circule constamment est conjointement appliqué pour aider à l'évaporation du solvant. La haute tension entraîne les ions de même polarité vers la surface de la solution pour former « un cône de Taylor ». Il y a alors formation de gouttelettes chargées avec des ions positifs ou négatifs (Figure 14).

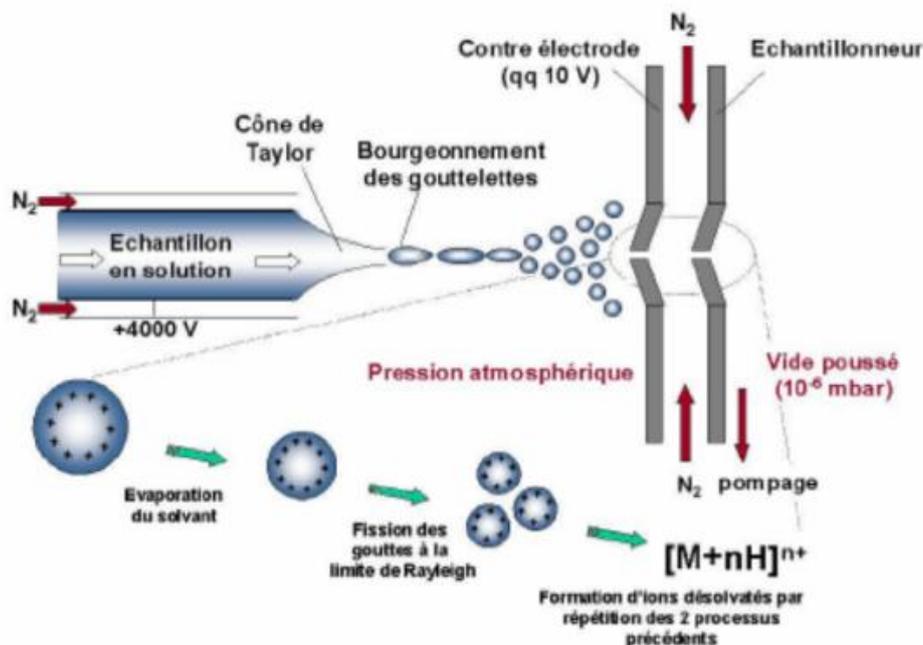


Figure 13 : Processus d'ionisation par ESI (Gaskell, 1997)

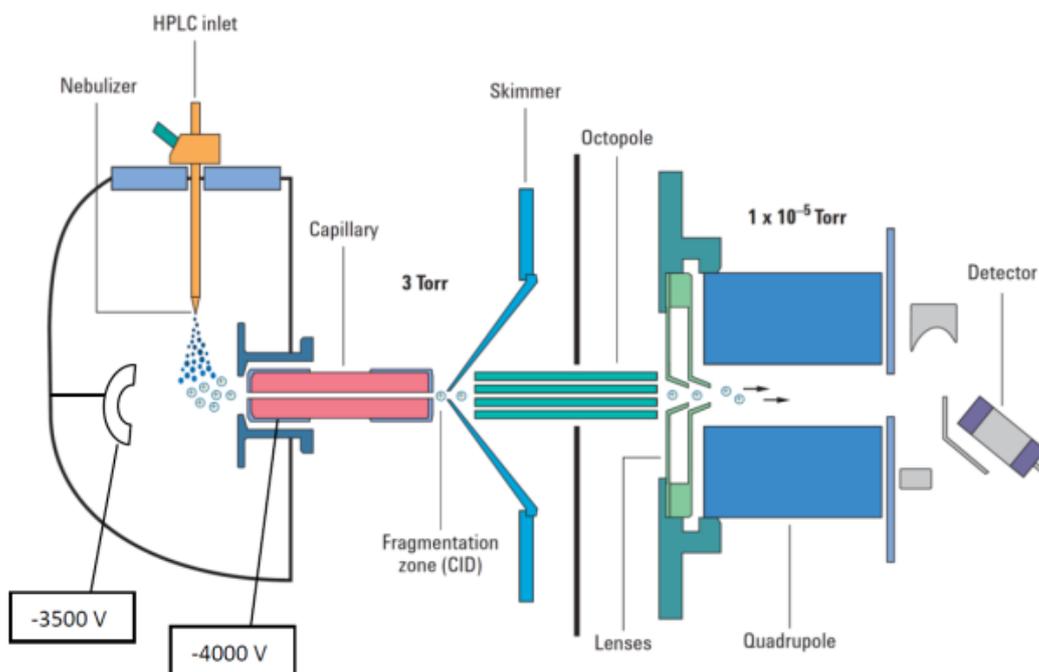


Figure 14 : Schéma du SM Agilent 6120.

L'évaporation du solvant entraîne le rétrécissement des gouttelettes et donc l'augmentation de leur charge surfacique. Par la suite, à la limite de « Rayleigh », la répulsion coulombienne dépasse la tension superficielle et induit l'éclatement des gouttelettes. Cette explosion coulombienne forme une série de petites gouttelettes faiblement chargées. Les processus de rétrécissement et d'explosion sont répétés jusqu'à l'obtention d'ions individuels.

Les ions ainsi générés sont ensuite transférés vers l'analyseur (quadripôle dans notre cas). Le procédé d'ionisation peut conduire à la formation d'ions mono-chargés de type $[M+H]^+$ en mode positif ou $[M-H]^-$ en mode négatif mais également à des ions de charges multiples appelés ions multichargés $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$. Il arrive parfois que des ions majoritaires correspondant à des adduits soient formés par combinaison de l'ion moléculaire du composé d'intérêt avec une impureté de la phase mobile (Na^+ , K^+ ou NH_4^+).

1.3.2. Principe d'un analyseur quadripôle

Un quadripôle est un filtre de masse constitué de quatre barres parallèles, idéalement de section hyperbolique (Figure 15). Un potentiel continu (DC) et un potentiel radiofréquence (RF) sont appliqués entre les quatre barres. Selon le choix des valeurs de masse et de potentiel appliqué, certains ions seront éjectés ou entreront en contact avec les barres («non resonant ion» (Figure 15) et d'autres auront une trajectoire leur permettant de passer entre les barres du

quadripôle («resonant ion», *Figure 15*) et seront donc détectés. Le quadripôle est un appareil qui utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur m/z .

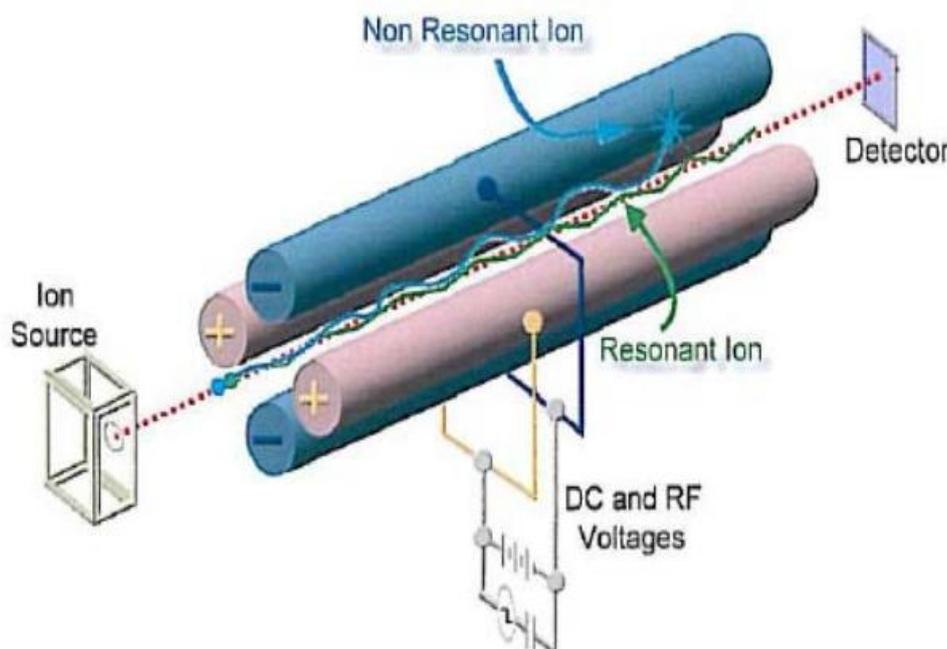
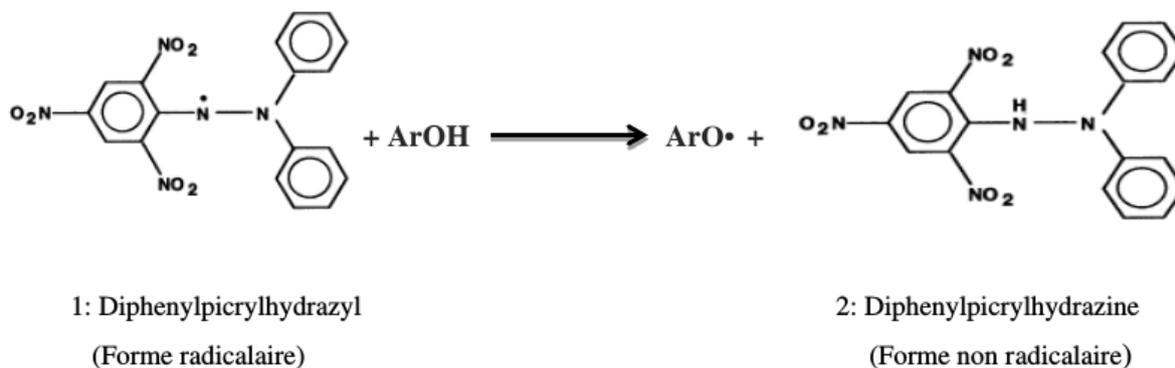


Figure 15 : Principe d'un analyseur quadripôle.

1.4. Détermination de l'activité antiradicalaire par piégeage du radical DPPH

Les propriétés anti-oxydantes/antiradicalaires des flavonoïdes testés ont été évaluées par la méthode de piégeage du radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette méthode est largement utilisée pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa rapidité et de sa simplicité d'analyse. Le radical DPPH, en solution alcoolique, présente une intense coloration violette qui disparaît en présence de composés donneurs de H[•].



Mécanisme de réduction du radical DPPH[•] (Molyneux, 2004)

Matériels et Méthodes

Le radical DPPH• présente une bande d'absorption maximale intense centrée à 515 nm dans le méthanol. Cette bande disparaît lors de la réduction du DPPH• (en l'hydrazine correspondante) par un composé donneur d'atomes H• (ArOH). Cette décoloration met en évidence le pouvoir anti-oxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 515 nm (K. Mishra *et al.*, 2012).

Les valeurs obtenues ont été comparée à celle d'un standard classique : l'acide ascorbique.

Des microvolumes de solutions méthanoliques de flavonoïdes ou d'acide ascorbique sont ajoutés à 2 mL d'une solution méthanolique de DPPH• (125 µM). Les solutions stock de DPPH• sont quotidiennement préparées et gardées à 4°C jusqu'à leur utilisation. La réaction est suivie pendant 30 mn et les absorbances mesurées à 515 nm toutes les 30 secondes sur un spectrophotomètre UV-Vis Cary 50 (Varian). Le pourcentage de DPPH• restant en fonction de la concentration du flavonoïde ou de l'acide ascorbique nous permet alors d'évaluer les CE₅₀ (concentration d'anti-oxydant nécessaire pour piéger 50% du DPPH• initial) (Goupy *et al.*, 2003). Plus les valeurs des CE₅₀ sont faibles, plus les capacités anti-oxydantes du composé considéré sont élevées.

2. Etudes *in vitro* sur les globules rouges

Les solutions de flavonoïdes et de métaux sont préparées à chaque fois immédiatement avant utilisation.

Les flavonoïdes sont d'abord préparés dans le DMSO, puis dilués à une concentration finale de DMSO à 0.1% dans le milieu réactionnel. A cette concentration le DMSO ne présente aucun effet d'hémolyse sur les GRs. Les flavonoïdes ont été utilisés à deux concentrations différentes : 100 et 200 µM.

Les solutions stock de fer, de cuivre et de zinc sont d'abord préparées en solutions aqueuses, puis ajustées à leur concentration finale dans le milieu réactionnel.

2.1. Préparation des échantillons de globules rouges humains:

Les GRs humains ont été séparées à partir de sang collecté sur tube hépariné obtenu à partir d'un donneur unique après ponction au niveau de la veine du pli du coude. Le donneur est non fumeur et ne présente aucune maladie apparente.

L'échantillon collecté est centrifugé à 2000 tr/mn pendant 10 mn, puis le plasma est écarté. Les GRs ainsi obtenus subissent une série de trois lavages avec un tampon phosphate (PBS) pH 7,4 puis sont suspendus dans le tampon PBS à une concentration de 5% (v/v) (Deng *et al.*, 2006).

2.2. Test d'hémolyse :

La solution de GRs à 5% dans le tampon PBS incubée à pression atmosphérique et à 37 °C en présence ou en absence de flavonoïdes est maintenue sous agitation pendant 30 mn. Une solution aqueuse de métal y est ensuite introduite afin d'initier l'hémolyse. Le taux d'hémolyse est mesurée par spectrophotométrie (Kuang *et al.*, 1994). Des aliquotes sont prélevés après quatre heures d'incubation et dilués dans le tampon PBS pH 7,4, puis centrifugés à 2000 tr/mn pendant 10 mn. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm que l'on compare par la suite à l'absorbance d'un échantillon de GRs totalement hémolysé (traité avec de l'eau distillée)

$$\%_{\text{hémolyse}} = \left(\frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{totale}}} \right) \times 100$$

Où $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon après 4 h,

A_{totale} l'absorbance totale de l'hémoglobine présente dans les GRs.

3. Viabilité des Lymphocytes *in vitro* :

3.1. Isolement des lymphocytes humains

Le sang collecté est placé dans un tube conique où l'on a préalablement placé de l'histopaque (SIGMA) dont la densité est de 1,077. Une centrifugation à 400g pendant 30 minutes permet de séparer les lymphocytes grâce à la formation de différentes couches contenant chacune les différents types de cellules sanguines (*Figure 16*).

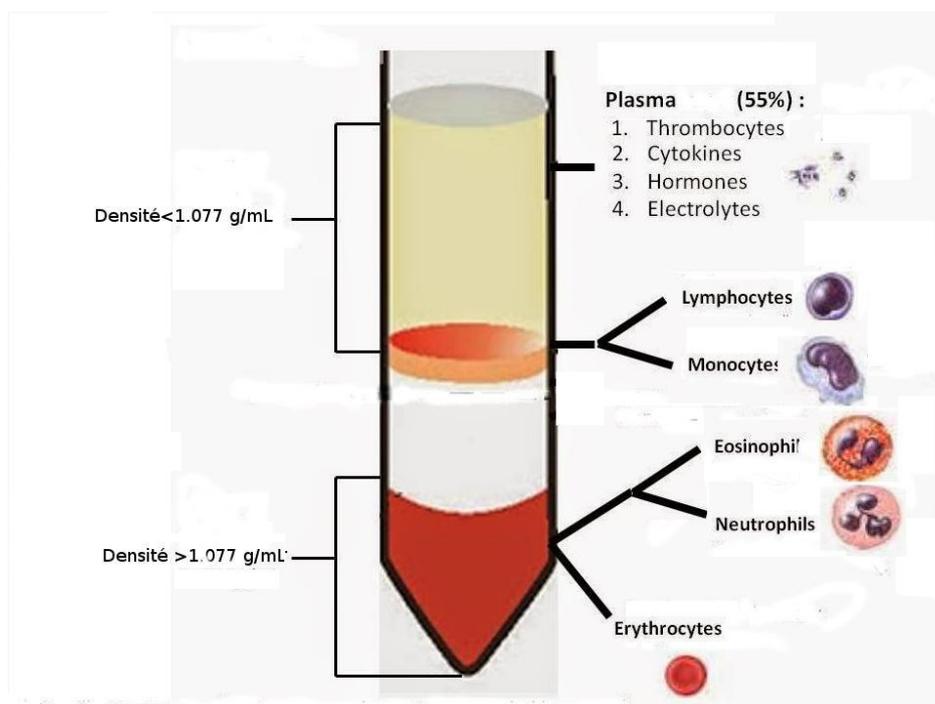


Figure 16 : Isolement des lymphocytes sur gradient histopaque

Les lymphocytes sont récupérés puis subissent une série de trois lavages successifs avec une solution saline équilibrée pour éliminer les contaminants. Les lymphocytes sont par la suite suspendus dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640 (riche en glucose et en acides aminés).

3.2. *Test de transformation lymphoblastique (TTL)*

Un comptage cellulaire est d'abord réalisé sur cellule de Malassez (chambre quadrillée), suite à une coloration par bleu de trypan, (0,4%), colorant permettant de distinguer les cellules vivantes. Ceci nous permet de tester la viabilité des lymphocytes et d'ajuster notre suspension à 4.10^6 cellules/ml.

Le TTL permet d'étudier la prolifération *in vitro* des lymphocytes stimulés par un agent mitogène la concanavaline A (Con A Sigma, St. Louis, MO, USA), utilisée à une concentration finale de 5 µg/mL. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa). Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puits) dans le milieu RPMI 1640 auquel on ajoute le tampon HEPES (25 mM), 10% de sérum de veau fœtal, la L - Glutamine (2mM), le 2-mercaptoéthanol (5×10^{-5} M), la pénicilline (100 UI/ml) et la streptomycine (100 µg/ml).

Matériels et Méthodes

Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multipuits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48 heures à 37 °C, et 5% de CO₂

La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de Malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide].

La suspension cellulaire est centrifugée à 6000 tours/min pendant 15 minutes. Les cellules (culot) sont lysées aux ultrasons et le contenu intracellulaire sert aux dosages des marqueurs du stress oxydatif intracellulaire.

3.3. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT

Cette technique repose sur la capacité de la succinate déshydrogénase ; une enzyme mitochondriale ; de transformer les sels de tétrazolium de couleur jaune en un produit insoluble (sel de Formazan) de couleur bleue violacée (Hansen *et al.*, 1989).

La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7,5), filtrée puis conservée à 4 °C à l'abri de la lumière. La suspension cellulaire est incubée en présence du MTT à 37° C, 5% CO₂ pendant 3 heures.

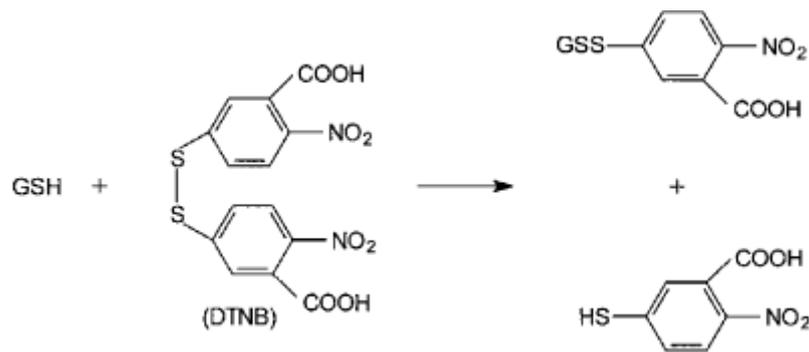
L'enzyme uniquement présente dans les cellules vivantes permet par un dosage spectrophotométrique (à 630 nm) de déterminer le nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Ceci nous permet de calculer l'indice de prolifération grâce à la formule suivante :

$$IP = \frac{D.O \text{ des cellules stimulées}}{D.O \text{ des cellules non stimulées}} \times 100$$

4. Détermination des marqueurs du stress oxydatif

4.1. Dosage du glutathion réduit

Les concentrations en glutathion réduit (GSH) sont déterminées par la méthode d'Ellman (Ellman, 1959). Le réactif d'Ellman, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque), est réduit par les groupements thiols du GSH pour être transformé en acide 2-nitro-5-thiobenzoïque de couleur jaune.



4.2. Dosage de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est mesurée par spectrophotométrie dans le lysat érythrocytaire ainsi que dans le lysat lymphocytaire (Aebi, 1984). La catalase est responsable de la décomposition du peroxyde d'oxygène H_2O_2 , ce qui résulte en une diminution de l'absorbance à 240 nm. L'activité de la catalase est exprimée en U/mg d'hémoglobine grâce à une gamme étalon de H_2O_2 .

4.3. Dosage de l'activité superoxyde dismutase

L'activité superoxyde dismutase mesurée selon (Kono, 1978) est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber de 50% la réaction entre $O_2^{\cdot -}$ et l'indicateur.

Le milieu réactionnel (2 mL) contient 0,1 mM EDTA, 50 mM Na_2CO_3 et 96 mM de NBT. A cela on rajoute 50 μ L d'hydroxylamine à 10 mM (pH 6) et 50 μ L d'échantillon.

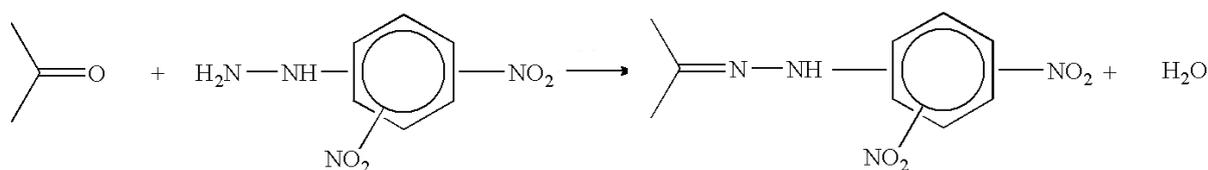
L'auto-oxydation de l'hydroxylamine est mesurée à 560 nm après 5 minutes de réaction

4.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le marqueur d'oxydation lipidique le plus utilisé est le malondialdéhyde. La technique passe par un traitement acide à chaud, à l'acide thiobarbiturique (TBA) (Draper & Hadley, 1990). Les lysats sont incubés 20 minutes à 100 °C avec le TBA et l'acide trichloroacétique (TCA). Après incubation, refroidissement et centrifugation à 4000 t/min pendant 10 minutes, la lecture est réalisée sur le surnageant qui contient le MDA. Le TBA réagit avec les aldéhydes pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. La lecture des absorbances se fait à 532 nm et les concentrations en MDA sont calculées grâce au coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L.mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.5. Dosage des protéines carbonylées

Les concentrations en protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont déterminées selon la méthode de Levine et al. (Levine *et al.*, 1990).



Protéine oxydée

DNPH

DNP-Protéine

Les protéines oxydées peuvent réagir avec le 2,4- dinitrophénylhydrazine pour donner un dérivé hydrazone détectable à 375nm. La concentration des groupements carbonylés est calculée grâce au coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 21,5 \text{ L.mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

5. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type, n=6. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 8, Statsoft, Paris, France). Les différences significatives ($P < 0,05$) ou ($P < 0,01$) sont utilisées pour comparer les moyennes des contrôles et les moyennes des échantillons après traitement grâce au test de Student apparié.

Résultats et interprétations

1. Absorptions et constantes de stabilité des complexes

Dans l'organisme humain le Fe(III) est principalement exposé à un pH neutre (pH ~7,4). Pour maintenir sa solubilité dans des conditions physiologiques, le fer est en permanence lié aux protéines (hémoglobine, transferrine...) et à d'autres petits chélateurs comme les citrates. La partie de fer(III) non lié est appelée « pool labile de fer » et peut être la cible de chélateurs exogènes comme les polyphénols (Kakhlon & Cabantchik, 2002).

Les ligands de type polyaminocarboxylates comme le citrate ou l'acide nitrilotriacétique (NTA) sont souvent utilisés pour assurer la solubilité du Fe(III) (Gabricevic *et al.*, 2004). Le NTA est l'un des chélateurs organiques les plus étudiés. La spéciation de ses complexes ferriques est bien connue (Sanchiz *et al.*, 1999; Nowack, 2002).

Des titrages de la quercétine ainsi que de ses analogues méthylés avec le NTA ont été réalisées par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis. (*Figure 17*) à pH 7,4 dans un solvant méthanol/eau afin d'élucider quel site de chélation est le plus favorable (catéchol *vs* α -hydroxy-carbonyle *vs* β -hydroxy-carbonyle) et de comparer leur stabilité avec d'autres flavones largement répandus dans le règne végétal: la rutine (catéchol *vs* β -hydroxycarbonyle) et la (+)catéchine (catéchol).

Comme le montre la *Figure 17*, le titrage de la quercétine^{3'4'}OH par le FeNTA révèle, en plus de l'effet bathochrome des transition π - π^* centrée à ~ 350 nm, la formation d'une large bande d'absorption (transfert de charge du ligand vers le métal, LMCT) dans le domaine visible qui est caractéristique de la complexation du Fe(III) par le site de chélation bidenté catéchol (Palaniandavar *et al.*, 2006). Des transitions de type LMCT ont également été observées pour les complexes ferriques formés avec les autres systèmes considérés dans ce travail avec le FeNTA (**annexes**). La *Figure 18* décrit les spectres électroniques de l'analogue quercétine^{3'4'}OH et de ses complexes ferriques calculés grâce au traitement statistique des données spectrophotométriques. La *Figure 19* montre quant à elle les courbes de distribution des complexes ferriques formés avec le composé quercétine^{3'4'}OH en fonction de la concentration de FeNTA ajoutée. La *Figure 20* confirme la présence exclusive d'un complexe 1:1 formé entre le composé quercétine^{3'4'}OH et le FeNTA.

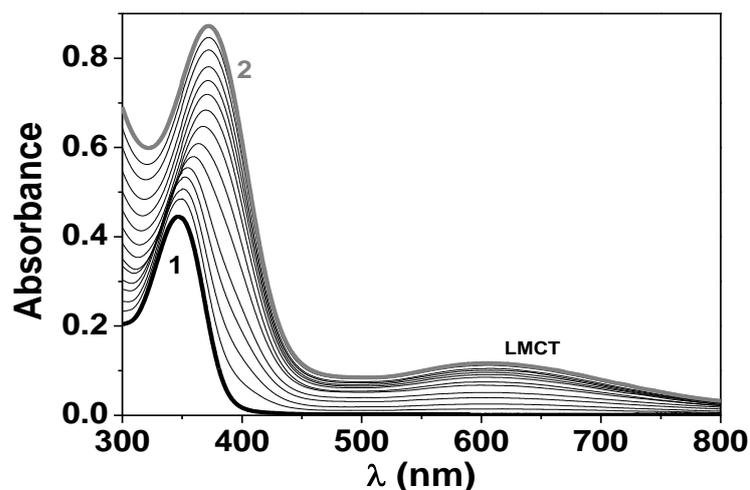


Figure 17 : Titrage spectrophotométriques des complexes ferriques de la 3,5,7-tri-O-méthylquercétine (noté quercétine3'4'OH) Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids); pH = 7,4 (Tampon hépes); $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$. [Quercétine 3'4'OH]₀ = $2,89 \times 10^{-5} \text{ M}$.

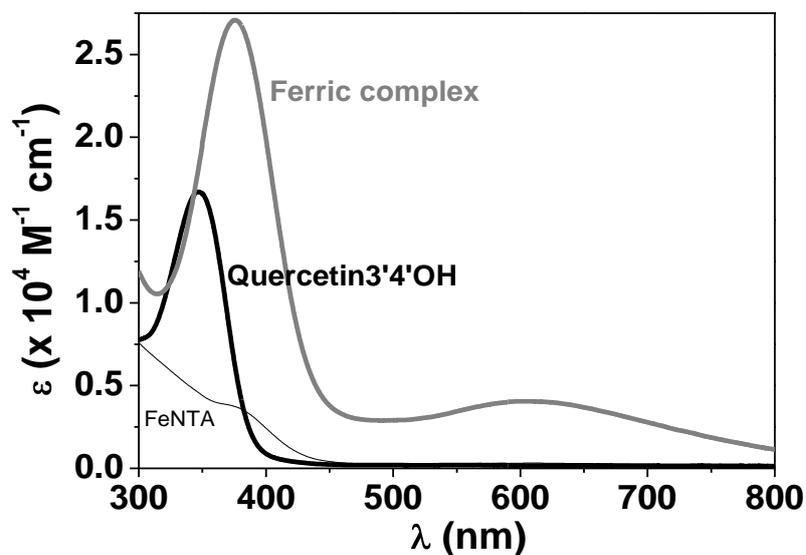


Figure 18 : Spectres électroniques des complexes ferriques de la quercétine3'4'OH. Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids); pH = 7,4 (Tampon hépes); $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$. [Quercétine 3'4'OH]₀ = $2,89 \times 10^{-5} \text{ M}$.

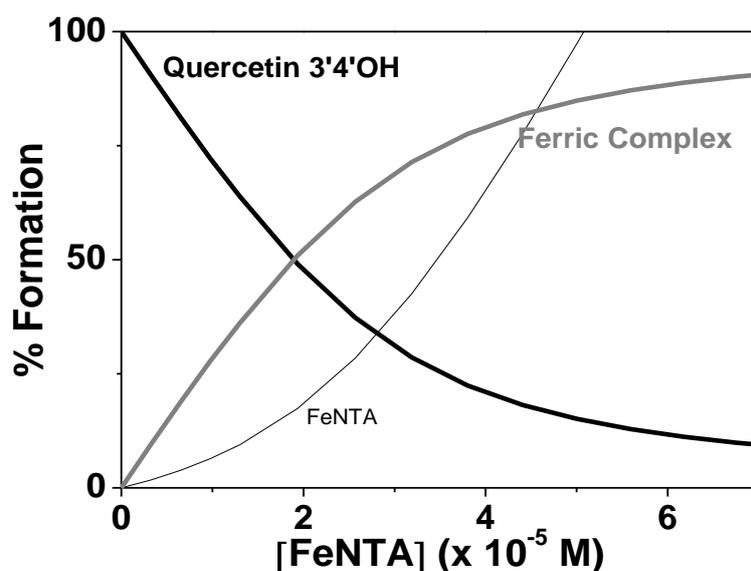


Figure 19 : Courbes de distribution des espèces formées lors de la complexation de la quercétine 3'4'OH par le FeNTA. Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids); pH = 7,4 (Tampon hepes); T = 25,0(2) °C; l = 1 cm. [Quercétine 3'4'OH]₀ = 2,89 × 10⁻⁵ M.

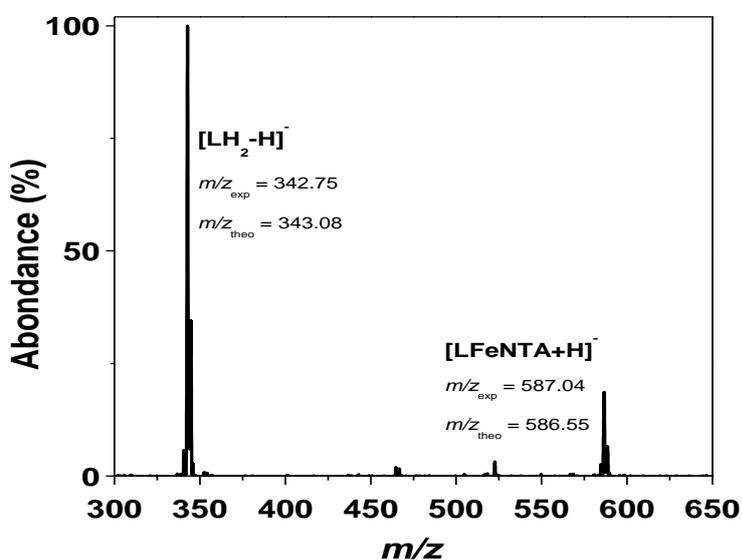


Figure 20 : Spectre de masse en mode électrospray des complexes ferriques de la quercétine 3'4'OH (noté LH₂) enregistré en mode négatif en présence de FeNTA. Solvant : CH₃OH, tension de capillaire = 4000 V. [L.FeNTA]_{tot} = 5 × 10⁻⁵ M; Fragmenteur = -100 V.

Résultats et Interprétations

Un traitement statistique des titrages effectués par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis. des différentes flavonoïdes étudiées par le FeNTA a été effectué (Gampp *et al.*, 1985a) afin de calculer les différentes constantes de stabilité. Ces données thermodynamiques sont rassemblées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Constantes de stabilité des complexes du FeNTA, du Cu et du Zn avec la rutine, la (+)-catéchine, la quercétine et ses analogues O-méthylés.^a

Flavonoïde	Q	Q3OH	Q5OH	Q3,5OH	Q3'4'OH	(+)Catéchine	Rutine
$\log K_{L,FeNTA} (\sigma)$	5,0(3)	4,4(2)		4,8(6)	5,3(3)	6,22(3)b	5,3(2)
$\lambda_{max} (LMCT)$	620	480	nc	425/515	600	570	598
$\epsilon^{\lambda_{max}} (10^3 M^{-1} cm^{-1})$	3,7	4,8		4,8/1,1	4,05	2,4	2,7
$\log K_{L,Cu} (\sigma)$	6,0(2)	nd	nd	nd	nd	4,0(2)	4,6(1)
$\log K_{L2,Cu} (\sigma)$	4,8(3)						
$\log K_{L,Zn}$	4,23(2)	nd	nd	nd	nd	~2	2,62(3)

Q = quercetin, Q3'4'OH = Quercétine3'4'OH, Q35OH = Quercétine35OH, Q3OH = Quercétine3OH, Q5OH = Quercétine5OH. $\log K_{FeNTA} = 6,0$ à pH = 7,4. ^a Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 m/m) ; pH = 7,4 (tampon hépes) ; I = 0,1 M (Hepes) ; T = 25,0(2) °C. ^b Solvant : H₂O ; pH = 7,4 (Tampon hépes 0,05 M) ; T = 25,0(2) °C ; référence (Carrér, 2005; Elhabiri *et al.*, 2007). nd: non déterminé; nc: pas de complexation. σ = déviation standard.

La stœchiométrie 1:1:1 des complexes formés avec le FeNTA et les différents systèmes à notre disposition confirment de précédentes études basées sur des systèmes catéchols (Elhabiri *et al.*, 2007) ou hydroxamates (Das *et al.*, 1989; Brandel *et al.*, 2012) avec le FeNTA. De plus, la spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI-MS) a permis de caractériser la formation de complexes ternaires avec le FeNTA en accord avec les résultats obtenus par spectrophotométrie (Figure 20). Des massifs isotopiques monochargés (positivement ou négativement) et caractéristiques de la complexation du fer(III) ont été mis en évidence. La quercétine, la quercétine3'4'OH, la rutine et la (+)catéchine se sont ainsi révélés comme étant les meilleurs chélateurs du Fe(III) suggérant que le site catéchol est donc le site de chélation le plus efficace. La quercétin3OH et la quercétin3,5OH (possédant un site α -hydroxy-carbonyl) présentent également, en présence de FeNTA, des transition LCMT

Résultats et Interprétations

caractéristiques dans le domaine visible (mais à de plus fortes énergies), ce qui indique aussi que ces molécules peuvent se lier au FeNTA grâce au site α -hydroxy-carbonyl (annexe). Les complexes formés sont cependant beaucoup moins stables que ceux formés par exemple avec la quercétine. Finalement, le titrage de la quercétine5OH par le FeNTA montre que le site β -hydrox-carbonyl ne permet pas de complexer efficacement le fer(III) et par conséquent constitue pas un site privilégié du FeNTA.

2. Propriétés antiradicalaires

Le Tableau 3 rassemble les résultats obtenus lors de l'étude des activités antiradicalaires obtenues avec le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]). L'acide ascorbique a été utilisé comme standard à des fins de comparaison. Les valeurs de EC₅₀ (concentration efficace de l'anti-oxydant permettant de diminuer la concentration initiale de DPPH[•] de 50%) sont inversement proportionnelles à l'activité anti-oxydante (plus le EC₅₀ est faible plus le pouvoir anti-oxydant est fort). Parmi les molécules testées, la quercétine (12,02 μ M) et la rutine (12,62 μ M) ont montré les activités antiradicalaires les plus élevées (deux fois plus puissants que l'acide ascorbique). De manière générale, les composés possédant une sous unité B catéchol (quercétine, rutine, (+)catéchine et quercétine3'4'OH) sont plus efficaces que l'acide ascorbique. La *Figure 21* et la *Figure 22* montrent respectivement un exemple de dosage du radical DPPH[•] par la rutine et l'acide ascorbique (cinétique rapide, spectres mesurés très rapidement) tandis que la *Figure 23* présente un exemple de réaction lente entre le radical DPPH[•] et le composé quercétine3'4'OH.

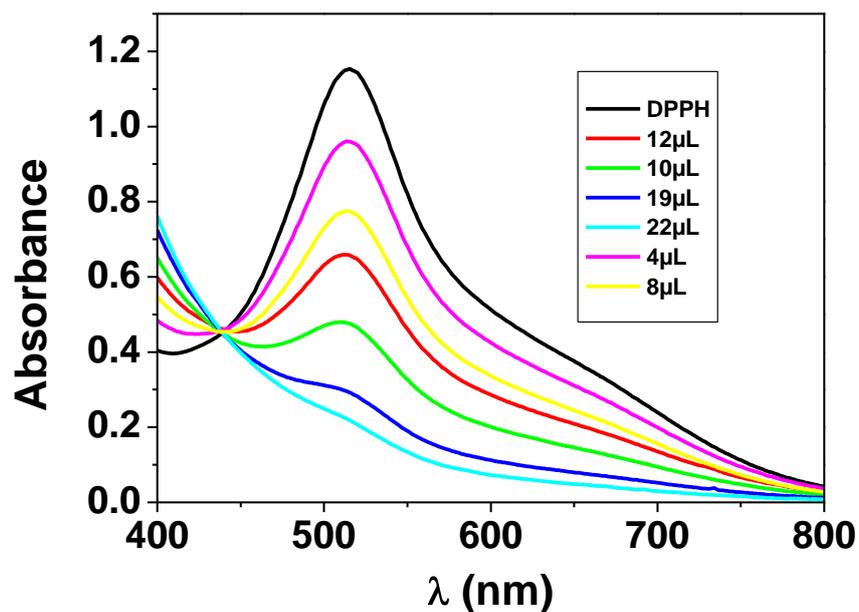


Figure 21 : Evolution de l'absorbance du DPPH (cinétique rapide) en présence de différents volumes de rutine. [DPPH]=125 μ M, [Rutine]=4mM.

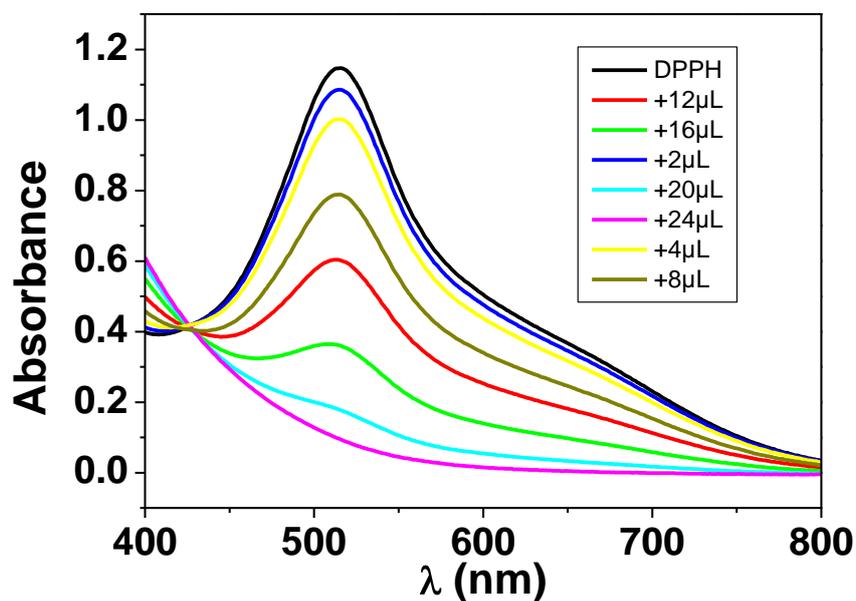


Figure 22 : Evolution de l'absorbance du DPPH (cinétique rapide) en présence de différents volumes d'acide ascorbique. [DPPH]=125 μ M, [acide ascorbique]=4 mM.

Résultats et Interprétations

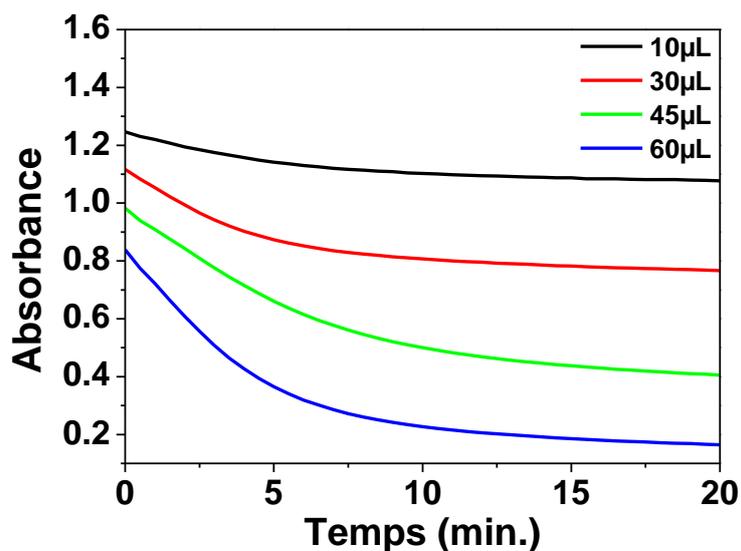


Figure 23 : Evolution de l'absorbance du DPPH (cinétique lente) en présence de différents volumes de quercétine 3',4'-OH. [DPPH]=125µM, [Q3',4'-OH]=1mM.

Tableau 3 : Concentrations efficaces ($CE_{50} \pm ET$) des flavonoïdes étudiés et du standard (acide ascorbique).

Composé	$CE_{50}(\mu M)$	Pente/ R^2
Quercétine	12,02±1,08	7,67/0,998
Rutine	12,62±0,78	7,13/0,999
Quercétine 3',4'-OH	18,16±0,65	6,61/0,998
(+)Catéchine	21,11±0,86	4,62/0,986
<i>Acide Ascorbique</i>	24,84±0,12	3,96/0,998
Quercétine 3-OH	25,72±0,46	3,24/0,999
Quercétine 3,5-OH	37,86±0,22	2,11/0,999
Quercétine 5-OH	50,27±0,08	1,79/0,999

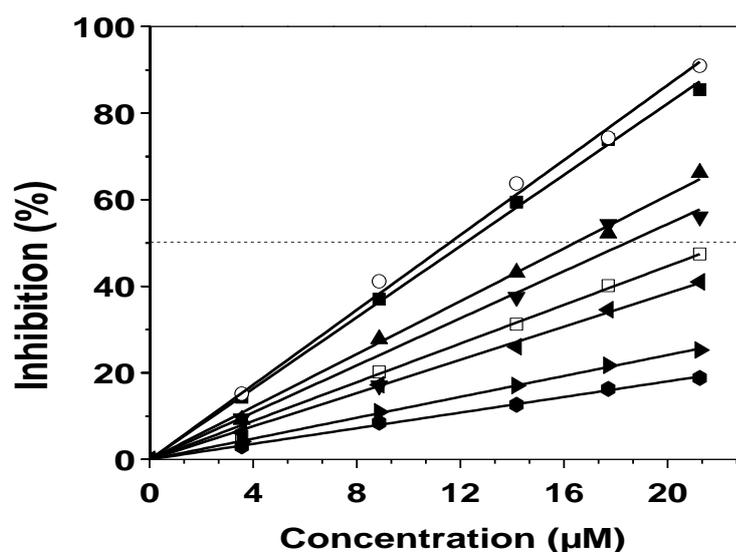


Figure 24 : Activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH' des flavonoïdes étudiés et du standard acide ascorbique.

○-Quercétine, ■-Rutine, ▲-Quercétine 3',4'OH, ▼-Catéchine, □-acide ascorbique, ◄-Quercétine 3 OH, ►-Quercétine 3,5 OH, ●-Quercétine 5 OH. L'erreur standard sur le pourcentage d'inhibition est estimée à environ 4% pour toutes les concentrations examinées.

La séquence de réactivité suivante (Figure 24) vis-à-vis du radical DPPH' a pu être établie : quercétine > rutine > quercétine3'4'OH > (+)catéchine > acide ascorbique > quercétine3OH > quercétine3,5OH > quercétine5OH. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux obtenus pour la chélation Fe(III). Ceci prouve que les flavonoïdes possédant un puissant pouvoir antiradicalaire/anti-oxydant sont également de très bon chélateurs du Fe(III).

3. Etude *in vitro* sur les globules rouges

3.1. Test d'hémolyse

Nous nous intéressons ici aux conséquences de l'addition des métaux sur l'hémolyse de globules rouges. Pour une meilleure solubilité, le fer est ajouté sous sa forme ferreuse Fe(II). Le Fe(II) s'oxyde rapidement vers sa forme ferrique Fe(III) (Ilbert & Bonnefoy, 2013). L'addition de 400 µM de Fe²⁺, de Zn²⁺ et de Cu²⁺ conduit respectivement à un taux d'hémolyse de 37%, de 22% et de 32%.

Résultats et Interprétations

La quercétine possède une activité anti-hémolytique puissante en réduisant le pourcentage d'hémolyse induit par l'addition du métal (37% à 400 μM Fe^{2+}) à des niveaux très faibles (4,18% et 7,45% à respectivement 200 et 100 μM de quercétine (*Figure 25*). Cependant, le pouvoir de protection de la quercétine vis-à-vis de l'effet du Zn^{2+} n'est pas aussi important. En effet, le pourcentage d'hémolyse initial de 33% (en présence de 400 μM de Zn^{2+}) ne décroît qu'à 28% et 22% en présence de respectivement 100 μM et 200 μM de quercétine.

Cependant, la quercétine utilisée à deux concentrations différentes (100 μM et 200 μM) montre un effet pro-oxydant en présence de Cu^{2+} . Le taux d'hémolyse augmente de 22% (à 400 μM de Cu^{2+} seul) à respectivement 35% (200 μM de quercétine) et 42% (100 μM de quercétine).

Les résultats obtenus pour la (+)catéchine (*Figure 26*) et la rutine (*Figure 27*) sont similaires. Leurs capacités à se lier au fer leur confère un puissant pouvoir antihémolytiques.

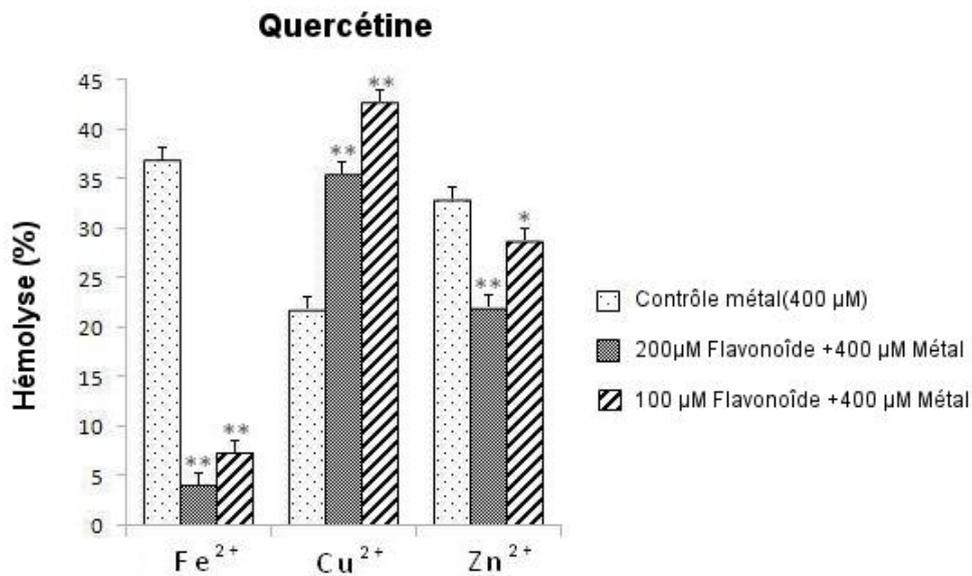


Figure 25 : Taux d'hémolyse d'une solution de globules rouges à 5% supplémentés en métaux (400 μM) en absence et en présence de quercétine (100 et 200 μM) à 37°C.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

Résultats et Interprétations

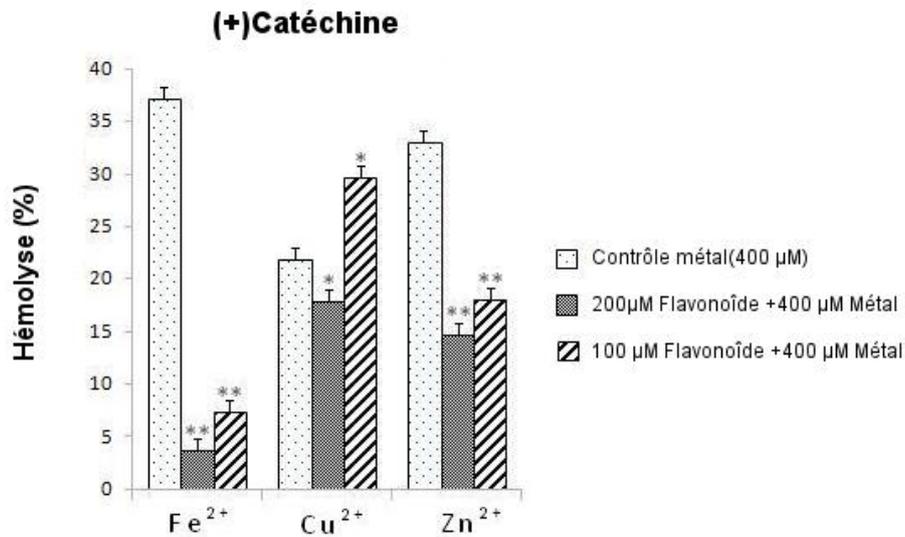


Figure 26 : Taux d'hémolyse d'une solution de globules rouges à 5% supplémentés en métaux (400 µM) en absence et en présence de (+)catéchine (100 et 200 µM) à 37 °C.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

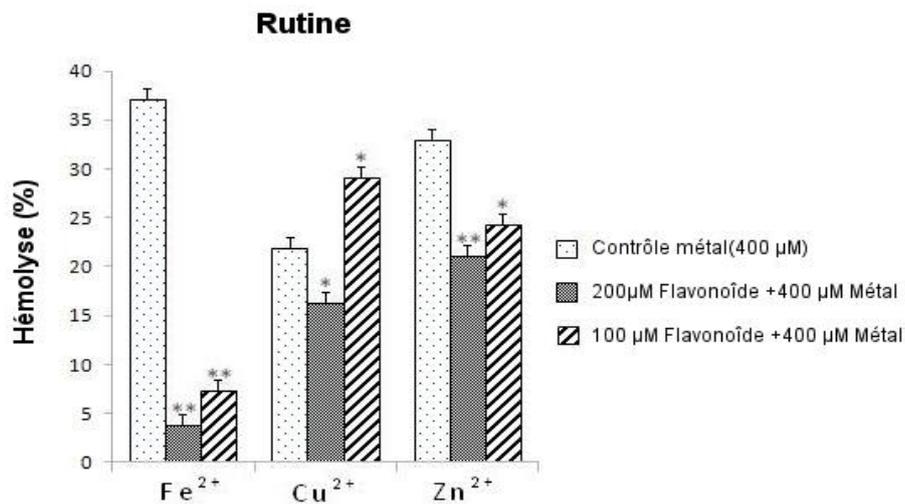


Figure 27 : Taux d'hémolyse d'une solution de globules rouges à 5% supplémentés en métaux (400 µM) en absence et en présence de rutine (100 et 200 µM) à 37 °C.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

Résultats et Interprétations

L'activité anti-hémolytique de la rutine en présence de Zn^{2+} est comparable à celle de la quercétine, alors que celle de la catéchine est plus élevée. En présence de Cu^{2+} , la catéchine et la rutine n'ont qu'un faible effet protecteur à 200 μM , qui se transforme en effet pro-oxydant à 100 μM augmentant l'hémolyse à $\sim 29\%$ et ce pour les deux molécules.

3.2. Paramètres du stress oxydatif

Le statut oxydant/anti-oxydant des globules rouges traités par les flavonoïdes en présence des trois métaux étudiés précédemment (fer, cuivre et zinc) a été évalué. Pour cela deux marqueurs du statut oxydant, le MDA et les protéines carbonylées, ainsi que trois marqueurs du statut anti-oxydant, le GSH, l'activité de la SOD et l'activité de la catalase ont été évalués.

3.2.1. Teneurs en glutathion réduit (GSH)

En présence des trois métaux étudiés les valeurs obtenues pour le glutathion réduit (GSH) - un des principaux marqueurs du statut oxydant - ont diminué significativement par rapport au contrôle (7,12 mmol/g Hb) (*Figure 28*). Cette diminution est particulièrement conséquente dans le cas du Fe^{2+} et du Zn^{2+} (4,25 et 4,97 mmol/g Hb, respectivement).

Ces valeurs changent peu (cas du Zn^{2+}) ou quasiment pas (cas du Fe^{2+}) par rapport au contrôles quand les globules rouges sont préalablement traités par les flavonoïdes. Les résultats obtenus avec le Cu^{2+} montrent une diminution prononcée du GSH quand les globules rouges sont traités par 100 μM de flavonoïdes.

3.2.2. Activité de la Catalase

Les valeurs de l'activité de la catalase ont diminué significativement par rapport au contrôle (237 U/mg Hb) en présence des ions Fe^{2+} et Cu^{2+} (*Figure 29*).

L'effet observé après supplémentation en Zn^{2+} est moins accentué. Une supplémentation en flavonoïdes (quercétine, (+)catéchine ou rutine) n'a pas d'effets notoires sur l'activité catalase en présence de Zn^{2+} . Même à des concentrations de 200 μM . Par contre, comme observé précédemment pour le GSH, un prétraitement avec des flavonoïdes permet de rétablir le taux initial de l'activité catalase en présence de Fe^{2+} spécialement pour la rutine.

Résultats et Interprétations

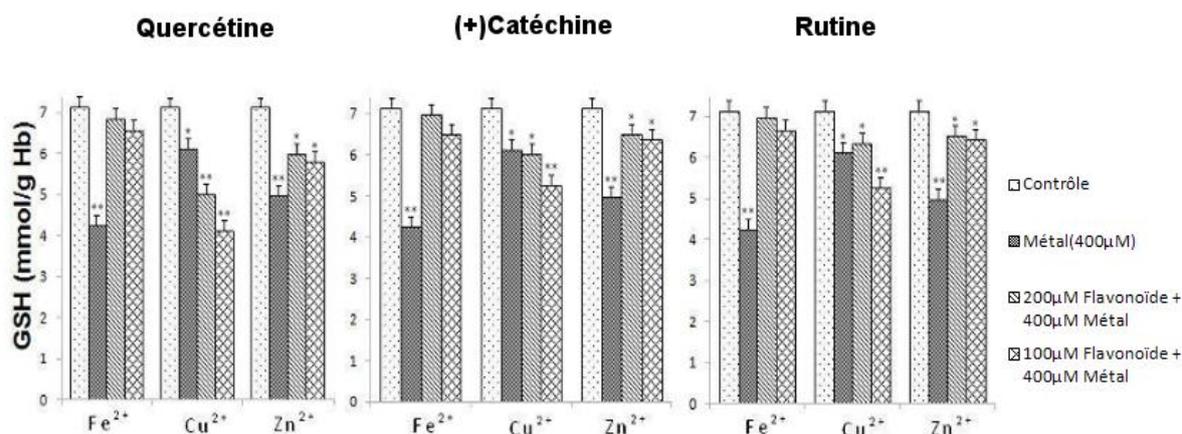


Figure 28 : Teneurs en GSH d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 µM) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 µM) à 37 °C.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

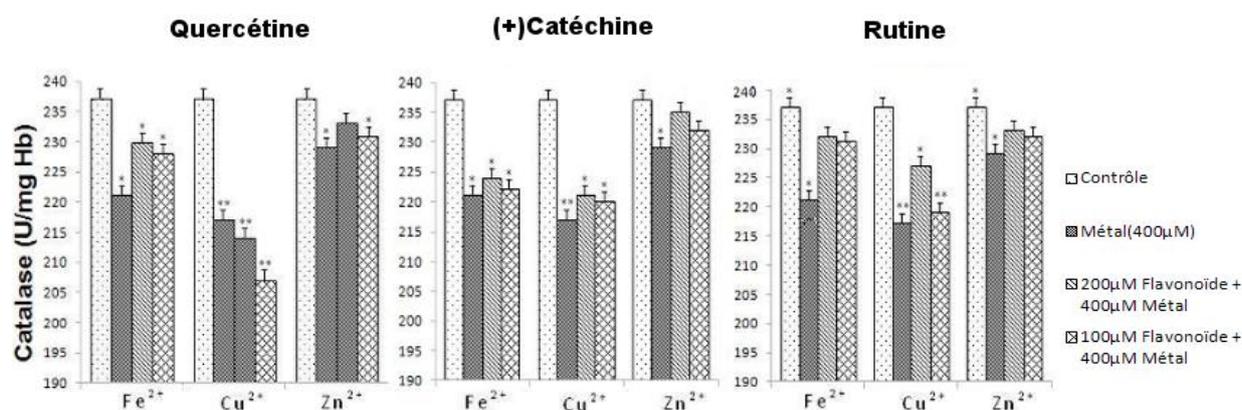


Figure 29 : Activité de la catalase d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 µM) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 µM) à 37 °C.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

Résultats et Interprétations

Il est également observé que la catéchine n'a que très peu d'effet sur l'activité catalase dans le cas des globules rouges traités par le Cu^{2+} . alors que la rutine permet de l'accroître légèrement. Cependant, en présence de 100 μM de quercétine l'activité catalase est fortement diminuée.

3.2.3. *Activité de la SOD*

Les valeurs de l'activité de la SOD obtenues pour les contrôles (1,92 U/mg Hb), sont là aussi nettement diminuées après l'addition des trois métaux (*Figure 30*). Le Cu(II) est le métal qui réduit le plus l'activité SOD (50% par rapport au contrôle), tandis que le Zn(II) présente un effet modéré sur cette enzyme (30% par rapport au contrôle). La quercétine montre un effet important sur le fer et le zinc puisque les valeurs sont comparables au contrôle, elle n'a par contre qu'un effet modéré quand les globules rouges sont supplémentés en cuivre.

La catéchine et la rutine ont des effets assez comparables en présence des trois métaux. Ces deux flavonoïdes n'ont que peu d'effets sur l'activité SOD des globules rouges surchargés en métaux, puisque les valeurs ne restent comparables à celles obtenues pour les globules rouges en présence de métaux uniquement.

3.2.4. *Teneurs en malondialdéhyde (MDA)*

En ce qui concerne le statut oxydant, les valeurs du MDA (*Figure 31*); marqueur de peroxydation lipidique; sont fortement augmentées en présence de Fe^{2+} et de Zn^{2+} (*Figure 31*). Ces valeurs passent de 0,29 nmol/g Hb (contrôle) à respectivement 0,44 (Fe^{2+}) et 0,49 nmol/g Hb (Zn^{2+}). Pour le Cu^{2+} , cet effet est plus faible (augmentation de 20% par rapport au contrôle pour 400 μM de Cu^{2+}).

Ceci contraste avec les résultats obtenus en présence d'excès de cuivre où les complexes Cu(I)-catécholates générés (100 μM) causent une augmentation significative du taux de MDA. A de plus fortes concentrations en flavonoïdes cet effet pro-oxydant est atténué.

Résultats et Interprétations

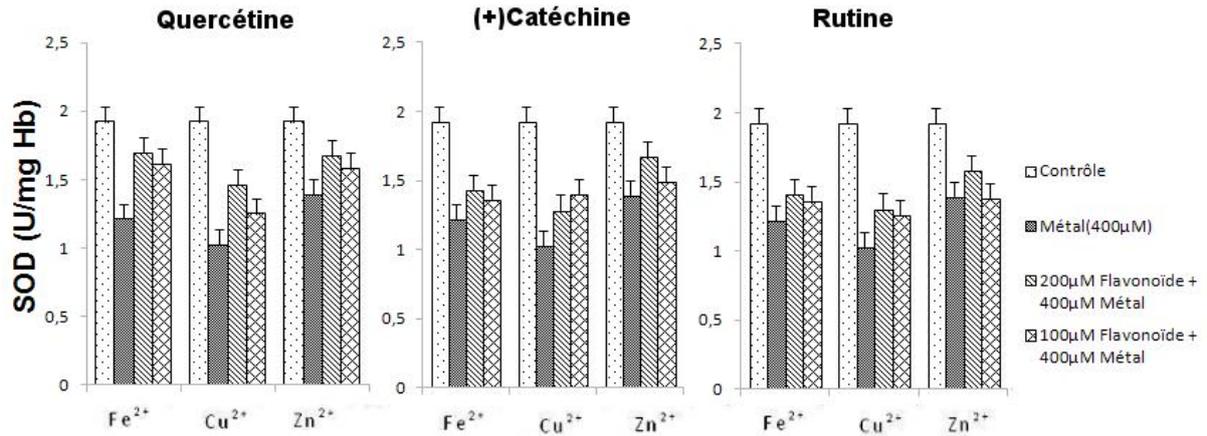


Figure 30 : Activité SOD d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 µM) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200µM) à 37°C.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

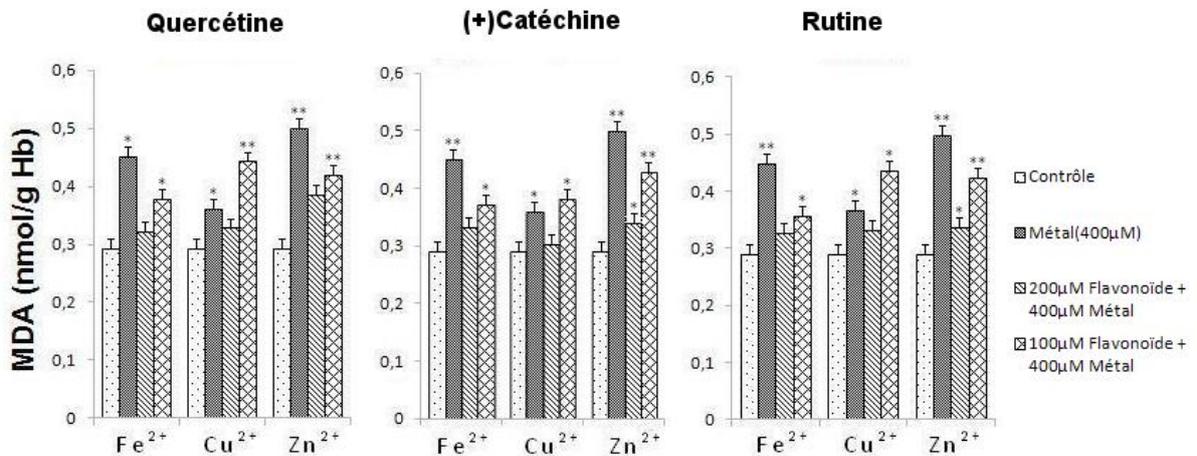


Figure 31 : Teneurs en MDA d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 µM) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 µM) à 37 °C.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

Résultats et Interprétations

3.2.5. Teneurs en protéines carbonylées (PC)

Les teneurs en protéines carbonylées (PC) ont augmenté d'une valeur de 2,66 nmol/mg de protéines (contrôle) pour atteindre respectivement 4,67 (Fe^{2+}), 3,78 (Cu^{2+}) et 4,46 (Zn^{2+}) nmol/mg, confirmant là aussi l'effet pro-oxydant des ions métalliques étudiés (Figure 32). En présence de Fe^{2+} , les trois flavonoïdes ont permis de conserver un taux de PC à des valeurs comparables au contrôle, la quercétine étant la plus puissante dans ce rôle. Pour les globules rouges traités avec les ions Zn^{2+} , les taux de PC ont également diminués en présence de flavonoïdes. Cependant l'effet est ici plus modéré. L'augmentation du taux de PC des globules rouges traités avec les ions Cu^{2+} , et en présence de flavonoïdes, vient conforter l'effet pro-oxydant de ce dernier déjà observé sur les paramètres étudiés précédemment.

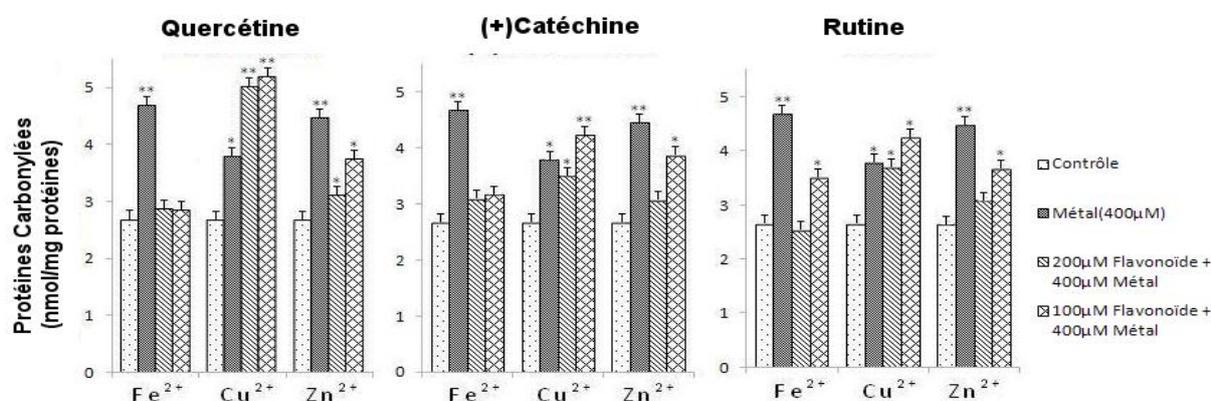


Figure 32 : Teneurs en PC d'une solution de globules rouges à 5% supplémentées en métaux (400 μM) en absence et en présence de flavonoïdes (100 et 200 μM) à 37°C.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

4. Etude *in vitro* sur les lymphocytes

Cette partie est dédiée à l'étude de l'effet de quatre flavonols (la quercétine et trois de ses dérivés méthylés : quercétine 3'4'OH noté Q3'4'OH, quercétine 3OH noté Q3OH et quercétine 5OH noté Q5OH) et de trois flavanols (la (+)-catéchine, l'épicatéchine, notée EC, et l'épigallo-catéchine-gallate, notée EGCG) en présence du Fe^{2+} , du Cu^{2+} et du Zn^{2+} sur un deuxième modèle cellulaire : le lymphocyte.

4.1. Indice de prolifération

La *Figure 37* et la *Figure 38* montrent l'effet des flavonoïdes étudiés à différentes concentrations (25, 50 et 100 μM) sur l'indice de prolifération lymphocytaire en présence de l'ion Zn^{2+} à une concentration de 100 μM .

L'effet du zinc sur la prolifération lymphocytaire présente une diminution significative. Cependant, en présence de quercétine et de Q3'4'OH (noyau catéchol) et en présence de catéchine, d'épicatéchine et d'EGCG (Flavanols), cette prolifération décroît rapidement à mesure que les concentrations en flavonoïdes augmentent indiquant très clairement un effet négatif sur la viabilité cellulaire. Il est également à souligner qu'en présence de Quercétine 5OH la prolifération lymphocytaire ne montre pas de changements significatifs.

Le fer (*Figure 33* et *Figure 34*) et le cuivre (*Figure 35* et *Figure 36*) entraînent par contre une diminution significative de la prolifération lymphocytaire. L'association entre flavonoïdes et Cu(II) entraîne une diminution plus accentuée de la viabilité des cellules lymphocytaires d'autant plus que la concentration augmente. Les valeurs obtenues sont comparables à celle du Zn(II) pour des concentrations équivalentes.

L'addition de flavonoïdes en présence de Fe(II) induit par contre une augmentation de la prolifération lymphocytaire et rétablit les valeurs obtenues à des niveaux comparables à ceux des contrôles, et permet même de le surpasser pour des concentrations plus élevées en flavonoïdes (*Figure 33* et *Figure 34*). On remarque là aussi que la Q3OH n'a que peu d'effet sur l'évolution de la viabilité cellulaire en présence des ions métalliques et que le composé Q5OH n'a pas d'effets significatifs.

Résultats et Interprétations

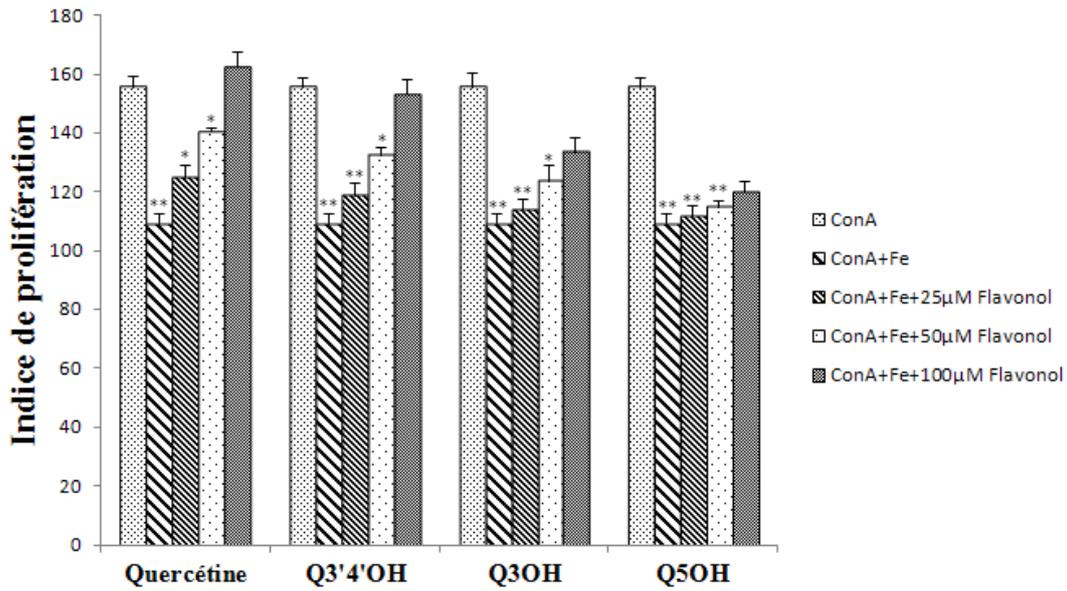


Figure 33 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μM de Fe^{2+} pour les différents flavonols étudiés à 37°C et 5% CO_2

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$

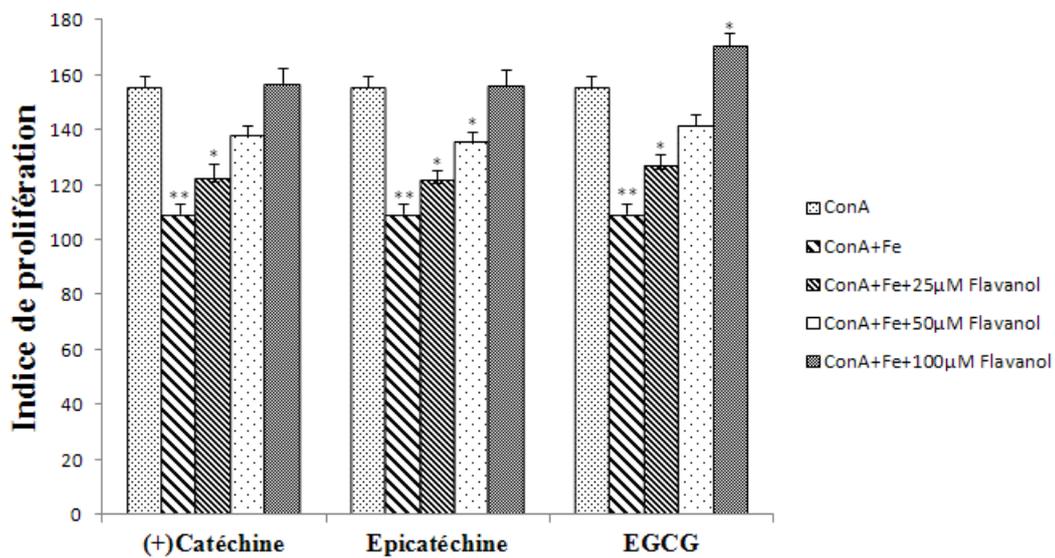


Figure 34 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μM de Fe^{2+} pour les différents flavanols étudiés à 37°C et 5% CO_2

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Résultats et Interprétations

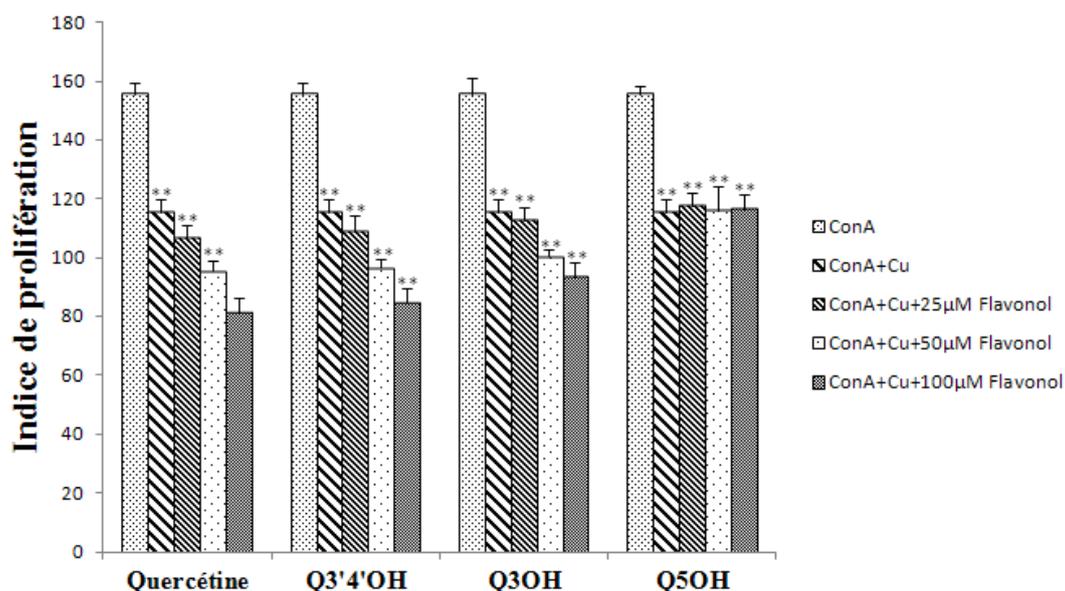


Figure 35 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 µM de Cu² pour les différents flavonols étudiés à 37°C et 5% CO₂.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

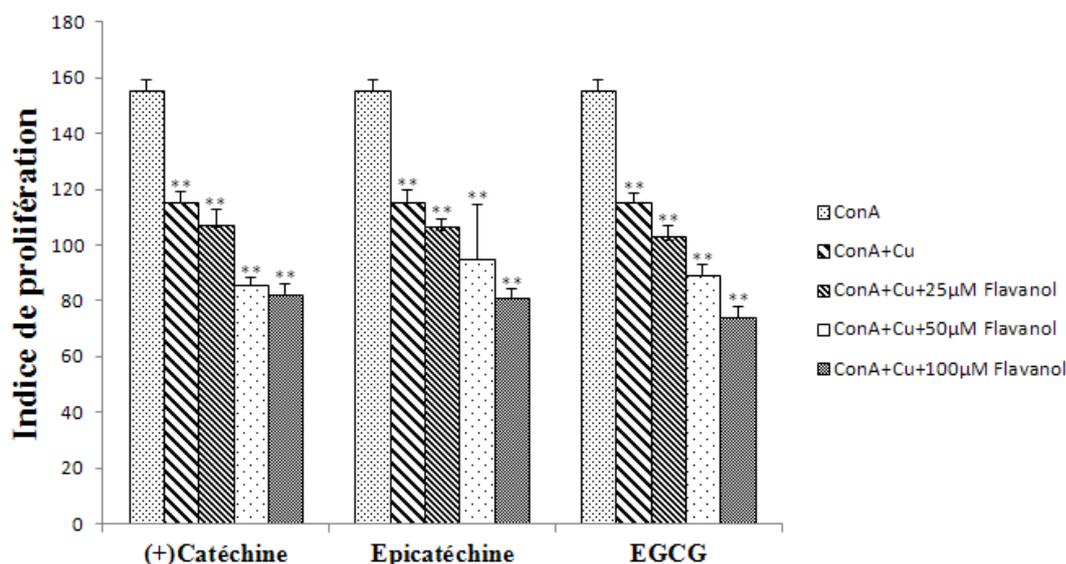


Figure 36 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100µM de Cu² pour les différents flavanols étudiés à 37°C et 5% CO₂.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * P < 0,05; ** p < 0,01.

Résultats et Interprétations

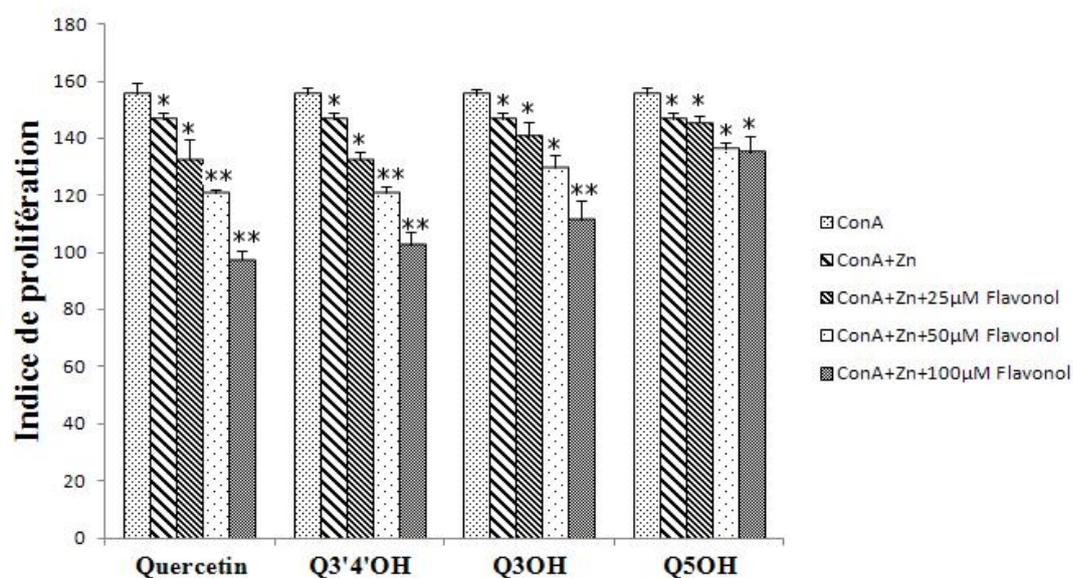


Figure 37 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μM de Zn^{2+} pour les différents flavonols étudiés à 37°C et 5% CO_2 .

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$.

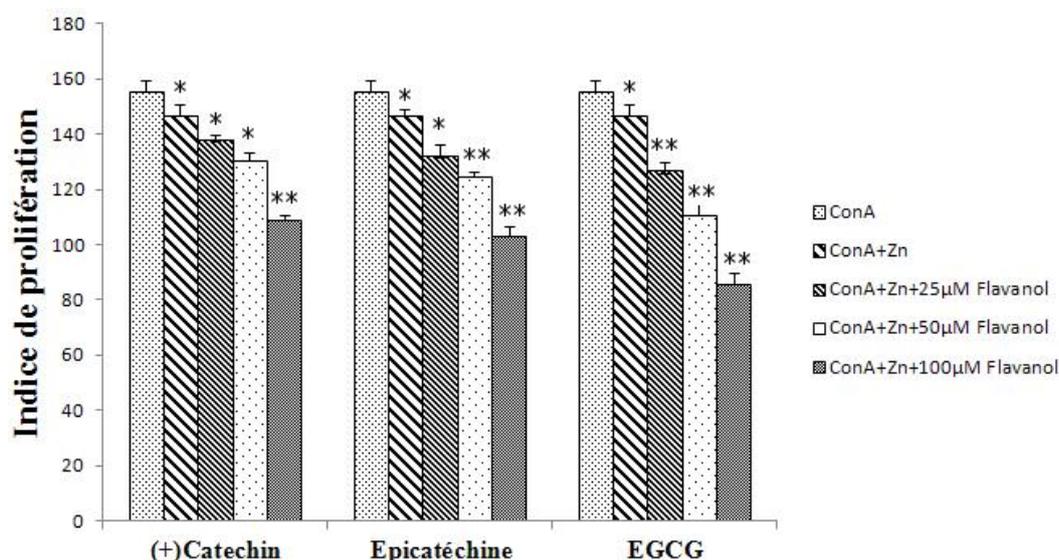


Figure 38 : Indice de prolifération lymphocytaire en présence de 100 μM de Zn^{2+} pour les différents flavanols étudiés à 37°C et 5% CO_2 .

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ; n=6. La comparaison des moyennes entre contrôles et échantillons traités est effectuée par le test de Student apparié : * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2. Paramètres du stress oxydatif

4.2.1. Le fer

Le Tableau 4 et le Tableau 5 représentent les valeurs des différents paramètres du stress oxydant des cellules lymphocytaires traitées par le Fe(II) en présence de concentrations croissantes de flavonoïdes.

En présence de fer (100 μ M) la viabilité cellulaire a diminué significativement, ce qui se traduit naturellement par une augmentation du stress oxydant. Les taux de MDA et de PC ont augmenté de manière significative, alors que les taux de GSH et de SOD ont diminué également de manière significative. Cependant, le taux de l'activité catalase a augmenté de manière significative (22%). L'addition des flavonoïdes à noyau catécholate rétablit là aussi les paramètres du stress oxydant vers des valeurs comparables aux contrôles.

L'EGCG est particulièrement efficace puisqu'à une concentration de 100 μ M les valeurs contrôles sont rétablies, alors que la Q5OH est le moins efficace des flavonoïdes étudiés, ce qui est certainement dû à l'absence du noyau catécholate.

Résultats et Interprétations

Tableau 4 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Fe²⁺ pour les différents flavonols étudiés

	SOD	Catalase	GSH	PC	MDA
Contrôle					
ConA	2,73 ± 0,23	148,6 ± 4,74	20,67±1,33	2,94±0,24	21,2±0,35
ConA+ Fe	1,71 ± 0,25**	190,2 ± 6,07*	11,17±1,17**	5,34±0,5**	36,14±1,4**
Q					
ConA+Fe+25µM Flavonol	1,95 ± 0,26**	176,89 ± 5,64*	13,4±1,43**	4,07±0,57*	33,43±0,72**
ConA+ Fe +50µM Flavonol	2,25 ± 0,32	164,51 ± 5,25	16,08±1,71**	3,68±0,34*	29,52±1,27**
ConA+Fe+100µM Flavonol	2,45 ± 0,18	152,99 ± 4,88	19,29±2,05	3,22±0,36*	25,01±0,47*
Q3'4'OH					
ConA+ Fe+25µM Flavonol	1,88 ± 0,03**	180,69 ± 5,76*	12,14±0,64**	4,64±0,48**	34,09±2,3**
ConA+ Fe+50µM Flavonol	2,13 ± 0,06*	171,66 ± 5,48	14,56±0,76**	3,99±0,43*	30,35±1,44**
ConA+Fe+100µM Flavonol	2,3 ± 0,06	163,08 ± 5,2	17,48±0,92*	3,59±0,17*	26,5±0,67**
Q3OH					
ConA+Fe+25µM Flavonol	1,8 ± 0,05**	182,6 ± 5,82*	11,14±0,72**	4,76±0,31**	35,16±1,29**
ConA+Fe+50µM Flavonol	2,04 ± 0,04*	175,29 ± 5,59*	13,37±0,86**	4,24±0,35**	32,38±1,81**
ConA+Fe+100µM Flavonol	2,18 ± 0,04*	168,28 ± 5,37	16,04±1,03**	3,94±0,34*	30,3±2,08**
Q5OH					
ConA+Fe+25µM Flavonol	1,75 ± 0,04**	184,5 ± 5,89*	10,66±0,2**	4,77±0,35**	36,08±1,04**
ConA+Fe+50µM Flavonol	1,8 ± 0,07**	178,96 ± 5,71*	12,79±0,24**	4,69±0,39**	35,54±1,13**
ConA+Fe+100µM Flavonol	1,85 ± 0,05**	173,59 ± 5,54	15,35±0,29**	4,16±0,33*	34,62±1,51**

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ±écart type (ET), n=6. Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puits). Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multi-puits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 mn à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48 h à 37 °C et 5% de CO₂. (test de Student apparié *P < 0.05. **P < 0.01).

Résultats et Interprétations

Tableau 5 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Fe²⁺ pour les différents flavanols étudiés

	SOD	Catalase	GSH	PC	MDA
Contrôle					
ConA	2,73 ± 0,23	148,6 ± 4,74	20,67±1,33	2,94±0,24	21,2±0,35
ConA+Fe	1,71 ± 0,25**	190,2 ± 6,07*	11,17±1,17**	5,34±0,5**	36,14±1,4**
Catéchine					
ConA+Fe+25µM Flavanol	1,88 ± 0,07**	178,79 ± 5,7*	12,21±0,56**	4,13±0,65*	34,5±1,15**
ConA+Fe+50µM Flavanol	2,18 ± 0,04*	168,06 ± 5,36	14,8±0,74**	3,86±0,35*	30,55±1**
ConA+Fe+100µM Flavanol	2,38 ± 0,08	157,98 ± 5,04	17,72±0,87*	3,62±0,37*	28,22±1,67**
Epicatéchine					
ConA+Fe+25µM Flavanol	1,95 ± 0,03**	176,51 ± 5,63*	12,27±0,52**	4,13±0,65**	32,86±1,6**
ConA+Fe+50µM Flavanol	2,28 ± 0,01	163,8 ± 5,23	15,17±0,62**	3,68±0,34*	30,4±2,49**
ConA+Fe+100µM Flavanol	2,45 ± 0,07	152,01 ± 4,85	18,37±0,46	3,5±0,32*	27,12±0,68**
Epigallocatechine gallate					
ConA+Fe+25µM Flavanol	2,03 ± 0,08*	174,99 ± 5,58*	14,08±0,94**	3,85±0,4*	32,06±0,84**
ConA+Fe+50µM Flavanol	2,38 ± 0,05	160,99 ± 5,14	16,74±1,01*	3,36±0,31*	26,76±1,04**
ConA+Fe+100µM Flavanol	2,63 ± 0,07	151,33 ± 4,83	19,91±0,91	3,29±0,27*	24,7±1,22*

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ±écart type (ET), n=6. Les lymphocytes sont mis en culture (4x10⁵ cellules/puits). Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multi-puits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 mn à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48h à 37 °C et 5% de CO₂. (test de Student apparié *P < 0.05. **P < 0.01).

Résultats et Interprétations

4.2.2. *Le cuivre*

Le Tableau 6 et le Tableau 7 présentent les valeurs des différents paramètres du stress oxydant des cellules lymphocytaires traitées par le Cu(II) en présence de concentrations croissantes de flavonoïdes.

L'effet oxydant du Cu(II) est clairement établi là aussi, puisque les taux de MDA et de PC sont significativement élevés par rapport aux contrôles, alors que les taux de GSH et de SOD diminuent de manière toute aussi significative. On observe, comme précédemment pour le fer, une augmentation de l'activité de la catalase (18%), ce qui est comparable aux valeurs obtenues avec le Fe(II).

De manière générale les teneurs en MDA et PC augmentent significativement en présence de flavonoïdes alors que l'activité de la SOD diminue significativement (45% pour l'EGCG à 100 μ M).

Résultats et Interprétations

Tableau 6 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Cu²⁺ pour les différents flavonols étudiés

	SOD	Catalase	GSH	PC	MDA
Contrôle					
ConA	2,73 ± 0,68	148,6 ± 4,74	20,67 ± 1,33	2,94±0,24	21,2±0,35
ConA+ Cu	2,01 ± 0,29*	181,29 ± 5,78*	14,85 ± 0,71**	4,91±0,58**	27,1±1,05** ^e
Q					
ConA+Cu+25µM Flavonol	1,9 ± 0,29**	192,1 ± 6,13**	15,89 ± 0,76**	5,01±0,35**	29,27±1,14**
ConA+ Cu+50µM Flavonol	1,75 ± 0,36**	203,7 ± 6,5**	16,51 ± 0,73*	5,51±0,39**	31,61±1,23**
ConA+Cu+100µM Flavonol	1,65 ± 0,2**	215,92 ± 6,89**	16,24 ± 0,7*	6,06±0,42**	34,14±1,33**
Q3'4'OH					
ConA+ Cu +25µM Flavonol	1,98 ± 0,15**	190,35 ± 6,07*	15,89 ± 0,38**	4,82±0,26**	28,47±1,47**
ConA+ Cu +50µM Flavonol	1,88 ± 0,26**	199,87 ± 6,38**	16,35 ± 1,31*	5,3±0,29**	30,75±1,59**
ConA+Cu+100µM Flavonol	1,8 ± 0,29**	209,86 ± 6,69**	16,19 ± 0,74*	5,83±0,31**	33,21±1,72**
Q3OH					
ConA+ Cu +25µM Flavonol	1,98 ± 0,22**	186,73 ± 5,96*	15,22 ± 1,39**	4,85±0,17**	25,15±0,98*
ConA+ Cu+50µM Flavonol	1,93 ± 0,18**	192,33 ± 6,14**	15,85 ± 1,15**	5,01±0,35**	27,16±1,06***
ConA+Cu+100µM Flavonol	1,9 ± 0,19**	198,1 ± 6,32**	15,69 ± 0,73**	5,18±0,37**	29,33±1,14**
Q5OH					
ConA+ Cu +25µM Flavonol	2 ± 0,16	184,01 ± 5,87*	14,69 ± 1,51**	4,96±0,53**	23,31±1,28
ConA+ Cu +50µM Flavonol	2,05 ± 0,3	186,77 ± 5,96*	14,56 ± 1**	4,99±0,54**	23,77±1,31
ConA+Cu+100µM Flavonol	1,98 ± 0,22	189,57 ± 6,05*	14,1 ± 0,51**	5,17±0,25**	24,25±1,33

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ±écart type (ET), n=6. Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puits). Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multi-puits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 mn à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48h à 37 °C et 5% de CO₂. (test de Student apparié *P < 0.05. **P < 0.01).

Résultats et Interprétations

Tableau 7 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Cu²⁺ pour les différents flavanols étudiés

	SOD	Catalase	GSH	PC	MDA
Contrôle					
ConA	2,73 ± 0,68	148,6 ± 4,74	20,67 ± 1,33	2,94±0,24	21,2±0,35
ConA+Cu	2,01 ± 0,29*	181,29 ± 5,78*	14,85 ± 0,71**	4,91±0,58**	27,1±1,05**
Catéchine					
ConA+ Cu+25µM Flavanol	1,91 ± 0,33**	193,07 ± 6,16**	15,56 ± 0,66**	4,79±0,6**	28,74±2,22**
ConA+Cu+50µM Flavanol	1,77 ± 0,18**	205,62 ± 6,56**	16,74 ± 0,53*	5,43±0,57**	31,04±2,4**
ConA+Cu+100µM Flavanol	1,72 ± 0,35**	218,99 ± 6,99**	16,84 ± 0,5*	5,94±0,32**	33,52±2,59**
Epicatéchine					
ConA+ Cu +25µM Flavanol	1,85 ± 0,13**	192,53 ± 6,14**	15,79 ± 0,49**	5,19±0,48**	28,66±2,43**
ConA+ Cu +50µM Flavanol	1,72 ± 0,06**	204,46 ± 6,52**	16,68 ± 0,31*	5,86±0,2**	30,95±2,62**
ConA+Cu+100µM Flavanol	1,63 ± 0,3**	217,14 ± 6,93**	16,86 ± 0,28*	6,18±0,13**	33,43±2,83**
Epigallocatechine gallate					
ConA+ Cu+25µM Flavanol	1,8 ± 0,34**	194,88 ± 6,22**	16,61 ± 0,28*	5,97±0,37**	30,16±1,64**
ConA+ Cu+50µM Flavanol	1,66 ± 0,23**	209,5 ± 6,68**	17,71 ± 0,58*	6,31±0,61**	32,57±1,77**
ConA+Cu+100µM Flavanol	1,5 ± 0,31**	225,21 ± 7,18**	19,62 ± 0,51	6,88±0,23**	35,18±1,91**

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ±écart type (ET), n=6. Les lymphocytes sont mis en culture (4x10⁵ cellules/puits). Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multi-puits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 mn à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48h à 37°C et 5% de CO₂. (test de Student apparié *P < 0.05. **P < 0.01).

Résultats et Interprétations

4.2.3. *Le zinc*

En ce qui concerne le Zn(II), le Tableau 8 et le Tableau 9 montrent les valeurs obtenues pour les différents paramètres du stress oxydant des cellules lymphocytaires traitées par le Zn(II) en présence de concentrations croissantes de flavonoïdes. Les valeurs obtenues dans le Tableau 8 et le Tableau 9 sont comparables à celles obtenues pour le fer dans le sens que l'addition de flavonoïdes atténue l'effet néfaste du Zn(II) sur les paramètres du stress oxydant. En effet, les niveaux du MDA, des PC et du GSH sont rétablis vers des valeurs comparables aux contrôles. Cependant, une diminution significative des activités de la catalase et de la SOD est observée (respectivement 43% et 40%) pour l'EGCG à 100 μ M, ce qui est comparable aux résultats obtenus précédemment pour l'EGCG à 100 μ M en présence des ions Zn(II).

Résultats et Interprétations

Tableau 8 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Zn²⁺ pour les différents flavonols étudiés

	SOD	Catalase	GSH	PC	MDA
Contrôle					
ConA	2,73 ± 0,15	148,6 ± 4,74	20,67 ± 1,33	2,94 ± 0,24	21,2 ± 0,35
ConA+Zn	2,49 ± 0,06	146,67 ± 2,08	13,97 ± 1,46**	4,56 ± 0,51**	30,11 ± 1,17**
Q					
ConA+Zn+25µM Flavonol	2,27 ± 0,07	131,67 ± 3,06**	15,55 ± 0,84**	3,7 ± 0,52*	27,86 ± 0,6**
ConA+Zn+50µM Flavonol	1,85 ± 0,08**	113 ± 5,57**	16,69 ± 0,73*	3,35 ± 0,31*	24,6 ± 1,06*
ConA+Zn+100µM Flavonol	1,52 ± 0,04**	92 ± 5,29**	16,29 ± 0,91**	2,93 ± 0,33	20,84 ± 0,4
Q3'4'OH					
ConA+Zn+25µM Flavonol	2,25 ± 0,03	132,33 ± 2,52**	15,89 ± 0,38**	4,22 ± 0,44**	28,41 ± 1,92**
ConA+Zn+50µM Flavonol	1,82 ± 0,06**	120,67 ± 2,08**	16,35 ± 1,31**	3,63 ± 0,4*	25,29 ± 1,2*
ConA+Zn+100µM Flavonol	1,47 ± 0,06**	102,67 ± 4,16**	16,19 ± 0,74**	3,26 ± 0,16*	22,08 ± 0,56
Q3OH					
ConA+Zn+25µM Flavonol	2,29 ± 0,05	140,67 ± 4,73*	14,89 ± 1,35**	4,33 ± 0,28**	29,3 ± 1,07**
ConA+Zn+50µM Flavonol	2,04 ± 0,04*	129,67 ± 2,08**	15,85 ± 1,15**	3,85 ± 0,32*	26,98 ± 1,51**
ConA+Zn+100µM Flavonol	1,93 ± 0,04**	111,67 ± 3,06**	15,91 ± 0,89**	3,58 ± 0,31*	25,25 ± 1,74*
Q5OH					
ConA+Zn+25µM Flavonol	2,34 ± 0,04	145,33 ± 2,52	14,69 ± 1,51	4,34 ± 0,32	30,07 ± 0,87**
ConA+Zn+50µM Flavonol	2,13 ± 0,07*	135,33 ± 3,51*	14,56 ± 1	4,27 ± 0,35	29,62 ± 0,95**
ConA+Zn+100µM Flavonol	2,05 ± 0,05*	131,33 ± 6,11**	14,47 ± 1,23	3,78 ± 0,3	28,85 ± 1,25**

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± écart type (ET), n=6. Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puits). Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multi-puits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 mn à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48h à 37°C et 5% de CO₂. (test de Student apparié *P < 0.05. **P < 0.01).

Résultats et Interprétations

Tableau 9 : Valeurs des paramètres du stress oxydant au niveau du lysat des lymphocytes traités par 100µM de Zn²⁺ pour les différents flavanols étudiés

	SOD	Catalase	GSH	PC	MDA
Contrôle					
ConA	2,73 ± 0,15	148,6 ± 4,74	20,67 ± 1,33	2,94 ± 0,24	21,2 ± 0,35
ConA+Zn	2,49 ± 0,06	146,67 ± 2,08	13,97 ± 1,46**	4,56 ± 0,51**	30,11 ± 1,17**
Catéchine					
ConA+Zn+25µM Flavanol	2,14 ± 0,07*	124,67 ± 4,16**	14,89 ± 0,69**	3,75 ± 0,59*	28,75 ± 0,95**
ConA+Zn+50µM Flavanol	1,61 ± 0,04**	115,33 ± 4,62**	16,36 ± 1,29**	3,51 ± 0,32*	25,46 ± 0,84*
ConA+Zn+100µM Flavanol	1,27 ± 0,08**	98,33 ± 5,51**	16,41 ± 0,87*	3,29 ± 0,33*	23,52 ± 1,39
Epicatéchine					
ConA+Zn+25µM Flavanol	2,29 ± 0,03	123,67 ± 5,13**	15,45 ± 1**	3,75 ± 0,59*	27,38 ± 1,33**
ConA+Zn+50µM Flavanol	1,86 ± 0,01**	112,33 ± 2,52**	16,36 ± 0,49**	3,35 ± 0,31*	25,33 ± 2,08*
ConA+Zn+100µM Flavanol	1,68 ± 0,07**	91,33 ± 2,31**	16,89 ± 1,1*	3,18 ± 0,29*	22,6 ± 0,57
Epigallocatechine gallate					
ConA+Zn+25µM Flavanol	2,27 ± 0,08	122,67 ± 4,93**	16,3 ± 0,61**	3,5 ± 0,37*	26,72 ± 0,7**
ConA+Zn+50µM Flavanol	1,81 ± 0,05**	106 ± 3,46**	17,77 ± 0,51*	3,05 ± 0,28	22,3 ± 0,87
ConA+Zn+100µM Flavanol	1,63 ± 0,07**	87 ± 7,21**	19,5 ± 0,64	2,99 ± 0,25	20,58 ± 1,02

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ±écart type (ET), n=3. Les lymphocytes sont mis en culture (4x10⁵ cellules/puits). Les flavonoïdes sont distribués dans une plaque multi-puits à différentes concentrations, puis celle-ci est incubée 30 mn à 37°C et 5% de CO₂. Une fois l'incubation achevée, les solutions aqueuses de métaux sont disposées dans la plaque et l'incubation poursuivie 48h à 37 °C et 5% de CO₂. (test de Student apparié *P < 0.05. **P < 0.01).

Discussion

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'effet *in vitro* de deux métaux redox (fer et cuivre) et d'un métal inerte électrochimiquement (zinc) sur deux modèles cellulaires à savoir les globules rouges et les lymphocytes humains en présence et en absence d'une large variété de flavonoïdes représentatifs.

Nous avons réalisé en premier lieu une étude physico-chimique pour déterminer les pouvoirs anti-oxydants de ces flavonoïdes ainsi que les interactions possibles entre ces molécules et les ions métalliques étudiés.

Nous avons ensuite examiné l'effet du stress généré par de grandes concentrations en ions métalliques sur la viabilité cellulaire ainsi que l'effet potentiellement protecteur d'une série de flavonoïdes, puis nous avons évalué le statut oxydant/anti-oxydant de ces modèles. Nous avons comparé par la suite ces données biochimiques aux résultats physico-chimiques relatifs aux flavonoïdes et aux interactions métaux-flavonoïdes.

Les interactions entre flavonoïdes et métaux peuvent conduire à la formation de complexes appelés chélates. En fonction de la nature du cation métallique, la formation de ces complexes peut prévenir la formation de radicaux libres susceptibles d'endommager les cellules de l'organisme, mais peut également induire un effet pro-oxydant. La formation de ces complexes dépendra de la structure du flavonoïde et du métal mis en contact avec ce dernier. Il existe dans cette structure trois sites de coordination bidentés potentiels :

- 1) le groupement 3-hydroxyl et le groupement 4-carbonyl du cycle C
- 2 le groupement 5-hydroxyl et le groupement 4-carbonyl des cycles A et C
- 3) les groupements 3', 4'-hydroxyl du cycle B

A la lumière de résultats obtenus à partir des flavonoïdes de synthèse et de trois autres flavonoïdes naturels étudiés (quercétine, (+)-catéchine et rutine), il est évident que les flavonoïdes naturels se complexent aux métaux mais avec des constantes de stabilité variables. Les flavonoïdes de synthèse se complexent tous au fer à l'exception du composé Q5OH. Ceci démontre que le site coordination entre le groupement 5-hydroxyl et le groupement 4-carbonyl n'est pas un bon site de chélation pour le fer(III). Ceci a été

Discussion

également vérifié pour le cuivre et le zinc. Le composé Q3OH est capable de fixer le fer sur son site de coordination entre le groupement 3-hydroxyle et le groupement 4-carbonyle, ce qui montre l'importance de la présence de la fonction carbonyle dans la structure de ces flavonoïdes.

Les résultats obtenus grâce au test DPPH montrent que la quercétine est le composé avec le pouvoir antiradicalaire le plus élevé, alors que Q5OH n'est que faiblement anti-oxydante. Q3'4'OH possède un pouvoir antiradicalaire supérieur à celui de l'acide ascorbique (puissant anti-oxydant) et à celui de la catéchine (flavanol). Ceci est probablement dû à la présence de la fonction carbonyle sur le cycle C.

Ces résultats physico-chimiques montrent que : i) l'activité antioxydante des flavonoïdes repose sur le nombre et la position des fonctions hydroxyles ainsi que sur la présence d'une fonction carbonyle sur le cycle C ; ii) la présence de fonctions hydroxyles en 3' et 4' (cycle B, position ortho) est primordiale pour l'activité anti-oxydante et pour la chélation des métaux.

Au niveau cellulaire, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un sous-produit du métabolisme de l'oxygène et présent à de faibles concentrations (de l'ordre du micro-molaire), est relativement inoffensif car il est faiblement réactif. Cependant, les ions métalliques sous leurs formes réduites (fer(II), cuivre(I)) catalysent la conversion du H_2O_2 en un radical extrêmement réactif et nocif : le radical hydroxyle (HO^\bullet). Les ions ferreux peuvent générer dans les fluides biologiques en présence d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) les espèces réactives de l'oxygène (ERO) capables d'endommager les cellules. Les ions ferreux sont relativement instables en milieu aqueux et tendent à réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire pour se transformer en ions ferriques et en anion superoxyde (Jones - Lee & Lee, 2005). D'autre part les flavonoïdes peuvent soit lier le Fe(II) prévenant ainsi la réaction de cet ion pro-oxydant, soit favoriser l'oxydation de la forme ferreuse instable en forme ferrique plus stable (auto-oxydation) incapable de participer à la réaction de Fenton.

L'exposition des érythrocytes au stress induit par les ions fer cause des altérations intracellulaires traduites par une oxydation de l'hémoglobine, par la formation d'hémichromes liés aux membranes et la modification des composants membranaires comme conséquence de la peroxydation lipidique (Rice-Evans, 1990). Dans nos conditions expérimentales, une importante hémolyse a été observée (37% à 400 μM de Fe^{2+}). Un prétraitement des globules rouges avec la quercétine, la (+)-catéchine ou la rutine prévient quasi totalement cette

Discussion

hémolyse. Ceci peut être expliqué par les différentes propriétés des flavonoïdes étudiés. Ces trois flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux efficaces (corroboré par le test antiradicalaire du DPPH) (Cesquini *et al.*, 2003). Ceci peut également être expliqué par la formation de complexes flavonoïdes-fer très stables prévenant la formation d'ERO (il a été démontré que seulement de faibles quantités de H₂O₂ sont détectées en présence de quercétine et de fer (Hajji *et al.*, 2006; Nowak *et al.*, 2010)). De plus, le Fe(II) est rapidement auto-oxydé en Fe(III) en présence de flavonoïde et les constantes de vitesse d'auto-oxydation des complexes ferreux sont intimement liées aux propriétés anti-oxydantes du flavonoïde (Perron *et al.*, 2010).

Ceci est bien reflété par les marqueurs du statut oxydant/anti-oxydant. Les deux marqueurs du statut oxydant étudiés (MDA, PC) augmentent significativement (*Figure 31*, *Figure 32*) quand les globules rouges sont supplémentés en cations Fe²⁺ (400 µM), indiquant donc un effet oxydant du fer qui se traduit finalement par une hémolyse des globules rouges. Un prétraitement avec la quercétine, la rutine ou la (+)-catéchine maintient ces valeurs à des niveaux comparables à ceux des témoins. D'autre part, les paramètres du statut anti-oxydant (GSH, activité catalase et activité SOD) diminuent significativement en présence du fer ce qui correspond parfaitement au stress oxydant subi par les globules rouges là aussi. Suite à un prétraitement par les flavonoïdes et une surcharge en fer, les valeurs du GSH se maintiennent à des niveaux normaux (contrôle) même à de faibles concentrations en flavonoïdes (100 µM). L'activité catalase est également à un niveau comparable au contrôle pour la quercétine et pour la rutine. Cependant, en présence de (+)-catéchine et en surcharge en fer, cet activité catalase reste à des niveaux faibles (comparables aux globules rouges en présence du fer seul). Quant à l'activité SOD, seul le prétraitement à la quercétine garde cette activité comparable au contrôle. Le prétraitement avec la (+)-catéchine et la rutine n'empêche pas une diminution de l'activité SOD suite à la surcharge en fer.

Toutes ces données permettent de démontrer clairement que les propriétés anti-oxydantes/chélatantes des flavonoïdes à noyau catéchol sont capables de prévenir la toxicité du Fe²⁺ et permettent de réguler l'homéostasie des globules rouges traités.

Le cuivre, étant également un métal pro-oxydant, peut endommager les globules rouges en altérant la perméabilité membranaire, en affectant la structure de la chromatine et la synthèse protéique ou en altérant l'activité enzymatique par cycle redox entre Cu(I) et Cu(II) particulièrement en présence de H₂O₂ (réaction de type Fenton), sous produit du

Discussion

métabolisme de l'oxygène (Liochev & Fridovich, 2002). Le Cu(I) (généré par la réaction entre le Cu(II) et $O_2^{\bullet-}$) peut réagir avec H_2O_2 et produire un intermédiaire oxydant Cu(III) et diminuer les taux de glutathion (Speisky *et al.*, 2009) comme nous l'avons observé dans cette étude (*Figure 28*).

Une concentration en ions Cu^{2+} de 400 μM a permis de lyser 22% de la solution de globules rouges (hémolyse inférieure à celle causée par le Fe^{2+} : 37%). Une élévation similaire du MDA et des PC (marqueurs du statut oxydant) à celle observée pour le Fe^{2+} (*Figure 31* et *Figure 32*) confirme que l'hémolyse des globules rouges est principalement causée par le stress oxydant induit par les métaux. Il semble cependant que les valeurs des PC soient plus altérées que celles du MDA. Un prétraitement par la quercétine, la (+)-catéchine et la rutine accroît les taux d'hémolyse à respectivement 42%, 30% et 29%.

Il a été démontré que les flavonoïdes étudiés sont capables de se complexer au Cu^{2+} (Tableau 2) mais conduisent à des complexes moins stables que ceux formés avec le Fe^{3+} . Il a été suggéré que la complexation du cuivre par la quercétine a lieu via le groupement 4-céto du cycle C avec l'implication des groupements 3OH et 5OH (Mira *et al.*, 2002). La complexation du Cu^{2+} par les ligands à groupements catéchol favorise la réduction du métal et produit des cations nocifs Cu(I) (Grass *et al.*, 2004; Chaturvedi *et al.*, 2012). D'autres études ont montré que pendant l'auto-oxydation de la quercétine initiée par le cuivre, du H_2O_2 s'accumule rapidement. De plus, des produits principaux sont formés lors de l'auto-oxydation de la quercétine (Hajji *et al.*, 2006). A une concentration de 100 μM de quercétine, les marqueurs du statut oxydant (*Figure 31* et *Figure 32*) augmentent alors que ceux du statut anti-oxydant (*Figure 28*, *Figure 29* et *Figure 30*) diminuent de manière concomitante et ce en accord avec l'environnement oxydant induit par la complexation du Cu^{2+} . Une augmentation de la concentration en quercétine (200 μM) améliore le statut oxydant des érythrocytes traités. Un effet similaire est observé en présence de (+)-catéchine et de rutine (200 μM) mais à des valeurs plus faibles. Ceci peut être dû à la nature des complexes de cuivre avec ces deux polyphénols (la rutine est substituée en position 3OH par un rutinoside alors que la (+)-catéchine est un flavan-3-ol). A concentration élevée (200 μM), une activité anti-oxydante est observée dans le cas de la catéchine et la rutine alors qu'à de plus faibles concentrations (100 μM) ces deux flavonoïdes développent une activité pro-oxydante. Il a été suggéré que pour les polyphénols possédant les deux activités (oxydante et anti-oxydante), il pourrait exister un cycle redox à faible concentrations quand il n'y a pas assez de polyphénols pour piéger les

Discussion

radicaux, et qu'une fois que les polyphénols sont en grandes concentrations il y a piégeage des radicaux (Perron *et al.*, 2011).

Contrairement aux deux autres métaux étudiés (Fe et Cu), le zinc est un métal qui ne possède pas d'activité redox (Andreini *et al.*, 2008). Le zinc est un composant essentiel de nombreuses protéines responsables de la défense contre le stress oxydant (Jomova & Valko, 2011) et sa teneur dans le plasma humain est évaluée entre 12 et 20 mM (Davies *et al.*, 1968). Cependant, la quantité de zinc libre est beaucoup plus faible car il est principalement transporté sous forme liée à l'albumine (Haase *et al.*, 2015). L'homéostasie du zinc est finement contrôlée puisqu'il joue un rôle très important comme régulateur intracellulaire. Il existe des protéines spécialisées dans l'importation et l'exportation du zinc alors que d'autres sont spécialisées dans sa distribution intracellulaire (Nygaard *et al.*, 2014).

Nous avons démontré qu'une surcharge en Zn^{2+} (400 μM) était responsable d'une forte hémolyse des globules rouges (32%, *Figure 27*) A de telles concentrations, le zinc peut affecter les systèmes de transport à travers la membrane et accroître la perméabilité des petites molécules induisant donc une hémolyse des globules rouges (Akahori *et al.*, 1999). Les résultats obtenus (*Figure 25*, *Figure 26* et

Figure 27) montrent clairement que les flavonoïdes étudiés sont moins efficaces dans la protection des érythrocytes contre l'hémolyse induite par le zinc (16% pour la quercétine et 55% pour la (+)-catéchine et la rutine pour une concentration de 200 μM). Cela est principalement dû au fait que les complexes formés entre les flavonoïdes et le Zn^{2+} sont beaucoup moins stables que ceux formés avec le fer et le cuivre.

Même si le Zn^{2+} n'a pas d'activité redox, on observe une augmentation des marqueurs du statut oxydant (MDA et PC, *Figure 31* et *Figure 32*), alors que les teneurs des différents marqueurs du statut anti-oxydant diminuent significativement (*Figure 28*, *Figure 29* et *Figure 30*) Une pré-incubation avec les flavonoïdes permet de garder les teneurs en GSH et en activité catalase à des concentrations comparables à celles du contrôle. Cependant, ce prétraitement ne permet pas de rétablir l'activité SOD vers ses niveaux d'origine. On peut donc supposer que les trois flavonoïdes agissent principalement comme anti-oxydant et non comme chélateurs de zinc.

Discussion

Les résultats obtenus pour le deuxième modèle cellulaire sont dans la lignée de ce qui a été obtenu pour les globules rouges.

Les ions redox Fe^{2+} jouent un rôle central dans la formation des radicaux $\cdot OH$ à partir de peroxyde d'hydrogène ou d'espèces oxygénées réduites produites par le métabolisme cellulaire. En effet, l'addition de fer à 100 μM diminue de manière très significative la prolifération lymphocytaire (49%). Cependant, l'addition de concentrations croissantes de flavonoïdes (à l'exception de la Q5OH qui n'a pas d'effet notable) rétablit petit à petit cet indice vers des valeurs proches du contrôle en surpassant même cette valeur contrôle dans le cas de la quercétine et de l'EGCG. Ces résultats sont expliqués par la formation de complexes flavonoïde-Fe empêchant l'ion Fe^{2+} de former les radicaux $\cdot OH$. Ces observations sont en parfait accord avec les résultats de la littérature. Les valeurs obtenues pour le statut oxydant/antioxydant au niveau des lymphocytes traités par Fe^{2+} viennent appuyer les résultats précédents puisque la présence de flavonoïdes diminue significativement les teneurs en MDA et PC et que les teneurs en GSH et SOD augmentent également de manière significative.

Les résultats concernant le Cu et le Zn montrent clairement un effet pro-oxydant des flavonoïdes en présence de ces deux métaux. Les ions Zn^{2+} n'ont pas un effet très important sur la viabilité des cellules lymphocytaire (*Figure 37* et *Figure 38*). En effet, la prolifération lymphocytaire ne diminue que de 9%. L'addition de flavonoïdes provoque une diminution de la prolifération cellulaire de 44% à 70%. L'EGCG est le flavonoïde avec la meilleure activité pro-oxydante avec 70%. Des études précédentes ont démontré l'effet pro-oxydant des catéchines sur l'ADN selon la séquence suivante $C < EC < EGC < EGCG$ (Farhan *et al.*, 2015). La différence entre la catéchine et l'épicatéchine peut être expliquée par l'orientation du groupement hydroxyle en position 3 du cycle C (Farhan *et al.*, 2015).

Les paramètres du statut antioxydant diminuent significativement pour des concentrations croissantes en flavonoïdes. Cependant, on n'observe pas d'augmentation significative des teneurs des marqueurs du statut oxydant.

Les complexes Quercétine-zinc pourrait avoir une activité anticancéreuse par insertion du complexe dans des régions GC de l'ADN (Tan *et al.*, 2009). La formation de complexes flavonoïdes-zinc pourrait aussi rendre le zinc indisponible pour les cellules comme le font d'autres composés issus de l'alimentation comme les phytates (Wise, 1995) induisant une déficience en zinc *in vivo* et *in vitro*. Ces complexes pourraient également traverser les

Discussion

membranes cellulaires et agir comme ionophores. Cet effet ionophore pour le zinc a été caractérisé pour d'autres molécules comme le clioquinol (Bareggi & Cornelli, 2012) permettant une augmentation rapide des concentrations intracellulaires en zinc. Il est admis qu'une fois le complexe CQ-Zn a pénétré dans la cellule, il y a libération du zinc. Les mécanismes par lesquels les flavonoïdes pénètrent à l'intérieur des cellules sont encore mal compris. Cependant, il a été démontré (Dabbagh-Bazarbachi *et al.*, 2014) que la complexation de l'EGCG au zinc augmente sa biodisponibilité au niveau cellulaire.

Le Cu^{2+} aussi bien que le Zn^{2+} (métal non-rédox) sont connus pour leur activité apoptotique, mécanisme par lequel les ERO peuvent conduire à la mort cellulaire (Morana *et al.*, 1994). Le cuivre est habituellement lié aux chromosomes. Dans des conditions normales, les ions Cu^+ générés sont stabilisés par le glutathion ce qui empêche un éventuel endommagement de l'ADN. Cependant, en présence d'un agent chélateur du cuivre comme la 1,10-phenanthroline le glutathion est incapable de protéger l'ADN (BURKITT *et al.*, 1996).

Nos résultats montrent que les ions Cu^{2+} (100 μM) diminuent de manière significative la prolifération lymphocytaire (réaction de type Fenton). Ceci est en accord avec la littérature (Khan *et al.*, 2011) où il a été démontré que l'administration d'une surcharge en Cu à des rats induisait une augmentation du taux de cuivre dans les lymphocytes et une sensibilité accrue de ces lymphocytes à l'EGCG.

Les flavonoïdes en présence de 100 μM de Cu^{2+} ont ici aussi un effet pro-oxydant similaire à celui du zinc avec de manière générale une augmentation des marqueurs du statut oxydant et une diminution des marqueurs du statut anti-oxydant.

Dans les cellules normales, il existe une balance entre les radicaux libres générés et la balance anti-oxydante. Cependant, il a été confirmé que les cellules cancéreuses subissent un stress oxydant constant et qu'une production supplémentaire d'ERO pourrait impliquer un phénomène d'apoptose (Oberley & Oberley, 1997; Devi *et al.*, 2000). Il a été suggéré que les cellules en néoplasie peuvent être plus vulnérables que les cellules normales car elles sont en multiplication constante et qu'elles produisent une plus grande quantité de ERO à cause de leur métabolisme accru (Kong *et al.*, 2000).

La concentration intracellulaire en cuivre dans les cellules cancéreuses est connue pour être plus élevée que dans les cellules normales (Gupte & Mumper, 2009) et pourrait être plus sujet à des transferts d'électrons avec les catéchines pour générer les ERO.

Discussion

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons avancer que les flavonoïdes étudiés possédant le noyau catéchol ou pyrogallol sont capables de mobiliser le cuivre endogène lié à l'ADN et de suivre une voie de toxicité cellulaire alternative susceptible de cliver l'ADN par production d'ERO. Ceci explique le potentiel anticancéreux de nombreux polyphénols cités dans la littérature. Il est généralement admis que cette réaction est précédée par l'association entre ligand et ADN suivie de la production de radicaux hydroxyles à proximité de ces sites. La localisation du métal redox est d'importance extrême car le radical hydroxyl très réactif réagit dans l'environnement proche du métal (Chevion, 1988). Les ions du cuivre sont connus pour réagir avec les phosphates de l'ADN et avec les bases, particulièrement la guanine (Kagawa *et al.*, 1991). Il a également été rapporté que l'interaction entre les catéchines et le Cu lié à l'ADN sous forme de complexes ternaires génère des radicaux hydroxyles capables de cliver l'ADN (Farhan *et al.*, 2016).

Le nombre et la position des groupements hydroxyles est également important dans la détermination de l'activité pro-oxydante des flavonoïdes. Le positionnement ortho des groupements di-hydroxyles du cycle B est également primordial pour l'activité des flavonoïdes. Ceci a été également démontré par d'autres travaux (Arif *et al.*, 2015) sur la galangine (flavonoïde ne possédant pas de groupements hydroxyle sur le cycle B).

Le nombre de noyaux galloyles présents dans la structure des catéchines joue un rôle important dans la rupture de l'ADN en réduisant le cuivre, ce qui conduit à la formation d'espèces oxydantes dérivés de ces composés (Farhan *et al.*, 2015).

Ces flavonoïdes sous ces formes, ne sauraient être utilisés comme agents anticancéreux principalement à cause de leur faible biodisponibilité *in vivo* et donc une faible demi-vie dans le plasma. Il est donc important de comprendre que les résultats obtenus dans cette étude doivent être utilisés pour mieux comprendre le principe de mobilisation des métaux principalement le cuivre et le zinc intracellulaire pour générer un stress intracellulaire et induire l'apoptose des cellules cancéreuses.

Conclusion

Conclusion

Les flavonoides sont représentés par de nombreux composés d'intérêt nutritionnel et valorisables dans l'industrie alimentaire et comme produits cosmétiques grâce à leurs propriétés réductrices (antioxydantes) et à leur capacité à interagir avec les ions métalliques et une grande variété de protéines.

Cette étude a permis de mieux comprendre les paramètres qui régissent les relations entre la structure des flavonoïdes et leurs capacités à former des complexes avec les métaux. Dans un tampon neutre, la complexation est en général rapide et conduit à des complexes relativement stables.

Les résultats obtenus *in vitro* sur le globule rouge viennent appuyer les résultats obtenus dans la partie physico-chimique. En effet, les flavonoides étudiés possédant dans leur structure un site catéchol (cycle B) sont capables d'inhiber l'effet pro-oxydant du fer et du zinc, effet qui se traduit par une hémolyse des globules rouges (cas de la quercétine ou de son dérivé synthétique Q3'4'OH). En présence de cuivre, on observe au contraire un effet pro-oxydant qui suggère probablement un passage du cuivre de la forme Cu(II) vers la forme Cu(I) en présence des flavonoides.

Les paramètres du statut anti-oxydant/pro-oxydant viennent également appuyer les résultats précédents. En effet, les valeurs du GSH, de la catalase et de la SOD qui diminuent sous l'effet du stress engendré par la surcharge en métaux sont rétablies vers de valeurs normales (témoin) en présence de fer et de zinc, alors qu'en présence de cuivre elles diminuent encore plus, confortant le résultat pro-oxydant.

Pour ce qui concerne les résultats obtenus pour le deuxième modèle cellulaire à savoir le lymphocyte, il a été observé là aussi un effet de protection des flavonoides contre l'effet pro-oxydant du fer, résultats en accord avec les valeurs des paramètres du statut anti-oxydant/pro-oxydant.

Le cuivre qui a montré un effet pro-oxydant en présence des flavonoides chez le globule rouge montre des résultats similaires pour le lymphocyte. En effet, les taux de prolifération lymphocytaires diminuent nettement quand on surcharge le milieu en cuivre. Cet effet pro-oxydant augmente d'autant plus que le cuivre est en présence flavonoïdes, notamment en présence d'EGCG.

Conclusion

Cependant, les résultats obtenus avec le zinc sont plus ou moins surprenant par rapport à ce qui a été obtenu pour les globules rouges. On observe en effet une diminution de la prolifération lymphocytaire en présence d'une surcharge en zinc. Cette diminution s'accroît une fois que le milieu est supplémenté en flavonoïdes, indiquant clairement un effet pro-oxydant du zinc en présence de flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec les valeurs obtenus pour les paramètres du stress oxydant. Cet effet pro-oxydant du Zn observé en présence de flavonoïdes peut être expliqué par une substitution du cuivre intracellulaire lié principalement à l'ADN puis à une génération d'ERO par la suite.

Il apparaît clairement que l'effet pro-oxydant du cuivre en présence flavonoïdes est décuplé. Une stratégie possible a déjà été suggérée pour le traitement de certaines cellules cancéreuses où le cuivre intracellulaire est supérieur aux valeurs physiologiques. Il s'agit de potentialiser l'effet pro-oxydant de ce cuivre intracellulaire en excès de la cellule cancéreuse afin de provoquer un phénomène d'apoptose et détruire ces cellules malignes. Cette stratégie se heurte cependant au problème de faible biodisponibilité des flavonoïdes qui empêche des traitements efficaces.

Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes qui régissent ces effets tantôt pro-oxydants tantôt antioxydant, et de remédier au problème de biodisponibilité des flavonoïdes. Ceci permettra d'élaborer des stratégies curatives nettement moins coûteuses et surtout moins toxiques pour l'organisme.

Bibliographie

- Aebi, H. (1984) [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, **105**, 121-126.
- Akahori, A., Gabryelak, T., Józwiak, Z. & Gondko, R. (1999) Zinc-induced damage to carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocytes in vitro. *IUBMB Life*, **47**, 89-98.
- Alfenaar, M. & De Ligny, C. (1967) The universal pH-scale in methanol and methanol-water mixtures. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **86**, 1185-1190.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B. & Trinajstic, N. (2007) SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, **14**, 827-845.
- Amiot, M.-J., Riollet, C. & Landrier, J.-F. (2009) Polyphénols et syndrome métabolique: Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des maladies métaboliques*, **3**, 476-482.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L. & Thornton, J. M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **13**, 1205-1218.
- Arif, H., Rehmani, N., Farhan, M., Ahmad, A. & Hadi, S. M. (2015) Mobilization of Copper ions by Flavonoids in Human Peripheral Lymphocytes Leads to Oxidative DNA Breakage: A Structure Activity Study. *International journal of molecular sciences*, **16**, 26754-26769.
- Augustyniak, E., Adam, A., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Willetts, R., Korkmaz, A., *et al.* (2015) Validation of protein carbonyl measurement: a multi-centre study. *Redox biology*, **4**, 149-157.
- Aviram, M. & Fuhrman, B. (2002) Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **957**, 146-161.
- Baillie, J. K., Bates, M. G., Thompson, A. R., Waring, W. S., Partridge, R. W., Schnopp, M. F., *et al.* (2007) Endogenous urate production augments plasma antioxidant capacity in healthy lowland subjects exposed to high altitude. *CHEST Journal*, **131**, 1473-1478.
- Bareggi, S. R. & Cornelli, U. (2012) Clioquinol: review of its mechanisms of action and clinical uses in neurodegenerative disorders. *CNS neuroscience & therapeutics*, **18**, 41-46.
- Bastian, R., Weberling, R. & Palilla, F. (1956) Determination of iron by ultraviolet spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, **28**, 459-462.
- Baye Yimam, K. (2013) Food-based strategies to enhance iron and zinc bioavailability of complementary foods consumed by young children in Ethiopia. Montpellier 2.
- Beaudeau, J.-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A. & Peynet, J. (2006) Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **21**, 144-150.
- Benfeito, S., Oliveira, C., Soares, P., Fernandes, C., Silva, T., Teixeira, J., *et al.* (2013) Antioxidant therapy: Still in search of the 'magic bullet'. *Mitochondrion*, **13**, 427-435.

Bibliographie

Bishop, G. M., Dringen, R. & Robinson, S. R. (2007) Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, **42**, 1222-1230.

Blair, I. A. (2001) Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Experimental Gerontology*, **36**, 1473-1481.

Bohr, V. A. (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 804-812.

Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L. & Albrecht-Gary, A.-M. (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron (III), copper (II) and zinc (II) complexes. *Dalton transactions*, **41**, 2820-2834.

Bruneton, J. (2009) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.

Burda, S. & Oleszek, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2774-2779.

BURKITT, M. J., MILNE, L., NICOTERA, P. & ORRENIUS, S. (1996) 1, 10-Phenanthroline stimulates internucleosomal DNA fragmentation in isolated rat-liver nuclei by promoting the redox activity of endogenous copper ions. *Biochemical Journal*, **313**, 163-169.

Cadet, J., Douki, T., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L. & Sauvaigo, S. (2001) Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. In *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology*, pp. 62-73. Karger Publishers.

Cao, G., Russell, R. M., Lischner, N. & Prior, R. L. (1998) Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *The Journal of nutrition*, **128**, 2383-2390.

Carocho, M. & Ferreira, I. C. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 15-25.

Carrèr, C. (2005) Chélation de métaux de transition par des polyphénols du régime alimentaire. Strasbourg 1.

Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M. & Muñiz, P. (2010) Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1238-1244.

Cesquini, M., Torsoni, M., Stoppa, G. & Ogo, S. t.-. (2003) t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, **57**, 124-129.

Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E. & Henderson, J. P. (2012) The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nature chemical biology*, **8**, 731-736.

Bibliographie

- Chaves, F. J., Mansego, M. L., Blesa, S., Gonzalez-Albert, V., Jiménez, J., Tormos, M. C., *et al.* (2007) Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *American journal of hypertension*, **20**, 62-69.
- Chebil, L., Ghoul, M., Institut national polytechnique de, L. & Rp2E - Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, P. P. E. (2006) Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia* études cinétique, structurale et conformationnelle.
- Chevion, M. (1988) A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Biology and Medicine*, **5**, 27-37.
- Cheynier, V., Tomas-Barberan, F. A. & Yoshida, K. (2015) Polyphenols: from plants to a variety of food and nonfood uses. ACS Publications.
- Chi, Y. S., Jong, H. G., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. & Kim, H. P. (2001) Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical pharmacology*, **62**, 1185-1191.
- Chimienti, F., Seve, M., Richard, S., Mathieu, J. & Favier, A. (2001) Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical pharmacology*, **62**, 51-62.
- Collins, A. (2000) Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. *Free radical research*, **32**, 333-341.
- Coyle, P., Philcox, J., Carey, L. & Rofe, A. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and molecular life sciences*, **59**, 627-647.
- Crichton, R. & Pierre, J.-L. (2001) Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals*, **14**, 99-112.
- Curtin, J. F., Donovan, M. & Cotter, T. G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods*, **265**, 49-72.
- Dabbagh-Bazarbachi, H., Clergeaud, G., Quesada, I. M., Ortiz, M., O'Sullivan, C. K. & Fernández-Larrea, J. B. (2014) Zinc ionophore activity of quercetin and epigallocatechin-gallate: From Hepa 1-6 cells to a liposome model. *Journal of agricultural and food chemistry*, **62**, 8085-8093.
- Das, P. K., Bhattacharya, S. G., Banerjee, R. & Banerjee, D. (1989) Thermodynamic and kinetic studies on the iron (III)-hydroxamate interaction in acid media. *Journal of coordination chemistry*, **19**, 311-320.
- Davies, I., Musa, M. & Dormandy, T. (1968) Measurements of plasma zinc Part I In health and disease. *Journal of clinical pathology*, **21**, 359-363.
- Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P. & Lewis, J. (1996) ¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magnetic resonance in Chemistry*, **34**, 887-890.
- de Souza, R. F. & De Giovanni, W. F. (2004) Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, **9**, 97-104.

Bibliographie

- de Souza, R. F., Sussuchi, E. M. & De Giovani, W. F. (2003) Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry*, **33**, 1125-1144.
- Deng, S.-L., Chen, W.-F., Zhou, B., Yang, L. & Liu, Z.-L. (2006) Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chemistry*, **98**, 112-119.
- Devi, G. S., Prasad, M. H., Saraswathi, I., Raghu, D., Rao, D. & Reddy, P. (2000) Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica Acta*, **293**, 53-62.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. & Capasso, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, **65**, 337-353.
- Douris, P. C., Elokda, A. S., Handrakis, J. P., Principal, S., Rondo, E., Bovell, J., *et al.* (2009) Martial art training enhances the glutathione antioxidant system in middle-aged adults. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, **23**, 1518-1523.
- Draper, H. & Hadley, M. (1990) [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*, **186**, 421-431.
- Durackova, Z. (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, **59**, 459.
- Elhabiri, M., Carrër, C., Marmolle, F. & Traboulsi, H. (2007) Complexation of iron (III) by catecholate-type polyphenols. *Inorganica Chimica Acta*, **360**, 353-359.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, **82**, 70-77.
- Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J., Covas, M., *et al.* (2003) Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis*, **167**, 327-334.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. & Aykin-Burns, N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, **1**, 529-539.
- Erlund, I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, **24**, 851-874.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*, **11**, 81-128.
- Falletti, O., Cadet, J., Favier, A. & Douki, T. (2007) Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **42**, 1258-1269.

Bibliographie

- Farhan, M., Khan, H. Y., Oves, M., Al-Harrasi, A., Rehmani, N., Arif, H., *et al.* (2016) Cancer therapy by catechins involves redox cycling of copper ions and generation of reactive oxygen species. *Toxins*, **8**, 37.
- Farhan, M., Zafar, A., Chibber, S., Khan, H. Y., Arif, H. & Hadi, S. (2015) Mobilization of copper ions in human peripheral lymphocytes by catechins leading to oxidative DNA breakage: A structure activity study. *Archives of biochemistry and biophysics*, **580**, 31-40.
- Favier, A. (2003) Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, **108**.
- Feng, L., Park, S. H., Reif, J. H. & Yan, H. (2003) A Two-State DNA Lattice Switched by DNA Nanoactuator. *Angewandte Chemie*, **115**, 4478-4482.
- Fernández, M., Caballero, J., Helguera, A. M., Castro, E. A. & González, M. P. (2005) Quantitative structure–activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **13**, 3269-3277.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., *et al.* (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters*, **416**, 123-129.
- Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. (2006) Oxidative stress. *Sports medicine*, **36**, 327-358.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G. & Saso, L. (2005) Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1721**, 174-184.
- Frelon, S. (2001) Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN.
- Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M. J. & Kawanishi, S. (2005) Guanine-specific DNA damage induced by γ -irradiated histone. *Biochemical Journal*, **388**, 813-818.
- Gabricevic, M., Anderson, D. S., Mietzner, T. A. & Crumbliss, A. L. (2004) Kinetics and mechanism of iron (III) complexation by ferric binding protein: the role of phosphate. *Biochemistry*, **43**, 5811-5819.
- Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C. J. & Zuberbühler, A. D. (1985a) Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data--II: SPECFIT: two user-friendly programs in basic and standard FORTRAN 77. *Talanta*, **32**, 257-264.
- Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C. J. & Zuberbühler, A. D. (1985b) Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—I: mathematical considerations. *Talanta*, **32**, 95-101.
- Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C. J. & Zuberbühler, A. D. (1986) Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—IV: model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis. *Talanta*, **33**, 943-951.
- Gaskell, S. J. (1997) Electrospray: principles and practice. *Journal of mass spectrometry*, **32**, 677-688.

Bibliographie

- Gelsema, W., De Ligny, C., Remijnse, A. & Blijleven, H. (1966) pH-Measurements in alcohol-water mixtures, using aqueous standard buffer solutions for calibration. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **85**, 647-660.
- Glomb, M. A. & Monnier, V. M. (1995) Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 10017-10026.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M. & Dangles, O. (2003) Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 615-622.
- Grass, G., Thakali, K., Klebba, P. E., Thieme, D., Müller, A., Wildner, G. F., *et al.* (2004) Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **186**, 5826-5833.
- Gruber, C. W., Čemažar, M., Heras, B., Martin, J. L. & Craik, D. J. (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences*, **31**, 455-464.
- Guiraud, P., Favier, A. & Horn, N. (2008) Métabolisme du cuivre. *EMC endocrinologie Nutrition. Physiologie et Pathologie de la Nutrition. Paris: Masson*, **3**.
- Gupte, A. & Mumper, R. J. (2009) Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, **35**, 32-46.
- Gutteridge, J. M. & Quinlan, G. J. (1992) Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1159**, 248-254.
- Haase, H., Hebel, S., Engelhardt, G. & Rink, L. (2015) The biochemical effects of extracellular Zn²⁺ and other metal ions are severely affected by their speciation in cell culture media. *Metallomics*, **7**, 102-111.
- Hajji, H. E., Nkhili, E., Tomao, V. & Dangles, O. (2006) Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free radical research*, **40**, 303-320.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (2015) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Han, Y., Ding, Y., Xie, D., Hu, D., Li, P., Li, X., *et al.* (2015) Design, synthesis, and antiviral activity of novel rutin derivatives containing 1, 4-pentadien-3-one moiety. *European journal of medicinal chemistry*, **92**, 732-737.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. & Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*, **119**, 203-210.
- Hayakawa, M., Torii, K., Sugiyama, S., Tanaka, M. & Ozawa, T. (1991) Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochemical and biophysical research communications*, **179**, 1023-1029.

Bibliographie

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, **13**, 572-584.
- Hermann, D. M., Zechariah, A., Kaltwasser, B., Bosche, B., Caglayan, A. B., Kilic, E., *et al.* (2015) Sustained neurological recovery induced by resveratrol is associated with angiogenesis rather than neuroprotection after focal cerebral ischemia. *Neurobiology of disease*, **83**, 16-25.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O. & Kondo, K. (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of nutritional science and vitaminology*, **47**, 357-362.
- Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., *et al.* (1998) Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *British Journal of Surgery*, **85**, 1080-1085.
- Ilbert, M. & Bonnefoy, V. (2013) Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1827**, 161-175.
- Itoh, S., Ozumi, K., Kim, H. W., Nakagawa, O., McKinney, R. D., Folz, R. J., *et al.* (2009) Novel mechanism for regulation of extracellular SOD transcription and activity by copper: role of antioxidant-1. *Free Radical Biology and Medicine*, **46**, 95-104.
- Iwashina, T. (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, **113**, 287-299.
- Jansen, E. P., Keus, R. B., Hilgers, F. J., Haas, R. L., Tan, I. B. & Bartelink, H. (2000) Does the combination of radiotherapy and debulking surgery favor survival in paranasal sinus carcinoma? *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, **48**, 27-35.
- Johnson, R. J., Sautin, Y. Y., Oliver, W. J., Roncal, C., Mu, W., Sanchez-Lozada, L. G., *et al.* (2009) Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society? *Journal of comparative physiology B*, **179**, 67-76.
- Jomova, K. & Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **283**, 65-87.
- Jones -Lee, A. & Lee, G. F. (2005) Role of iron chemistry in controlling the release of pollutants from resuspended sediments. *Remediation Journal*, **16**, 33-41.
- JURD, L. (1962) Selective Alkylation of Polyphenols. I. The Use of Diphenylmethylen as a Protective Grouping for o-Dihydroxyflavones. *The Journal of Organic Chemistry*, **27**, 872-875.
- Kagawa, T., Geierstanger, B., Wang, A. & Ho, P. S. (1991) Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl₂. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 20175-20184.
- Kakhlon, O. & Cabantchik, Z. I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1037-1046.

Bibliographie

- Kasprzak, M. M., Erxleben, A. & Ochocki, J. (2015) Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*, **5**, 45853-45877.
- Ke, Y. & Qian, Z. M. (2003) Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*, **2**, 246-253.
- Kessler, M., Ubeaud, G. & Jung, L. (2003) Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **55**, 131-142.
- Khan, H. Y., Zubair, H., Ullah, M. F., Ahmad, A. & Hadi, S. M. (2011) Oral administration of copper to rats leads to increased lymphocyte cellular DNA degradation by dietary polyphenols: implications for a cancer preventive mechanism. *Biometals*, **24**, 1169-1178.
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., Vaez-Gharamaleki, J. & Jouyban, A. (2016) Comments on "Salivary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre-cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action". *Clinical oral investigations*, **20**, 395-396.
- Kienzl, E., Jellinger, K., Stachelberger, H. & Linert, W. (1999) Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Life sciences*, **65**, 1973-1976.
- Kim, H., Pham, H. & Ziboh, V. (2001) Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, **65**, 281-286.
- Kindermann, B., Döring, F., Budczies, J. & Daniel, H. (2005) Zinc-sensitive genes as potential new target genes of the metal transcription factor-1 (MTF-1). *Biochemistry and cell biology*, **83**, 221-229.
- Kong, Q., Beel, J. & Lillehei, K. (2000) A threshold concept for cancer therapy. *Medical hypotheses*, **55**, 29-35.
- Kono, Y. (1978) Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **186**, 189-195.
- Kopacz, M., Woznicka, E. & Gruszecka, J. (2005) Antibacterial activity of morin and its complexes with La (III), Gd (III) and Lu (III) ions. *Pol Pharm Society*, **62**, 65-67.
- Koppenol, W. H. (2001) The Haber-Weiss cycle—70 years later. *Redox Report*, **6**, 229-234.
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Vladykovskaya, E., Korkina, L. & Afanas' ev, I. (2001) Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385**, 129-137.
- Kuang, Z.-H., Wang, P.-F., Zheng, R.-L., Liu, Z.-L. & Liu, Y.-C. (1994) Making vitamin C lipo-soluble enhances its protective effect against radical induced hemolysis of erythrocytes. *Chemistry and physics of lipids*, **71**, 95-97.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., *et al.* (1990) [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, **186**, 464-478.

Bibliographie

- Levine, R. L. & Stadtman, E. R. (2001) Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, **36**, 1495-1502.
- Linder, M. C., Lomeli, N. A., Donley, S., Mehrbod, F., Cerveza, P., Cotton, S., *et al.* (1999) Copper transport in mammals. In *Copper Transport and its Disorders*, pp. 1-16. Springer.
- Liochev, S. I. & Fridovich, I. (2002) The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox report*, **7**, 55-57.
- Lönnerdal, B. (1996) Bioavailability of copper. *The American journal of clinical nutrition*, **63**, 821S-829S.
- Lotito, S. B., Actis-Goretta, L., Renart, M. L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H. H., *et al.* (2000) Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **276**, 945-951.
- Maeder, M. & Zuberbuehler, A. D. (1990) Nonlinear least-squares fitting of multivariate absorption data. *Analytical Chemistry*, **62**, 2220-2224.
- Manzl, C., Enrich, J., Ebner, H., Dallinger, R. & Krumschnabel, G. (2004) Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology*, **196**, 57-64.
- Marnett, L. J. (1999) Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **424**, 83-95.
- Marquardt, D. W. (1963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the society for Industrial and Applied Mathematics*, **11**, 431-441.
- Milane, H., Ubeaud-Sequier, G. & Université Louis, P. (2004) La quercétine et ses dérivés molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. [s.n.], [S.I.].
- Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M. & Jennings, K. R. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research*, **36**, 1199-1208.
- Mishra, B., Priyadarsini, K. I., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. & Mohan, H. (2003) Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **11**, 2677-2685.
- Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N. K. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, **130**, 1036-1043.
- Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, **26**, 211-219.
- Morana, S., Li, J., Springer, E. W. & Eastman, A. (1994) The inhibition of etoposide-induced apoptosis by zinc is associated with modulation of intracellular pH. *International journal of oncology*, **5**, 153-158.

Bibliographie

- Morazzoni, P. (2014) Natural antioxidant products. *Nutrafoods*, **13**, 85-86.
- Moridani, M. Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A. & O'Brien, P. J. (2003) Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**, 243-253.
- Nagaoka, S.-i., Kakiuchi, T., Ohara, K. & Mukai, K. (2007) Kinetics of the reaction by which natural vitamin E is regenerated by vitamin C. *Chemistry and physics of lipids*, **146**, 26-32.
- Nakabeppu, Y. (2014) Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *International journal of molecular sciences*, **15**, 12543-12557.
- Nerland, D. E. (2007) The antioxidant/electrophile response element motif. *Drug metabolism reviews*, **39**, 235-248.
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E. & Marnett, L. J. (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 31426-31433.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K. & Van Leeuwen, P. A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, **74**, 418-425.
- Nkhili, E.-z., Dangles, O., Elhajji, H., Université d'Avignon et des Pays de V., Université Cadi, A. & Faculté des sciences, S. (2009) Polyphénols de l'alimentation extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. [s.n.], [S.I.].
- Nowack, B. (2002) Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. *Environmental Science & Technology*, **36**, 4009-4016.
- Nowak, D., Kuźniar, A. & Kopacz, M. (2010) Solid complexes of iron (II) and iron (III) with rutin. *Structural Chemistry*, **21**, 323-330.
- Nygaard, S. B., Larsen, A., Knuhtsen, A., Rungby, J. & Smidt, K. (2014) Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro β -cell function in INS-1E cells. *BMC research notes*, **7**, 84.
- Nzengue, Y. (2008) Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Nzengue, Y., Guiraud, P., Rachidi, W. & Université Joseph, F. (2008) Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc place des métallothionéines et de p53. [s.n.], [S.I.].
- Oberley, L. & Oberley, T. (1997) Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histology and histopathology*.
- Olszanecki, R., Gebaska, A., Kozlovski, V. & Gryglewski, R. (2002) Key words: flavonoids, nitric oxide synthase, macrophages. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **53**, 571-584.

Bibliographie

- Palaniandavar, M., Velusamy, M. & Mayilmurugan, R. (2006) Iron (III) complexes of certain tetradentate phenolate ligands as functional models for catechol dioxygenases. *Journal of Chemical Sciences*, **118**, 601-610.
- Patrick, L. (2006) Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*, **11**, 114.
- Peña, M. M., Lee, J. & Thiele, D. J. (1999) A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of nutrition*, **129**, 1251-1260.
- Perron, N. R., García, C. R., Pinzón, J. R., Chaur, M. N. & Brumaghim, J. L. (2011) Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. *Journal of inorganic biochemistry*, **105**, 745-753.
- Perron, N. R., Wang, H. C., DeGuire, S. N., Jenkins, M., Lawson, M. & Brumaghim, J. L. (2010) Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. *Dalton Transactions*, **39**, 9982-9987.
- Pierre, J., Fontecave, M. & Crichton, R. (2002) Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals*, **15**, 341-346.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. & Defraigne, J.-O. (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**, 233-239.
- Pincemail, J. & Defraigne, J.-O. (2003) Le Coenzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, **8**, 55-60.
- Polidori, M. C., Griffiths, H. R., Mariani, E. & Mecocci, P. (2007) Hallmarks of protein oxidative damage in neurodegenerative diseases: focus on Alzheimer's disease. *Amino acids*, **32**, 553-559.
- Ravichandran, R., Rajendran, M. & Devapiriam, D. (2014) Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food chemistry*, **146**, 472-478.
- Rice-Evans, C. (1990) Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In *Erythroid Cells*, pp. 429-453. Springer.
- Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. & Schulin, R. (2013) Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences*, **18**, 144-157.
- Roufogalis, B., Davies, N. M. & Yáñez, J. A. (2012) *Flavonoid pharmacokinetics: methods of analysis, preclinical and clinical pharmacokinetics, safety, and toxicology*. John Wiley & Sons.
- Roupioz, Y., Lhomme, J. & Kotera, M. (2002) Chemistry of the 2-deoxyribonolactone lesion in oligonucleotides: cleavage kinetics and products analysis. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 9129-9135.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., *et al.* (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation.

Bibliographie

- Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 26066-26075.
- Salgueiro, M. a. J., Zubillaga, M. B., Lysionek, A. E., Caro, R. A., Weill, R. & Boccio, J. R. (2002) The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition*, **18**, 510-519.
- Salgueiro, M. J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M. I., Caro, R., De Paoli, T., *et al.* (2000) Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutrition Research*, **20**, 737-755.
- Sanchiz, J. n., Esparza, P., Domínguez, S., Brito, F. & Mederos, A. (1999) Solution studies of complexes of iron (III) with iminodiacetic, alkyl-substituted iminodiacetic and nitrilotriacetic acids by potentiometry and cyclic voltammetry. *Inorganica chimica acta*, **291**, 158-165.
- Sarkar, B. (1999) Treatment of Wilson and Menkes diseases. *Chemical reviews*, **99**, 2535-2544.
- Sayre, L. M., Moreira, P. I., Smith, M. A. & Perry, G. (2004) Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, **41**, 143-164.
- Scheline, R. R. (1991) *CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds*. CRC Press.
- Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S. & Krishnan, U. M. (2014a) Flavonoid–metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Medicinal research reviews*, **34**, 677-702.
- Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S. & Krishnan, U. M. (2014b) Investigations on the membrane interactions of naringin and its complexes with copper and iron: implications for their cytotoxicity. *RSC Advances*, **4**, 46407-46417.
- Sensi, S. & Jeng, J.-M. (2004) Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn²⁺ in ischemic neuronal injury. *Current molecular medicine*, **4**, 87-111.
- Sergent, O., Griffon, B., Morel, I., Chevanne, M., Dubos, M., Cillard, P., *et al.* (1997) Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology*, **25**, 122-127.
- Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism reviews*, **32**, 307-326.
- Shi, Z.-H., Li, N.-G., Tang, Y.-P., Yang, J.-P. & Duan, J.-A. (2012) Metabolism-based synthesis, biologic evaluation and SARs analysis of O-methylated analogs of quercetin as thrombin inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, **54**, 210-222.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, **82**, 291-295.
- Speisky, H., Gómez, M., Burgos-Bravo, F., López-Alarcón, C., Jullian, C., Olea-Azar, C., *et al.* (2009) Generation of superoxide radicals by copper–glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **17**, 1803-1810.

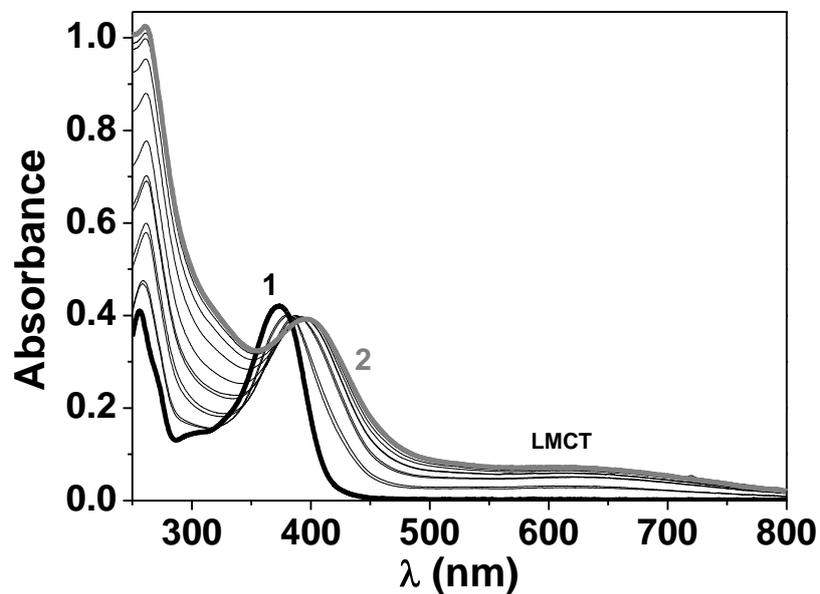
Bibliographie

- Spiteller, G. (2006) Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology and Medicine*, **41**, 362-387.
- Squier, T. C. (2001) Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology*, **36**, 1539-1550.
- Stadtman, E. R. & Levine, R. L. (2000) Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**, 191-208.
- Sun, C., Fu, J., Chen, J., Jiang, L. & Pan, Y. (2010) On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures. *Journal of separation science*, **33**, 1018-1023.
- Symonowicz, M. & Kolanek, M. (2012) Flavonoids and their properties to form chelate complexes.
- Tan, J., Wang, B. & Zhu, L. (2009) DNA binding, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, and molecular modeling study of quercetin zinc (II) complex. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **17**, 614-620.
- Tang, H., Wang, X., Yang, S. & Wang, L. (2004) Synthesis, characterization, and biological activities of Pt (II) and Pd (II) complexes with 2', 3', 4', 5, 7-pentahydroxy flavone. *RARE METALS-BEIJING-ENGLISH EDITION*, **23**, 38-42.
- Tapiero, H., Gate, L. & Tew, K. (2001) Iron: deficiencies and requirements. *Biomedicine & pharmacotherapy*, **55**, 324-332.
- Tapiero, H., Townsend, D. & Tew, K. (2003) Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & pharmacotherapy*, **57**, 386-398.
- Tong, L., Chuang, C.-C., Wu, S. & Zuo, L. (2015) Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer letters*, **367**, 18-25.
- Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J. & Wagner, J. R. (1999) 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 20833-20838.
- Tweeddale, H. J., Kondo, M. & Gebicki, J. M. (2007) Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Archives of biochemistry and biophysics*, **459**, 151-158.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A. & Pifferi, G. (1994) A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology and Medicine*, **16**, 547-553.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, **160**, 1-40.

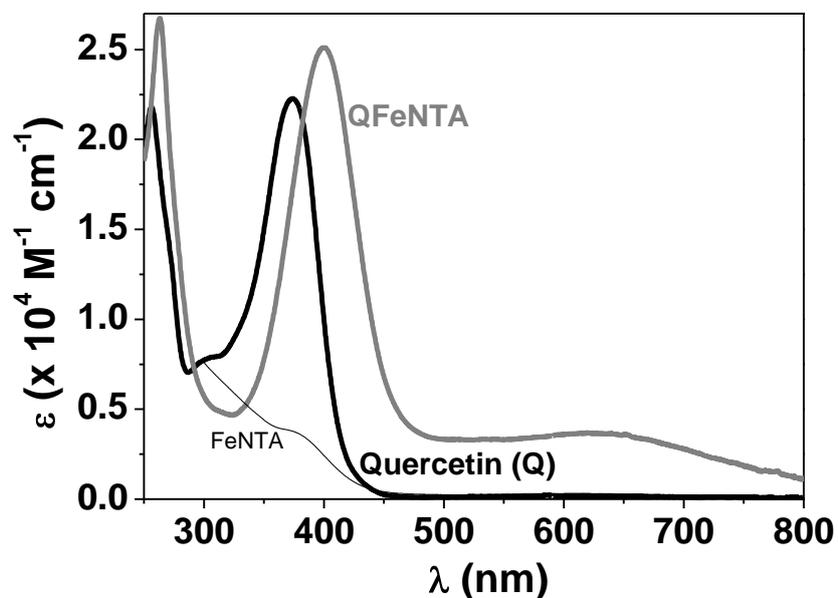
Bibliographie

- Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., *et al.* (2004) Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *European journal of biochemistry*, **271**, 3646-3656.
- Waris, G. & Ahsan, H. (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*, **5**, 14.
- Whittington, C. & Kowdley, K. (2002) Haemochromatosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **16**, 1963-1975.
- Wise, A. (1995) Phytate and zinc bioavailability. *International journal of food sciences and nutrition*, **46**, 53-63.
- Zhu, M. & Fahl, W. E. (2001) Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochemical and biophysical research communications*, **289**, 212-219.
- Zhu, Q. Y., Huang, Y., Tsang, D. & Chen, Z.-Y. (1999) Regeneration of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2020-2025.

Annexes

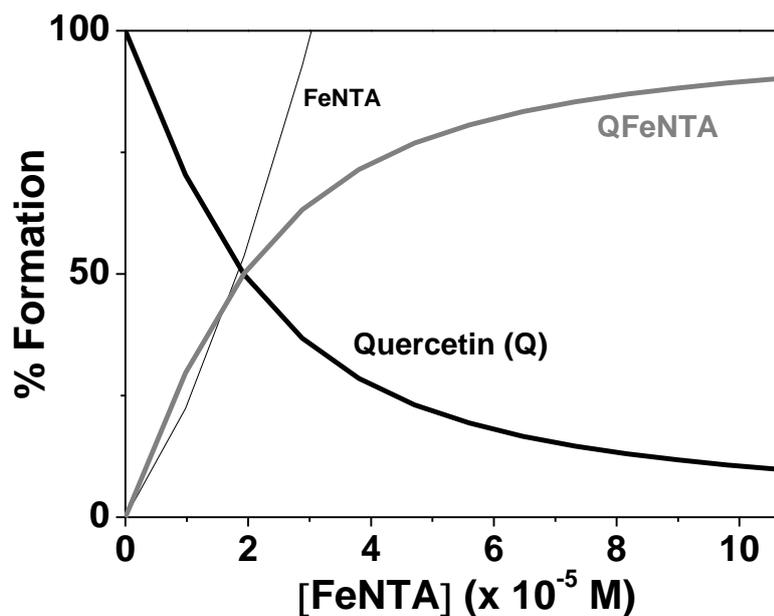


Annexe 1 : Titrage spectrophotométrique des complexes ferriques de la quercétine. Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1\text{ cm}$. $[\text{Quercétine}]_0 = 1,90 \times 10^{-5}\text{ M}$; $[\text{FeNTA}]_0/[\text{Quercétine}]_0 = 5,58$.

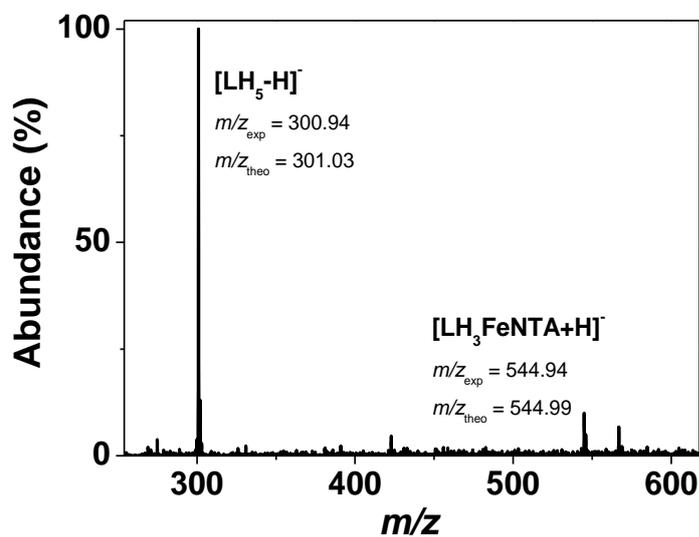


Annexe 2 : Spectre électronique des complexes ferriques de la quercétine. Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hepes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1\text{ cm}$.

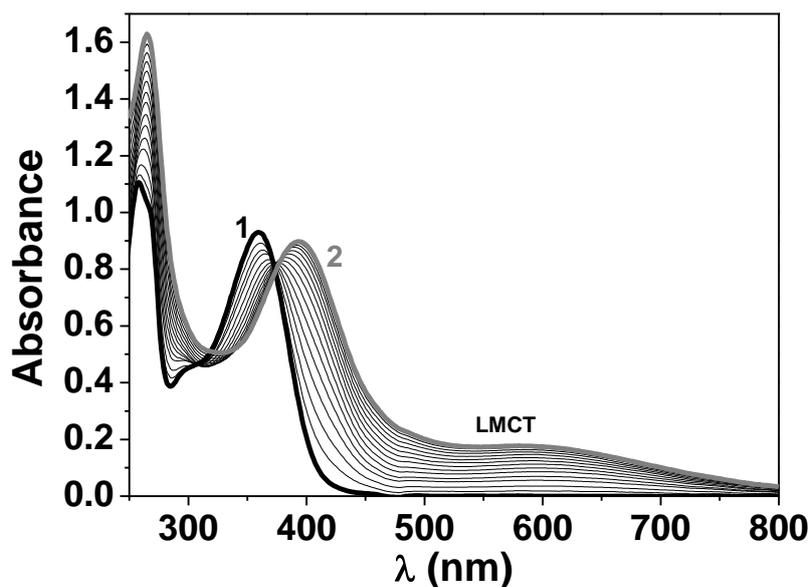
Annexe



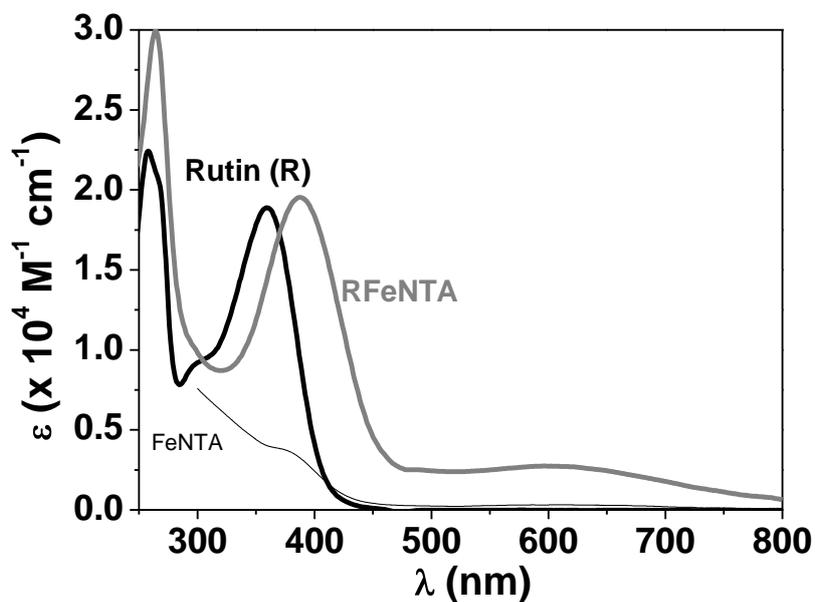
Annexe 3 : Courbes de distribution des complexes ferriques de la quercétine. Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm.



Annexe 4 : Spectre de masse en mode electrospray des complexes ferriques de la quercétine (notée LH5) enregistré en mode négatif en présence de NTA. Solvant : CH₃OH ; capillary voltage = 4000 V. [LH₃FeNTA]₀ = 5 × 10⁻⁵ M ; Fragmentor = -200 V.

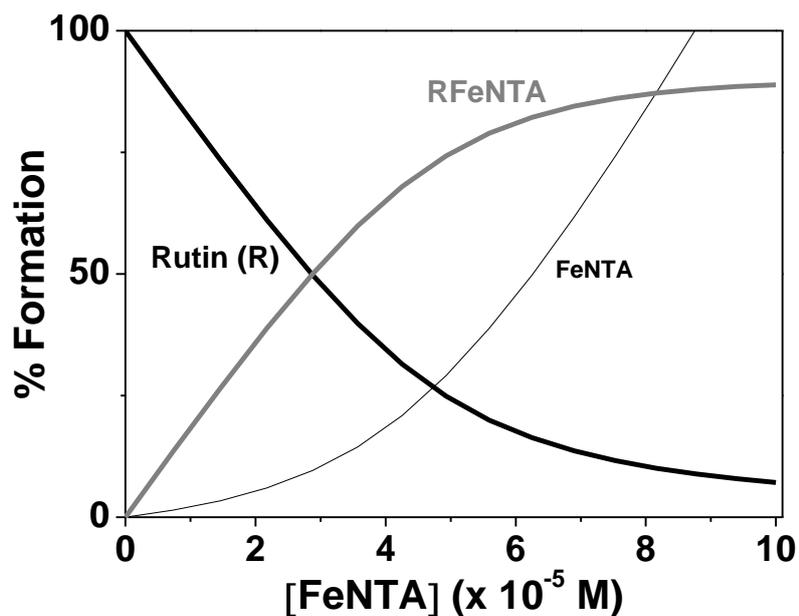


Annexe 5 : Titrages spectrophotométriques des complexes ferriques de la rutine. Solvant: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids); $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm. (1) $[\text{Rutine}]_0 = 4,94 \times 10^{-5}$ M ; (2) $[\text{FeNTA}]_0/[\text{Rutine}]_0 = 2,02$.

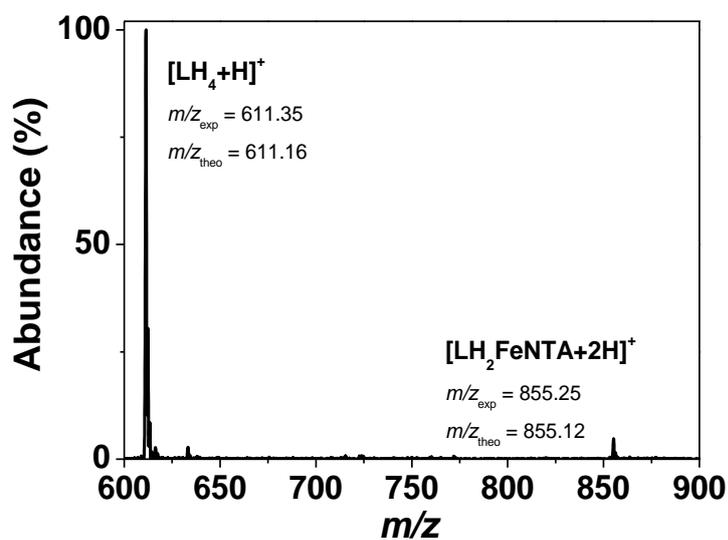


Annexe 6 : Spectres électroniques des complexes ferriques de la rutine. Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids); $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm.

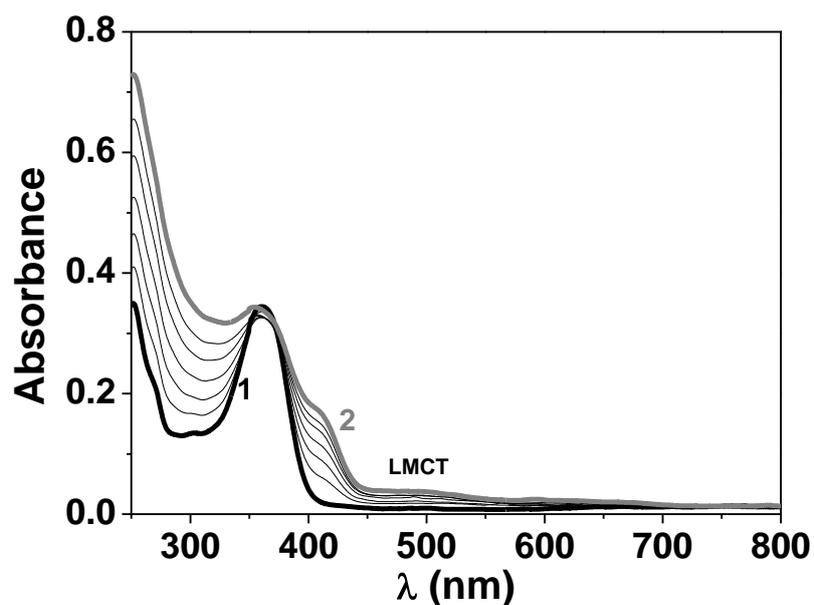
Annexe



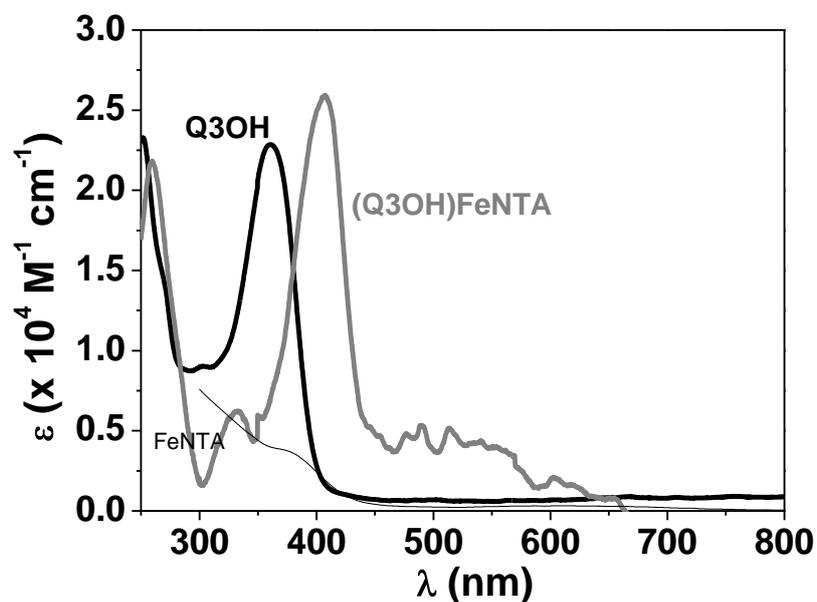
Annexe 7 : Courbes de distribution des complexes ferriques de la rutine. Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm.



Annexe 8 : Spectre de masse en mode electrospray des complexes ferriques de la rutine (notée LH₄) enregistré en mode positif en présence de NTA. Solvant : CH₃OH ; capillary voltage = 4000 V. [LH₂.FeNTA]₀ = 5 × 10⁻⁵ M ; Mode positif ; Fragmentor = +50V.

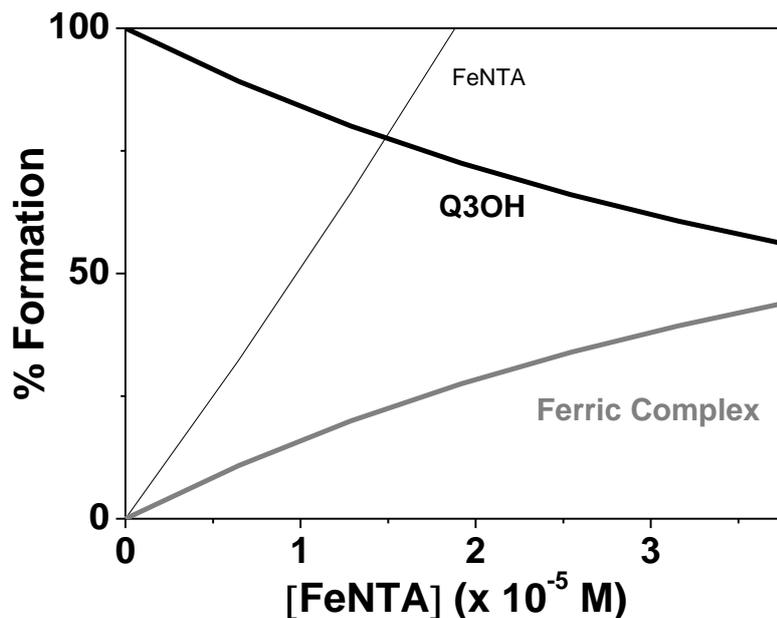


Annexe 9 : Titrages spectrophotométriques des complexes ferriques de la quercétine 3OH. Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm. (1) $[\text{Quercétine3OH}]_0 = 1,51 \times 10^{-5}$ M ; (2) $[\text{FeNTA}]_0/[\text{Quercétine3OH}]_0 = 2,49$.

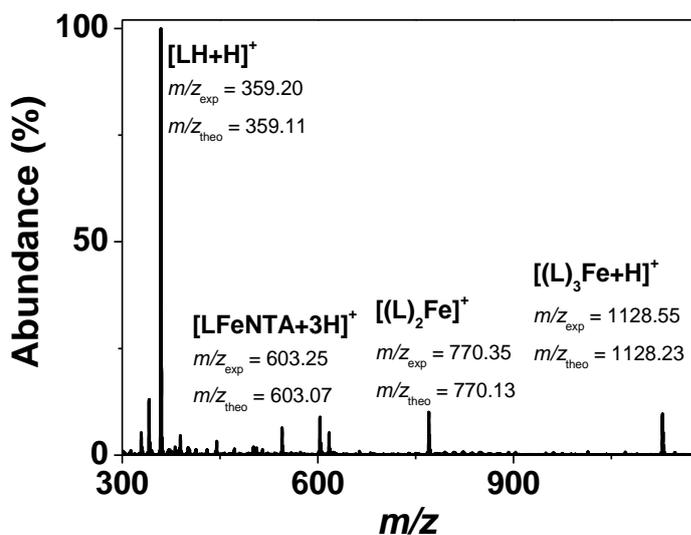


Annexe 10 : Spectres électroniques des complexes ferriques de la quercétine3OH. Solvant: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm.

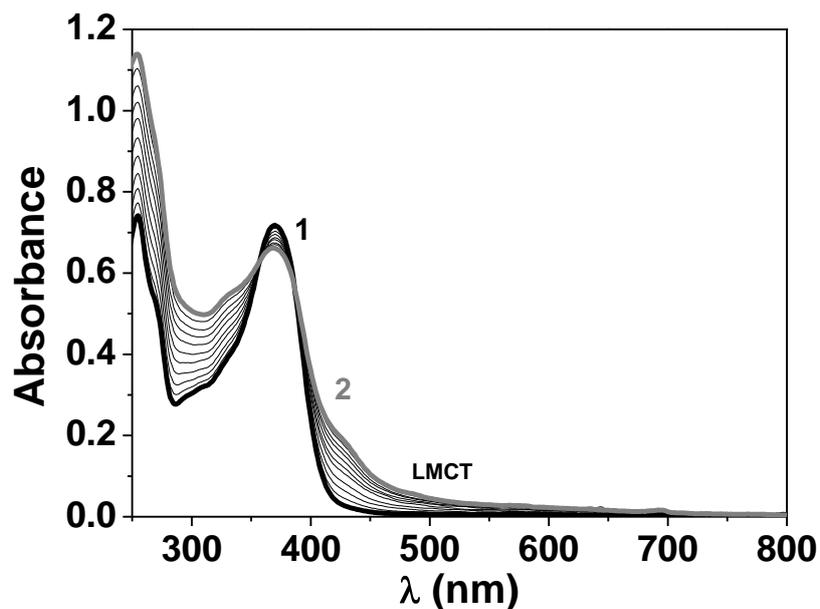
Annexe



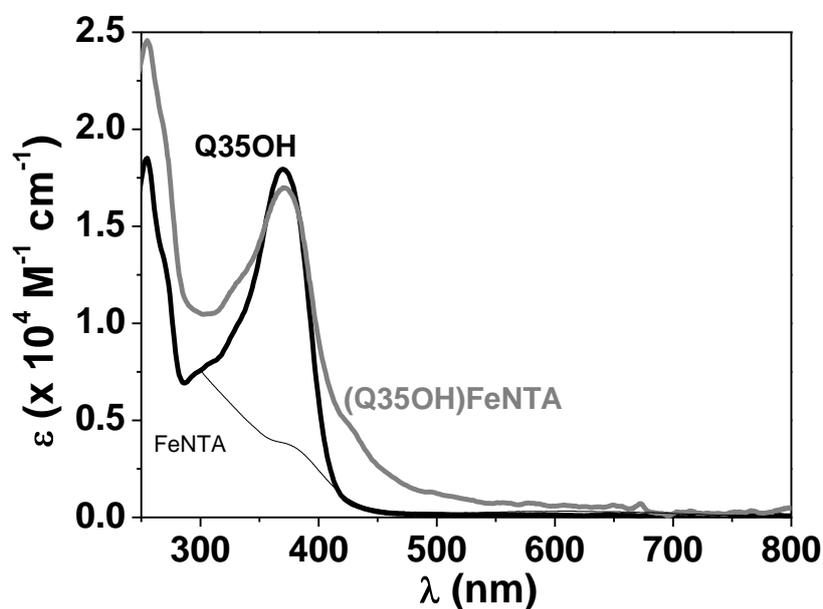
Annexe 11 : Courbe de distribution des complexes ferriques de la quercétine 3OH Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids); pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm.



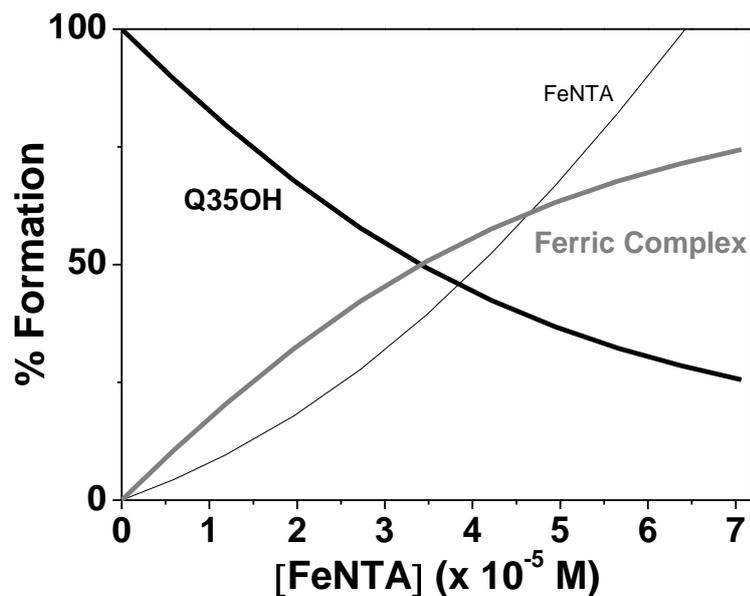
Annexe 12 : Spectre de masse en mode electrospray des complexes ferriques de la quercétine3OH (LH) enregistré en mode positif en présence de NTA. Solvant : CH_3OH ; capillary voltage = 4000 V. $[\text{L.FeNTA}]_0 = 5 \times 10^{-5}$ M ; Fragmentor = +150 V.



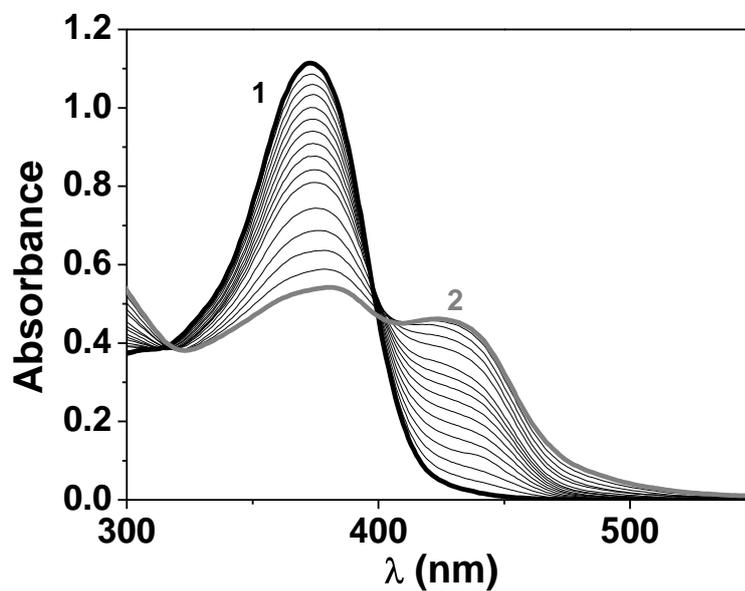
Annexe 13 : Titrages spectrophotométriques des complexes ferriques de la quercétine 35OH. Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm. (1) $[\text{Quercétine35OH}]_0 = 4,0 \times 10^{-5}$ M ; (2) $[\text{FeNTA}]_0/[\text{Quercétine35OH}]_0 = 1,77$.



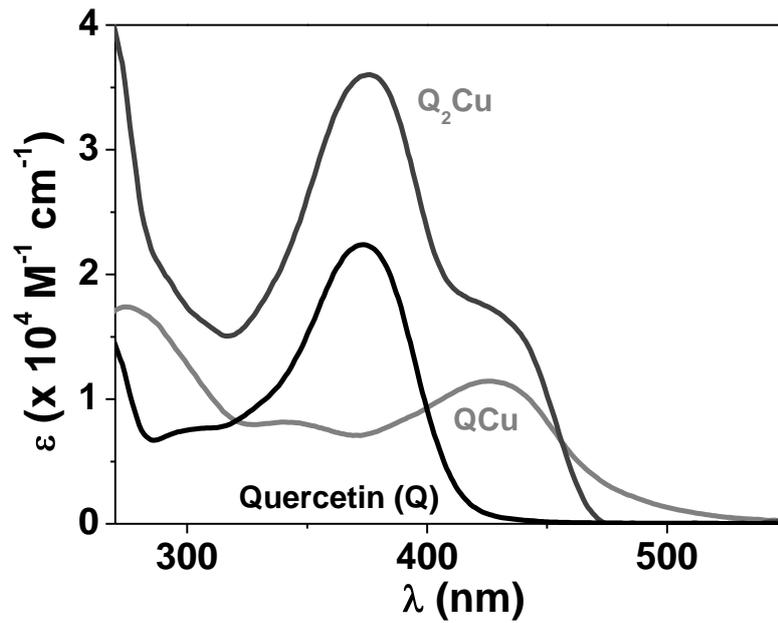
Annexe 14 : Spectres électroniques des complexes ferriques de la quercétine 35OH. Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm.



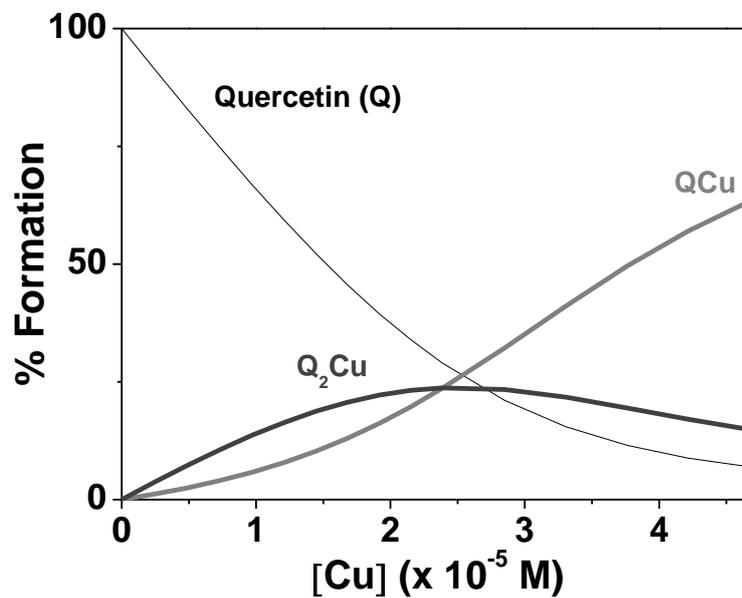
Annexe 15 : Courbe de distribution des complexes ferriques de la quercétine 35OH Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm.



Annexe 16 : Titrages spectrophotométriques des complexes quercétine Cu(II). Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm. (1) [Quercétine]₀ = 4,98 × 10⁻⁵ M ; (2) [Cu(II)]₀/[Quercétine]₀ = 0,94

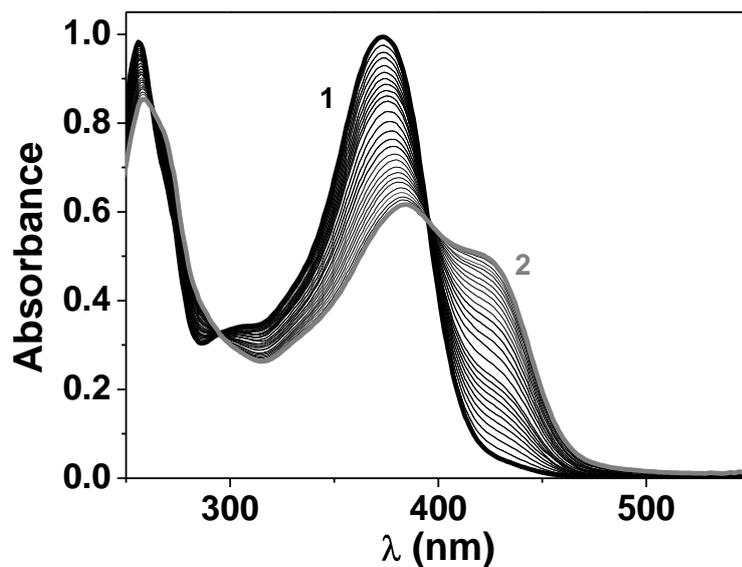


Annexe 17 : Spectres électroniques des complexes quercétine Cu(II). Solvant: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$.

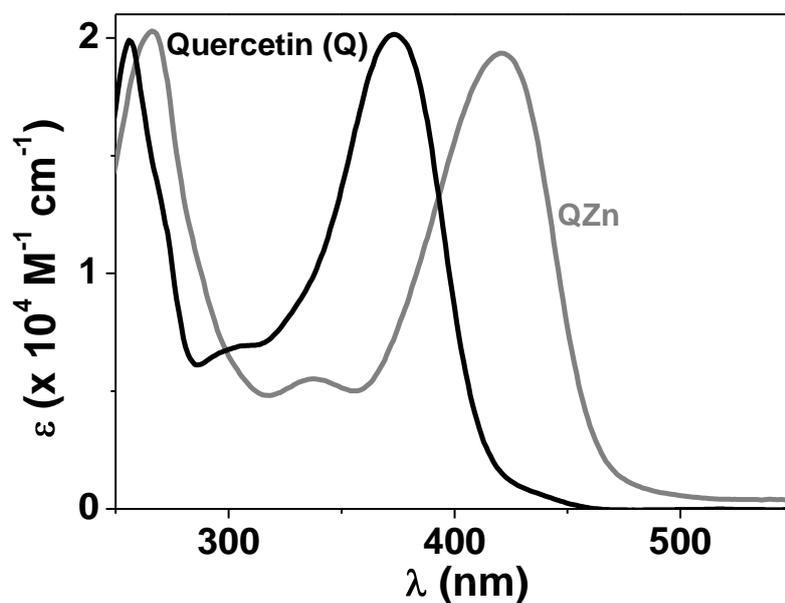


Annexe 18 : Courbe de distribution des complexes quercétine Cu(II). Solvant: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2) \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$.

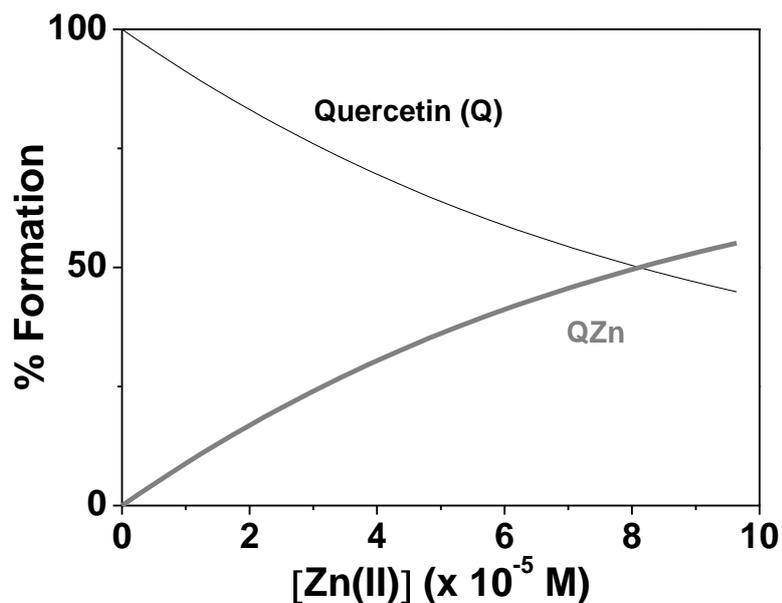
Annexe



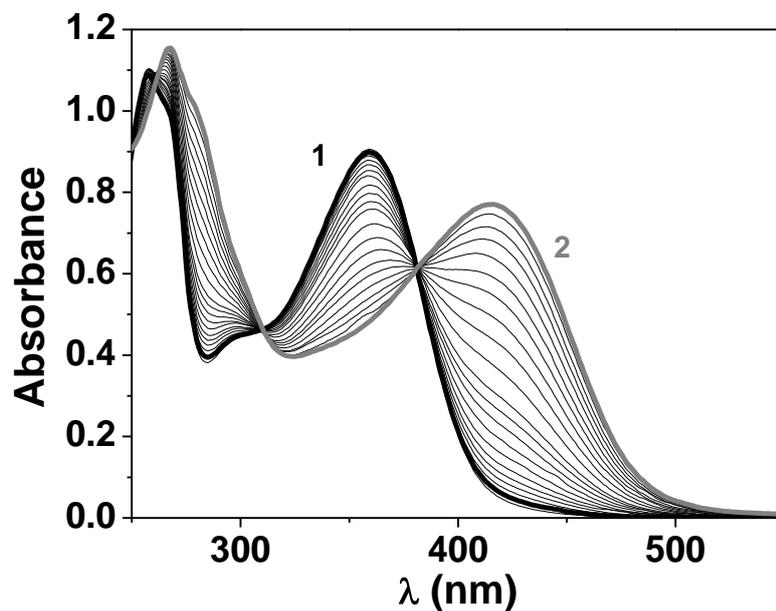
Annexe 19 : Titrages spectrophotométriques des complexes quercétine Zn(II). Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2) ^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm. (1) [Quercétine]₀ = $4,94 \times 10^{-5}$ M ; (2) [Zn(II)]₀/[Quercétine]₀ = 1,95.



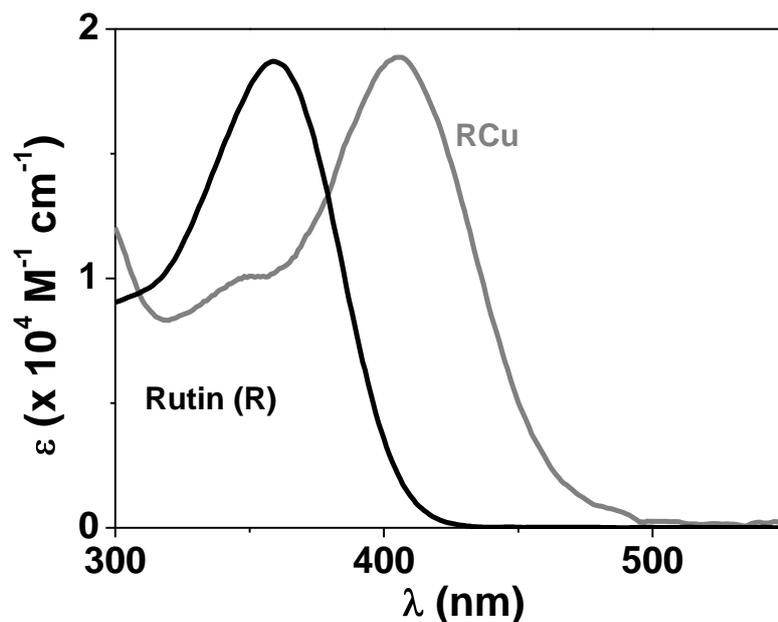
Annexe 20 : Spectres électroniques des complexes quercétine Zn(II). Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2) ^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm.



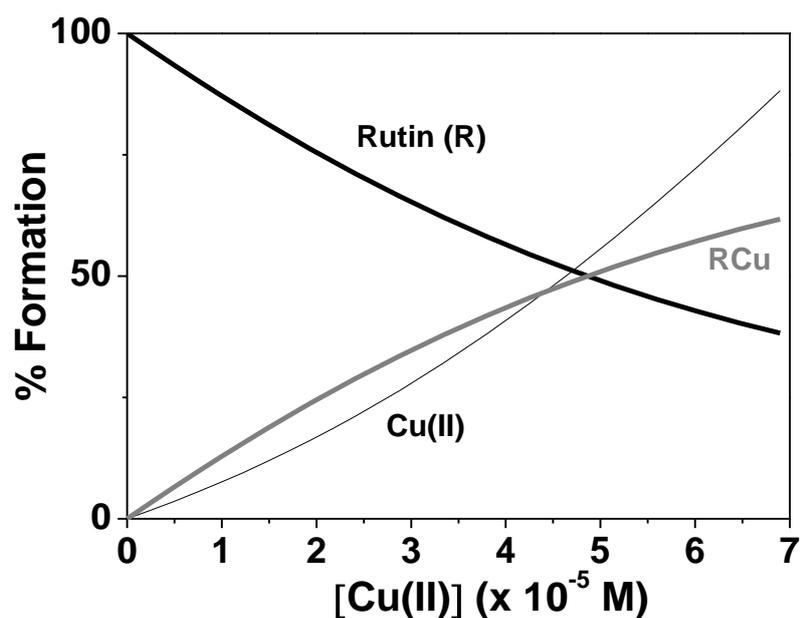
Annexe 21 : Courbe de distribution des complexes quercétine Zn(II). Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 en poids); pH = 7,4 (Tampon hzpes) ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm.



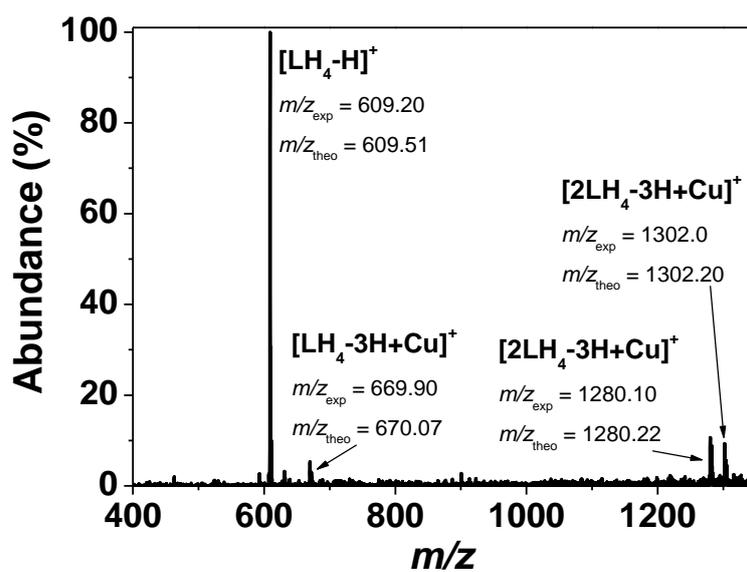
Annexe 22 : Titrages spectrophotométriques des complexes rutine Cu(II). Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hzpes) ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm. (1) [Rutine]₀ = 4,94 × 10⁻⁵ M ; (2) [Cu(II)]₀/[Rutine]₀ = 1,40.



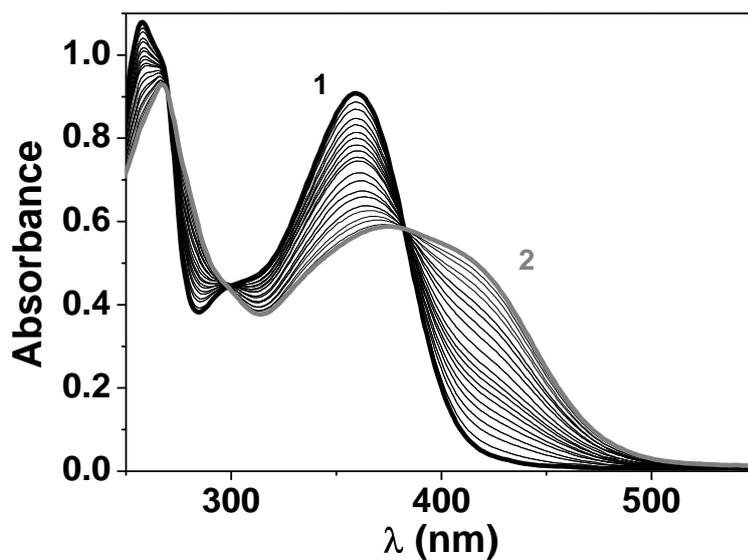
Annexe 23 : Spectres électroniques des complexes rutine Cu(II). Solvant: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$.



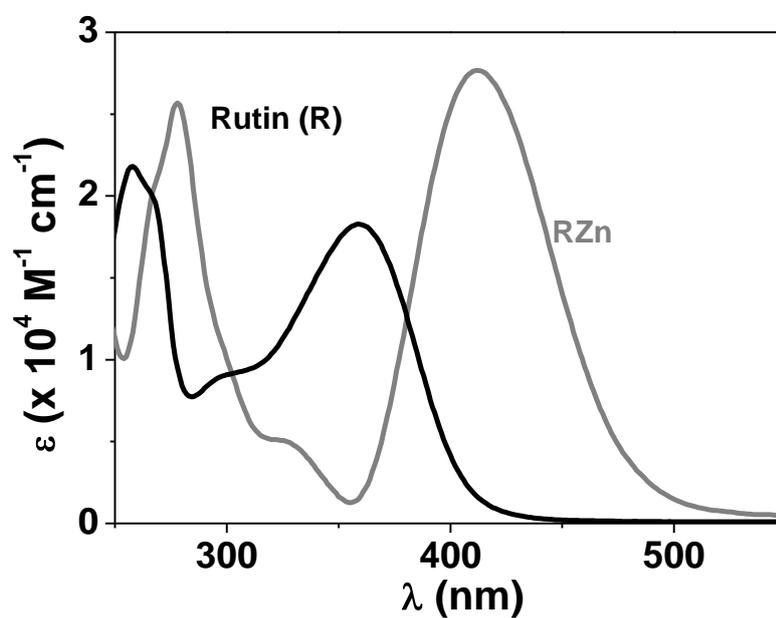
Annexe 24 : Courbe de distribution des complexes rutine Cu(II). Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; $\text{pH} = 7,4$ (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$.



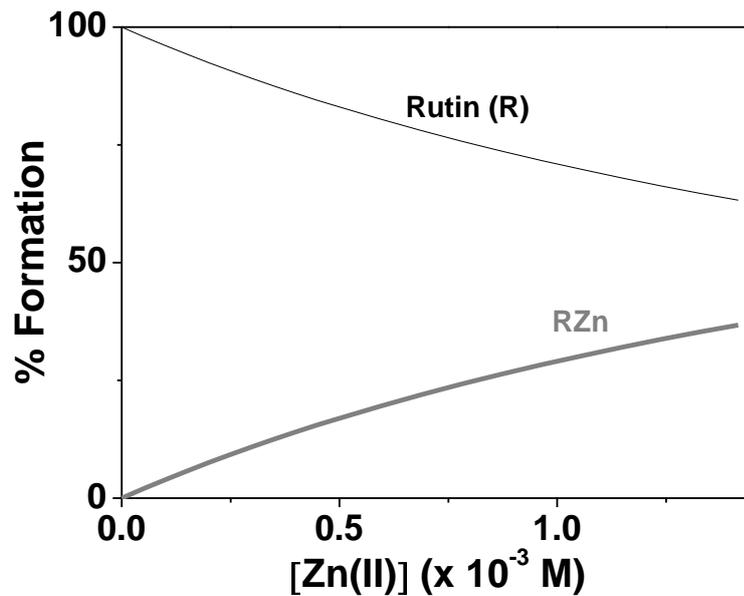
Annexe 25 : Spectre de masse en mode electrospray des complexes rutine Cu(II) (notée LH_4) enregistré en mode négatif. Solvant : CH_3OH ; capillary voltage = 4000 V. $[\text{LH}_4]_0 = [\text{Cu}]_0 = 8,7 \times 10^{-5}$ M; Fragmentor = -280 V.



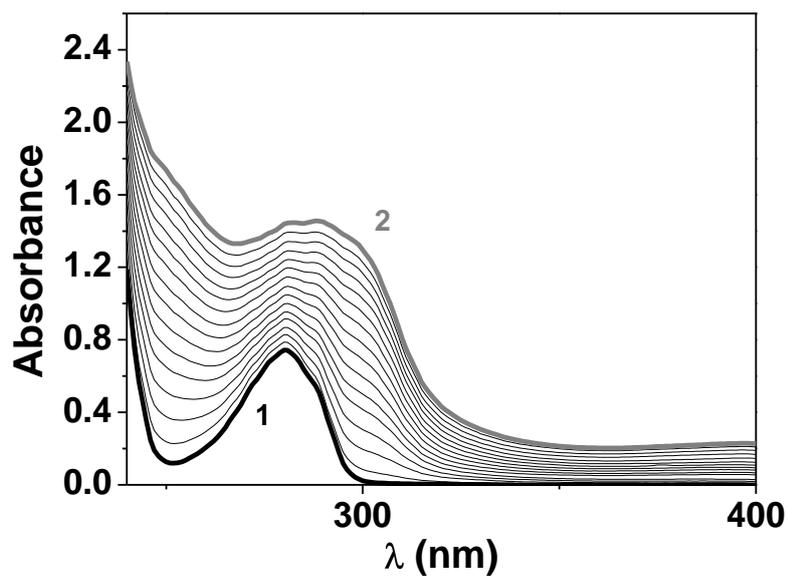
Annexe 26 : Titrages spectrophotométriques des complexes rutine Zn(II). Solvant : CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2) ^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm. [Rutine]₀ = $4,94 \times 10^{-5}$ M ; (2) [Zn(II)]₀/[Rutine]₀ = 28,54



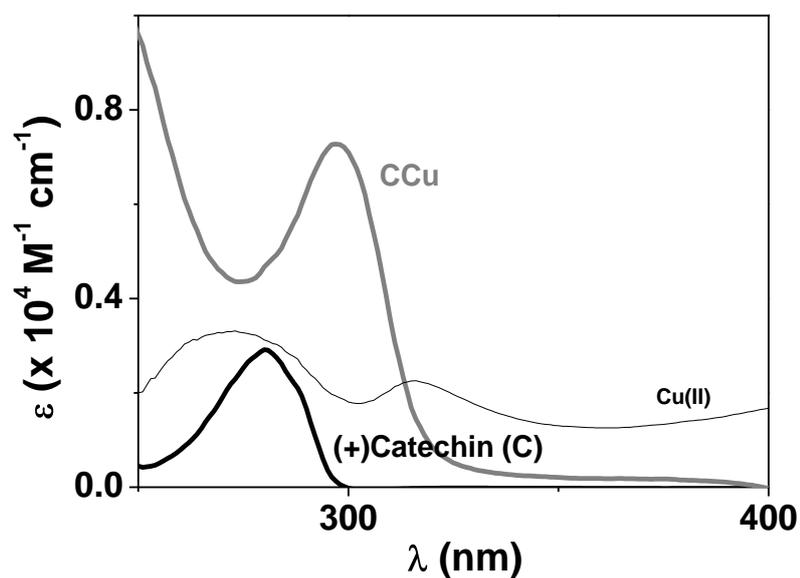
Annexe 27 : Spectres électroniques des complexes rutine Zn(II). Solvant: CH₃OH/H₂O (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hzpes) ; $T = 25,0(2) ^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm.



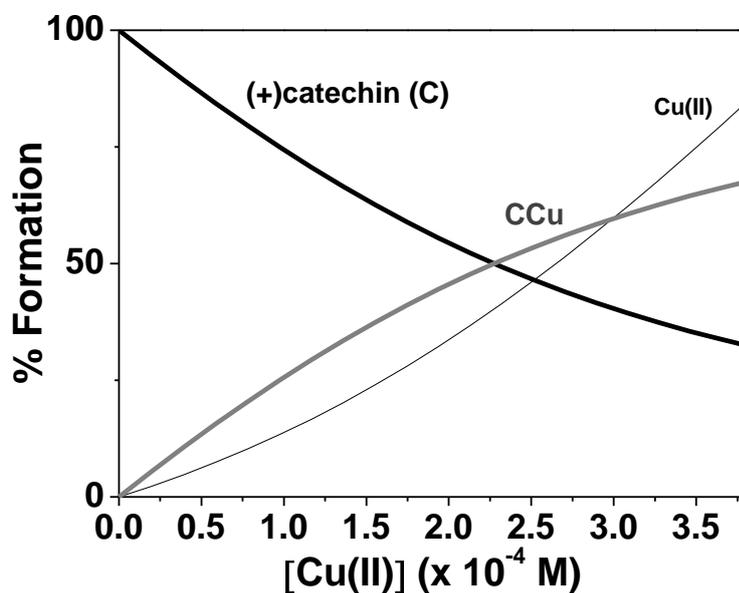
Annexe 28 : Courbe de distribution des complexes rutine Zn(II). Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm. $[\text{Quercétine } 3'4'\text{OH}]_0 = 2,89 \times 10^{-5}$ M.



Annexe 29 : Titrages spectrophotométriques des complexes (+)catechine Cu(II). Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25.0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1$ cm ; $[(+)\text{Catéchine}]_0 = 2,55 \times 10^{-4}$ M ; (2) $[\text{Cu(II)}]_0/[(+)\text{Catéchine}]_0 = 1,50$.



Annexe 30 : Spectres électroniques des complexes (+)catéchine Cu(II). Solvant : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$.



Annexe 31 : Courbe de distribution des complexes (+)catéchine Cu(II). Solvant: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20 en poids) ; pH = 7,4 (Tampon hépes) ; $T = 25,0(2)^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}$.