

République Algérienne Démocratique & Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université d'ABOU BEKR BELKAID de Tlemcen
Faculté des sciences de la nature et de la vie des sciences de la terre et de
l'univers, Département de biologie

Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT
en: Biologie

Spécialité : Physiologie et Biochimie de la Nutrition

Par : CHARIF Naima

**Effet des anthocyanes sur la β thalassémie : Etude
*in vitro***

Soutenue le :19/07/2020 Devant le jury composé de :

Mme Merzouk Hafida	Professeur	Univ. Tlemcen	Présidente
Mme Mokhtari Nassima	Professeur	Univ. Tlemcen	Directrice de thèse
Mme Kaddouri Hanane	Professeur	Univ. Oran	Examinatrice
Mme Mekki Khadidja	Professeur	Univ. Oran	Examinatrice
Mr Bensenane Bachir	MCA	Univ. Tlemcen	Examinateur

Année Universitaire :2019-2020

Dédicaces

Je dédie cette thèse de doctorat à mes parents,

A ma sœur Hideyet

A mes grands-parents

A mes tantes et mes oncles

A mes cousins et mes cousines, et à toute ma famille

A la mémoire de mes oncles Belhadj et Mustapha

A mes amies

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon cœur
et de ma pensée.*

Remerciements

Tout d'abord, Nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme le présent travail.

Dans un premier temps, je souhaite remercier ma directrice de thèse **Mme Mokhtari-Soulimane Nassima** Professeur à l'Université de Tlemcen et membre du Laboratoire de Recherche Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition. Je vous réitère mes remerciements et ma profonde gratitude et reconnaissance pour m'avoir guidé sur la voie de la recherche scientifique par vos précieux conseils et encouragements inestimables, j'ai énormément appris à vos côtés madame au cours de cette expérience de thèse tant d'un point de vue scientifique qu'humain.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à **Mme Merzouk Hafida**, professeur à l'Université de Tlemcen et directrice de Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (PPABIONUT) qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a facilité la réalisation de cette thèse. 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.

Je voudrais exprimer ma gratitude à **Mr Cherrak Sabri** Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, et membre du Laboratoire de Recherche Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition, pour ses orientations, ses conseils précieux, et le temps consacré durant la partie pratique de cette thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

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

Professeur Mekki Khadidja, et **Professeur Kaddouri Hanane** de l'Université d'Oran, et **Mr Bensenane SM Bachir** Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail. 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 remercie Monsieur **ELHABIRI Mourad**, Professeur et directeur de recherche au CNRS Université de Strasbourg, pour la fourniture des molécules étudiées dans cette thèse.

Je remercie très chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Je remercie finalement le personnel et 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.

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé au sein du laboratoire PPABIONUT physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition, université de Tlemcen en collaboration avec le laboratoire de chimie bioorganique et médicinal de l'université de Strasbourg.

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale :

Protective effect of natural and synthetic anthocyanins against tert-butyl-hydroperoxide-induced oxidative damages in normal and β -thalassemic major human erythrocytes *in vitro*. *current nutrition & food science*, 2020, 16, 1-10

Et a été présenté par des communications lors des congrès scientifiques nationaux et internationaux :

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Merzouk Hafida Effets de la cyanidin-3,5-di-o-glucoside vis-à-vis des dommages induits par l'hydroperoxyde de tert-butyle(tbhp) *in vitro*. Séminaire national sur l'application des sciences de la nature et de la vie : relation avec le monde productif. Bejaia2017

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Nacer Wassila, Merzouk Hafida Détermination des taux de viabilité cellulaire et du glutathion réduit érythrocytaire suite à une incubation avec la keracyanine chloride a différentes concentrations *in vitro*. Le 1er congrès international sur les biotechnologies au service du développement durable. Boumerdes 2017.

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Merzouk Hafida. Activité antioxydante / pro-oxydante dépendante de la concentration du 4',5',6,7-tetrahydroxy flavilyum chloride.2^{ème} séminaire national biologie et sante. SBA2017.

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Merzouk Hafida, Elhabiri Mourad L'effet protecteur de la cyanidin-3,5-di-o-glucoside contre la toxicité induite par le l'hydroperoxyde de tert-butyle (tbhp) *in vitro*.20^{ème} congrès de nutrition et santé. Belgique2017.

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Nacer Wassila, Merzouk Hafida Effets d'une anthocyane (la malvin chloride) vis-a-vis des dommages induits par l'hydroperoxyde de tert-butyle(tbhp) *in vitro*.7^{ème} congrès de la biologie médicale et médecine de laboratoire. Alger 2018.

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Merzouk Hafida, Dib Sid-Ahmed Elhabiri Mourad.

Effet d'une anthocyne (la cyanidin-3,5-di-o-glucoside) sur le statut redox des érythrocytes d'un enfant atteint d'une b-thalassémie majeur *in vitro* d'un patient atteint d'une β -thalassémie majeur *in vitro*. douzième rencontre pédiatrique de Tlemcen. Tlemcen2018.

Charif Naima, Mokhtari-Soulimane Nassima, Cherrak Sabri, Merzouk Hafida, Dib Sid-Ahmed Elhabiri Mourad.

Effet antioxydant de sur les érythrocytes d'un patient atteint d'une β -thalassémie majeur *in vitro*. 13^{eme} rencontre pédiatrique de Tlemcen. Tlemcen2019

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	5
1.Radicaux libres et stress oxydant / nitrosatif.....	5
2.Mécanismes générateurs de radicaux libres.....	6
3.Métaux de transition.....	8
4.Les antioxydants.....	9
5.Les anthocyanes	12
5.1Le rôle des anthocyanes dans le maintien de la santé humaine.....	15
6.Mécanisme d'Activité antioxydante des flavonoides.....	18
6.1Piégeage direct des EOR.....	18
6.2 Activation des enzymes antioxydantes.....	19
6.3 Activité de chélation des métaux.....	19
6.4 réductions des radicaux α -tocophéryle.....	19
6.5 Capacité d'inhiber les oxydases.....	20
6.6 Atténuer le stress oxydatif causé par l'oxyde nitrique.....	20
6.7 Augmentation des niveaux d'acide urique.....	21
6.8 Modification des propriétés pro-oxydantes d'antioxydants de faible poids moléculaire....	21
7.globule rouge et β thalassémie.....	21
7.1 Hémoglobine.....	22
7.2 β -thalassémies.....	23
7.3La Bêta-thalassémie majeure	23
7.4Physiopathologie.....	23
8.Thalassémie et stress oxydatif.....	26
9.Culture <i>in vitro</i> , Lymphocytes, et anthocyanes.....	29
Matériel et méthodes.....	30
1.Détermination de l'activité antiradicalaire par piégeage du radical DPPH	32
2.Etudes <i>in vitro</i> sur les globules rouges.....	33
2.1. Isolement des érythrocytes	33
2.2. Pré-incubation	33
2.3 Incubation	33
2.4 Test de viabilité cellulaire à la calcéine-AM.....	34
3.Isolement des lymphocytes	35
3.1 Test de transformation lymphoblastique (TTL).....	35
3.2Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT.....	36
4 Détermination des marqueurs du stress oxydant	37
4.1Dosage du glutathion réduit.....	37
4.2Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	37

5.Analyse statistique.....	38
Résultats et interprétations.....	39
1.Propriétés antiradicalaires (DPPH).....	39
2.Effet <i>in vitro</i> des anthocyanes sur les érythrocytes normaux.....	40
2.1Test de viabilité érythrocytaire a la calcéine.....	40
2.2Teneur en GSH érythrocytaire.....	45
2.3Teneurs en MDA érythrocytaires.....	49
3.Effet <i>in vitro</i> des anthocyanes sur les érythrocytes thalassémique.....	53
3. 1Test de viabilité érythrocytaire a la calcéine.....	53
3.2Teneur en GSH érythrocytaire.....	54
3.3Teneur en MDA érythrocytaire.....	55
4.Etude <i>in vitro</i> sur les lymphocytes.....	56
4.1 Indice de prolifération lymphocytaire.....	56
4.2Teneur en GSH lymphocytaire.....	58
4.3Teneur en MDA lymphocytaire.....	60
Discussion.....	61
Conclusion.....	71
Références bibliographiques.....	73

Liste des figures

Figure 1. Les différentes voies de formation d'espèces réactives de l'oxygène (EOR) et leur transformation.....	5
Figure 2. Enzymes oxydantes et antioxydantes.....	7
Figure 3. Aperçu des différentes espèces oxygénées réactives (EOR) et des antioxydants régulateurs de leur production.....	10
Figure 4. Composés phénoliques des petits fruits.....	13
Figure 5. Piégeage des espèces réactives de l'oxygène (R •) par un flavonoïde.....	19
Figure 6. Structure de l'hémoglobine.....	22
Figure 7. Physiopathologie des patients atteints de syndrome de thalassémie.....	25
Figure 8. Stress oxydant dans la β -thalassémie.....	28
Figure 9. Structures chimiques des différentes anthocyanes étudiées dans ce travail.....	31
Figure 10. Mécanisme de réduction du radical DPPH•.....	32
Figure 11. Formule chimique de l'acétoxyméthyl ester de la fluorescéine (Calcéine-AM).....	34
Figure 12. Représentation schématique du résultat de la stratification selon gradient de densité.....	35
Figure 13. Réaction du réactif d'Ellman avec le glutathion.....	37
Figure 14. Taux de viabilité d'une solution de globules rouges à 2% supplémentés en anthocyanes (200 μ M,100 μ M,50 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C.....	42
Figure 15 . Teneurs en GSH d'une solution de globules rouges à 2% supplémentés en anthocyanes (200 μ M,100 μ M,500 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C.....	46
Figure 16. teneurs en MDA d'une solution de globules rouges à 2% supplémentés en anthocyanes (200 μ M,100 μ M,200 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C.....	50
Figure 17 . Taux de viabilité d'une solution de globules rouges thalassémiques à 2% supplémentés en anthocyanes (100 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C.....	53
Figure 18 . Teneurs en GSH d'une solution de globules rouges thalassémiques à 2% supplémentés en anthocyanes (100 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C.....	54
Figure 19. teneurs en MDA d'une solution de globules rouges thalassémiques à 2% supplémentés en anthocyanes (100 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C.....	55

Liste des tableaux

Tableau1. Structures des anthocyanes	14
Tableau2. Activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH• des anthocyanes étudiées et du standard acide ascorbique.....	39
Tableau3. Indice de prolifération lymphocytaire en présence des différentes anthocyanes étudiés.....	57
Tableau4. Effets des différentes anthocyanes sur le taux de glutathion lymphocytaire.....	59
Tableau5. Effets des différentes anthocyanes sur le taux de MDA lymphocytaire.....	60

Liste des abréviations

AG: Acides gras

Anth : Anthocyane

CAT : la catalase

CE50 : Concentration efficace à 50%

Cl-Cy : Chlorure de cyanine

Cl-Kcy : Chlorure de kéracyanine

Cl-Mlv : Chlorure de malvine

ConA: Concanavalline A

COX : Cytochrome c oxydase

Cu : Cuivre

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

eNOS : L'Oxyde nitrique synthase endothélial dysfonctionnel

EOR : Espèces oxygénées réactives

ERN : espèces réactives à l'azote

Fe : Fer

GPx : Glutathion peroxydase

GPX : la glutathion peroxydase

GR : Globule rouge

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène

Hb: Hémoglobine

LDL: Low density lipoprotein

LDL : lipoprotéines humaines de faible densité

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes.

MCP-1 : protéine 1 chimioattractante des monocytes

MDA : Malondialdéhyde

metHB : Methémoglobine

MPO : La myéloperoxydase

MTT: 3-(4,5-Diméthyl thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

N.D : Non-déterminé

NO: Monoxyde d'azote

O₂^{•-}: Anion superoxyde

OH•: Radical hydroxyle

PBS: Tampon phosphate salin

pH: Potentiel hydrogen

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SH: Groupement thiol

SOD: Superoxyde dismutase

Syn 15 : chlorure de 6,7-dihydroxy-4'-methoxy-flavylium

Syn13 : chlorure de 4',7-dihydroxy-flavylium

Syn16 : chlorure de 6,7,3',4'-tétrahydroxy-flavylium

Syn17 : chlorure de 3',4'-dihydroxy-7-méthoxy-flavylium

TBA: Acide thiobarbiturique

TBARs: Thiobarbituric acid reactants

TBHP: Tert-butyl-hydroperoxide

TCA : Acide trichloroacétique

TNF- α : facteur de nécrose tumorale

TRX : le système de thioredoxine

TTL : Test de transformation lymphoblastique

XO : la xanthine oxydase

Zn : Zinc

Introduction

Le statut oxydant participe et module de nombreuses fonctions physiologiques normales des cellules, comme la transduction du signal. Cependant, le stress oxydant est cytotoxique, il oxyde les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant la mort cellulaire et des lésions organiques (Ribeil et al., 2013; Pecorini et al., 2020). En effet, le stress oxydant est impliqué dans l'apoptose et le vieillissement des cellules. Actuellement, il est bien établi que le stress oxydant est à l'origine ou aggrave les symptômes de nombreuses maladies, il est également impliqué dans les anémies hémolytiques. Bien que le stress oxydant ne soit pas l'étiologie primaire de ces différentes anémies, ce dernier joue un rôle important dans leurs physiopathologies.

Les globules rouges (GR) sont l'une des cibles des espèces réactives de l'oxygène (EOR) générées par un environnement de stress oxydant en raison de la présence d'une quantité importante d'acides gras hautement polyinsaturés dans leurs membranes, de leur riche apport en oxygène et de leur taux élevé d'hémoglobine (Hb), qui sont de puissants catalyseurs du stress oxydant érythrocytaire (Sadrzadeh et al., 1984; Clemens et al., 1987; Melo et al., 2019).

Le maintien de l'intégrité et de l'architecture des globules rouges devrait donc être considéré comme une perspective thérapeutique importante dans certaines conditions pathologiques associées à des troubles hématologiques (Toptas et al., 2006).

La β -thalassémie est un trouble héréditaire de la production d'Hb, qui affecte les gènes de la β globine (HBB) adultes (Weatherall et al., 2010).

Bien que la lésion primaire se situe au niveau du gène de la β -globine, les lésions des globules rouges sont en partie attribuables au stress oxydant. L'auto-oxydation et la précipitation de l'hémoglobine libérée au cours de l'hémolyse des globules rouges sont étroitement liées à l'épuisement des défenses antioxydantes des globules rouges (Pavlova et al., 2007).

Les dommages oxydatifs des cellules érythroïdes jouent un rôle crucial dans l'hémolyse en raison de l'érythropoïèse inefficace dans la moelle osseuse et de la courte durée de vie des globules rouges dans la circulation. De plus, les plaquettes et les leucocytes sont également exposés au stress oxydant. En conséquence, certains patients développent des phénomènes thromboemboliques et des infections bactériennes récurrentes en plus de l'anémie chronique (Fibach et Rachmilewitz, 2008).

Les transfusions thérapeutiques qui constituent le traitement standard chez ces patients, favorisent souvent une surcharge systémique en fer libre (Livrea et al., 1996; Oikonomidou et Rivella, 2017), ce qui potentialise en outre la génération de EOR (Chan et al., 1999) par la réaction de Fenton (Sadrzadeh et al., 1984).

Tous ces dommages oxydatifs importants subis par les globules rouges favorisent leur mort prématurée par hémolyse.

Plusieurs études mettent en évidence les nombreux effets protecteurs précieux des antioxydants naturels dans les systèmes biologiques. Il a en effet été observé que des antioxydants naturels tels que les anthocyanes (Kong et al., 2003; Saithong et al., 2018), les polyphénols du thé (Grinberg et al., 1997), la rutine (Grinberg et al., 1994) et d'autres flavonoïdes naturels ou synthétiques (Cherrak et al., 2016) peuvent améliorer de manière significative l'équilibre antioxydant / oxydant et contrecarrer les processus d'oxydation délétères au niveau des érythrocytes, contribuant ainsi à prolonger leur longévité (Tesoriere et al., 2006).

Les anthocyanes forment une classe intéressante de flavonoïdes constitués de dérivés polyhydroxy (glycosylés) de sels de 2-phénylbenzopyrylium (appelés flavylum). Ces anthocyanes constituent les pigments responsables de la majeure partie de la grande variété de couleurs, allant du jaune au bleu, que présentent les fleurs, les fruits et les feuilles d'une vaste gamme de plantes, où elles sont produites naturellement (Brouillard, 1982).

Les anthocyanes peuvent offrir des fonctions de protection telles que la protection des plantes contre le stress abiotique, la photoprotection contre les irradiations UV-B et les capacités de piégeage des EOR. La défense contre les herbivores et l'attraction des pollinisateurs sont également d'autres fonctions dédiées à ces composés. Il est important de noter que les anthocyanes présentent un intérêt majeur en raison de leurs principales implications dans le maintien de la santé humaine (Biswas et Mathur, 2017). Leur principale propriété est en effet leur activité antioxydante, qui joue un rôle essentiel dans la prévention contre une myriade de maladies et d'infections humaines. Elles peuvent être utiles dans de nombreuses applications pharmacologiques pour lutter contre diverses conditions de stress et maladies chroniques telles que l'inflammation, les complications neuronales et cardiovasculaires, le déclin cognitif, la fragilité et la perméabilité capillaires, les dommages du foie, la peroxydation des lipides, la prolifération tumorale et le diabète (Kong et al., 2003; Gowd et al., 2017; Lee et al., 2017; Sivamaruthi et al., 2018; Khoo et al., 2019).

L'utilisation de certains nutriments est aujourd'hui très préconisée dans le domaine de la santé. Les flavonoïdes et les anthocyanes en particulier ayant une puissante activité antioxydante permettent de lutter contre les effets fatals des EOR et du stress oxydant, en renforçant les défenses antioxydantes de l'organisme, ce qui représente l'enjeu majeur du maintien de la santé.

Comme on peut le constater au travers de plus en plus de travaux scientifiques, le domaine d'utilisation des antioxydants comme traitements d'appoint ou alternative aux traitements conventionnels est en plein essor.

La multiplicité des résultats expérimentaux mettent en évidence le lien entre leur utilisation et : une survenue moindre ou prévention du développement de différentes pathologies, une amélioration de l'état de santé et de la réponse immunitaire, une lutte contre les dégâts oxydatifs. Les antioxydants font l'objet de plusieurs recherches dont le but est le développement de nouvelles approches pour réduire le stress oxydant au cours de la bêta-thalassémie (Nasseri et al., 2017; Koonosying et al., 2018; Koonosying et al., 2020).

Actuellement, beaucoup d'études ont montré qu'une simple modification structurelle de certains composants antioxydants, pourrait augmenter considérablement leur activité antioxydante (Deng et al., 2006; Ullah et al., 2009; Drummond et al., 2017)

C'est dans cette optique que notre étude a été entreprise, elle vise à mettre en relief les effets antioxydants potentiels *in vitro* d'une série d'anthocyanes naturelles et synthétiques, sur des érythrocytes et des lymphocytes d'humains sains, et les érythrocytes de patients atteints d'une β thalassémie majeure afin de promouvoir les bienfaits de ces molécules bioactives et pouvoir développer un protocole thérapeutique à partir de molécules naturelles.

Les principaux volets abordés sont :

1. Etude de la relation concentration-effet antioxydant des anthocyanes *in vitro* sur des érythrocytes humains normaux qui sont soumis (effet protecteur) / ou pas (effet direct), à un stress oxydant via le TBHP, ce dernier favorisant une suite d'événements oxydatifs imitant la voie physiopathologique conduisant à l'hémolyse cellulaire.

2. Etude de l'effet anti-hémolytique, antioxydant des anthocyanes *in vitro* sur un modèle érythrocytaire humain de la β thalassémie majeure, soumis (effet protecteur) /ou pas (effet direct), à un stress oxydant via le TBHP.

3. Evaluation des effets des anthocyanes sur un deuxième modèle cellulaire à savoir, les lymphocytes soumis (effet protecteur) / ou pas (effet direct), à un stress oxydant via le TBHP.

Synthèse bibliographique :

1. Radicaux libres et stress oxydant / nitrosatif

les radicaux libres plus généralement connus sous le nom de EOR (espèces oxygénées réactives) ou espèces réactives à l'azote ERN (Firuzi et al., 2011), sont des molécules / fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non appariés, dont la présence les rend généralement très réactifs (Chandrasekaran et al., 2017). Les EOR les plus importants sont le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), l'anion radicalaire superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), l'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$) et les radicaux peroxyde ($\text{ROO}\cdot$) (Firuzi et al., 2011), ainsi que des espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'acide hypochloreux (HOCl) et le peroxydinitrite ($\text{ONOO}\cdot$) (Valko et al., 2007; Salisbury et Bronas, 2015) (Figure 1).

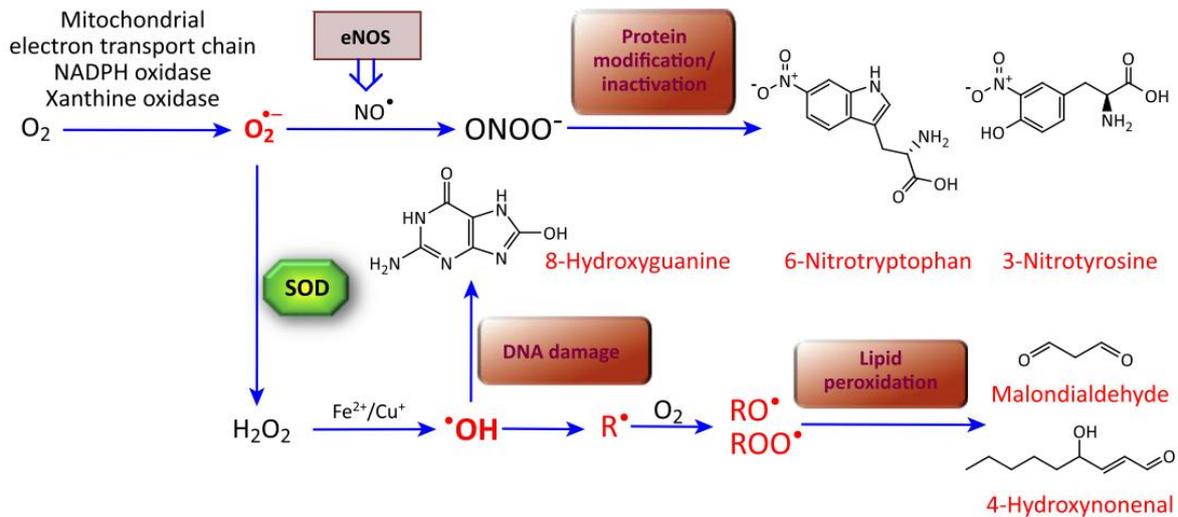


Figure 1. Les différentes voies de formation d'espèces réactives de l'oxygène (EOR) et leur transformation (Poprac et al., 2017)

La NADPH oxydase, les mitochondries et la xanthine oxydase sont considérés comme les principales sources cellulaires de l'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). L'oxyde nitrique synthase (NOS) (par exemple, NOS endothélial, eNOS) sont une famille d'enzymes qui catalysent la formation de l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) à partir de L-arginine. L'anion radical superoxyde réagit avec l'oxyde nitrique pour former l'anion peroxytrite ($ONOO^-$). Le peroxytrite intervient dans la modification par oxydation des résidus de protéines, ce qui entraîne la formation de 6-nitro-tryptophane et de 3-nitro-tyrosine. Le radical superoxyde est détruit par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour former du peroxyde d'hydrogène, qui est décomposé en eau et en oxygène par les enzymes catalase ou glutathion peroxydase. En présence de métaux rédox catalytiquement actifs (cuivre, fer), le peroxyde d'hydrogène est décomposé en radicaux hydroxyles réactifs pouvant réagir avec l'ADN et endommager principalement les unités de base de l'ADN : la 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) est un marqueur majeur des dommages oxydatifs de l'ADN. Les radicaux hydroxyles peuvent réagir avec les hydrocarbures (RH) pour former des radicaux hydrocarbonés (R^{\bullet}), pouvant ensuite réagir avec l'oxygène pour former les radicaux peroxy (ROO^{\bullet}) ou alcoyle (RO^{\bullet}) qui peuvent conduire à la peroxydation des lipides et la formation des marqueurs tels que le malondialdéhyde (MDA) et l'hydroxynonéal.

Les EOR et les ERN sont connus pour jouer un double rôle en tant qu'espèces pouvant être soit nuisibles, soit bénéfiques dans les systèmes vivants (Valko et al., 2007). Les effets bénéfiques des EOR / ERN ont tendance à se produire lorsque celles-ci sont présentes à des concentrations modérées et impliquent leur participation à divers rôles physiologiques tels que la différenciation cellulaire, la régulation de la croissance, le tonus vasculaire et les réponses immunitaires et nombreuses voies de signalisation cellulaires (Droge, 2002; Wu et al., 2015; Forman, 2016). Les effets nocifs des radicaux libres se produisent dans les systèmes biologiques en cas de surproduction de EOR et / ou de ERN d'une part, et une carence en enzymes antioxydantes ou en antioxydants de faible poids moléculaire d'autre part. Un équilibre entre les effets bénéfiques et néfastes des EOR / ERN est un aspect important des organismes sains. Il est obtenu grâce à un ensemble de mécanismes appelées « régulation rédox » (Valko et al., 2007). Le stress oxydant / nitrosatif résulte d'un déséquilibre entre la formation de EOR / ERN et la capacité réduite d'un organisme à détoxifier ces intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qu'ils causent.

2. Mécanismes générateurs de radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être produits à partir de sources endogènes et / ou exogènes (Halliwell, 2011). Les sources endogènes les plus importantes de radicaux libres sont les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (XO) et l'Oxyde nitrique synthase endothélial dysfonctionnel (eNOS). De plus, les métaux libres d'oxydo-réduction (non liés) tels que le fer et le cuivre peuvent générer des radicaux libres lors de leur décomposition catalytique en peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) (Valko et al., 2007) (Figure 2).

Les effets nocifs des radicaux libres peuvent être contrôlés par des substances appelées antioxydants. Les cellules vivantes contiennent un grand nombre d'espèces antioxydantes de faible poids moléculaire (par exemple, vitamines E et C, caroténoïdes, flavonoïdes, etc.) et des enzymes antioxydantes de poids moléculaire supérieur, qui servent toutes les deux à prévenir ou à réparer les dommages causés par les radicaux libres. Les enzymes antioxydantes les plus importantes sont la SOD, la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et le système de thioredoxine TRX (Lehoux, 2006).

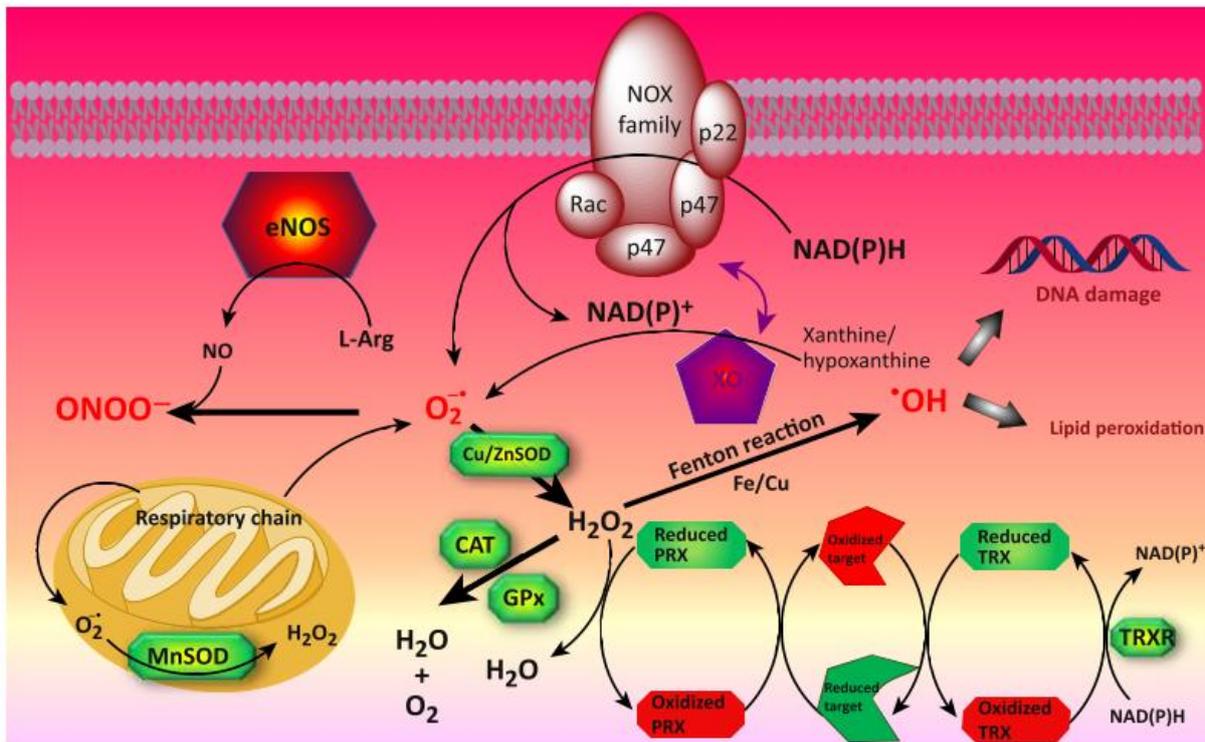


Figure 2. Enzymes oxydantes et antioxydantes (Poprac et al., 2017)

L'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est généré par l'activation de la NAD (P) H oxydase (NOX), de la xanthine oxydase (XO) ou par l'intermédiaire de la chaîne de transport respiratoire mitochondrial. L'anion radical superoxyde peut être transformé soit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD), soit en peroxynitrite ($ONOO^-$) par le biais d'une interaction avec l'oxyde nitrique (NO), qui est générée par la NO synthase endothéliale (eNOS). La concentration physiologique en peroxyde d'hydrogène est maintenue par les enzymes catalase (CAT) et / ou glutathion peroxydase (GPX). En présence de métaux rédox, une concentration excessive de peroxyde d'hydrogène peut entraîner la formation de radicaux hydroxyles. Les peroxyrédoxine (PRX) sont les principaux acteurs de l'élimination de H_2O_2 et de la régulation rédox.

4. Les antioxydants

L'exposition aux radicaux libres de diverses sources a conduit les organismes à développer une série de mécanismes de défense (Cadenas, 1997). Les mécanismes de défense contre le stress oxydant induit par les radicaux libres impliquent : des mécanismes préventifs, des mécanismes de réparation, des défenses physiques, et des défenses antioxydantes. Les défenses antioxydantes enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). Les antioxydants non enzymatiques sont représentés par l'acide ascorbique (vitamine C), α -tocophérol (vitamine E), glutathion (GSH), caroténoïdes, flavonoïdes et autres antioxydants (Figure 3). Dans des conditions normales, il existe un équilibre entre les activités et les niveaux intracellulaires de ces antioxydants. Cet équilibre est essentiel à la survie des organismes et à leur santé (Haleng et al., 2007 ; Procházková et al., 2011).

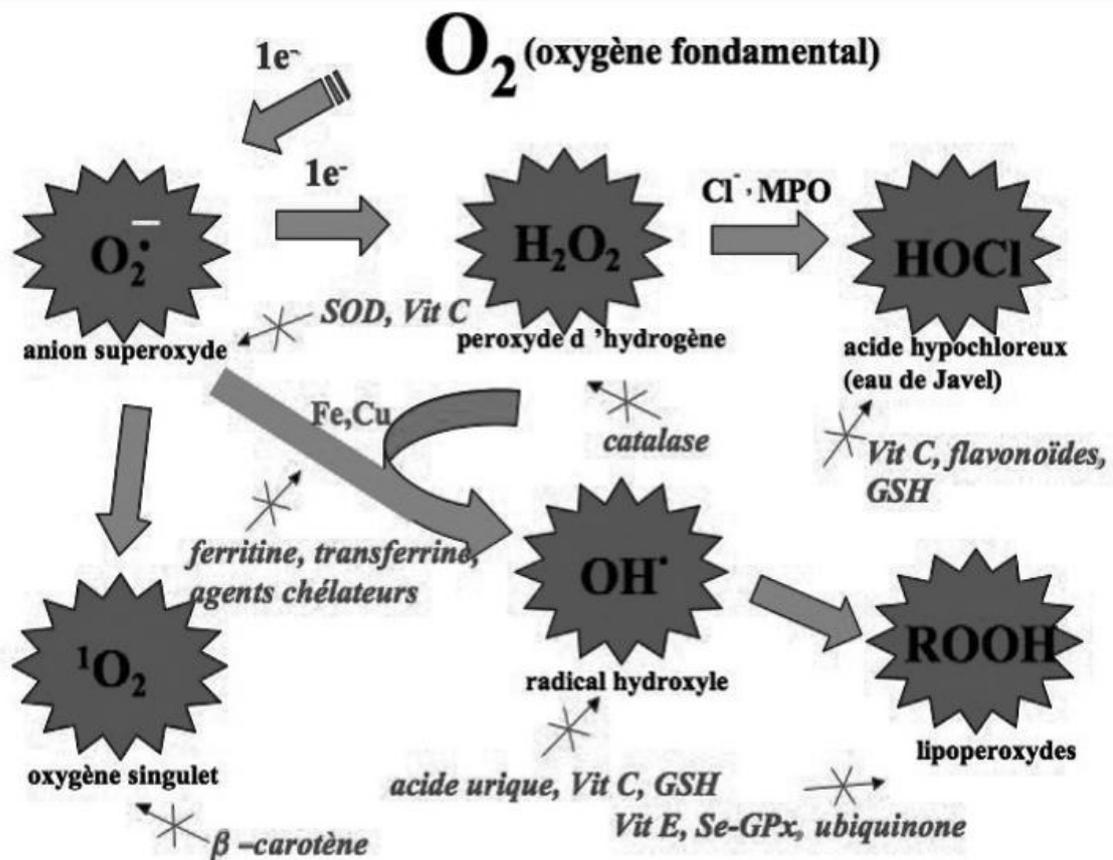


Figure 3 : Aperçu des différentes espèces oxygénées réactives (EOR) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al., 2007)

L'un des principaux antioxydants au thiol et du tampon rédox de la cellule, le tripeptide glutathion (GSH) (Masella et al., 2005; Gaucher et al., 2018).

La forme oxydée du glutathion est le GSSG, le disulfure de glutathion. Le glutathion est très abondant dans le cytosol (1 à 11 mM), les noyaux (3 à 15 mM) et les mitochondries (5 à 11 mM), et constitue le principal antioxydant soluble dans ces compartiments cellulaires. Le GSH étant synthétisé dans le cytosol par l'action séquentielle de glutamate – cystéine ligase et de glutathion synthétase, sa présence dans les mitochondries nécessite un transport de la membrane interne. Deux protéines mitochondriales ont la capacité de transporter le GSH, la dicarboxylate et la 2-oxoglutarate. Il a été démontré que le GSH exogène (additionné de l'extérieur) était facilement absorbé par les mitochondries, malgré le GSH (~8 mM) présent dans la matrice mitochondriale (Shen et al., 2005) . Il apparaît donc que le GSH est repris contre un gradient de concentration.

Le GSH dans le noyau maintient l'état redox des protéines sulfhydryles essentielles à la réparation et à l'expression de l'ADN (Nogueira et al., 2004).

Les principaux rôles protecteurs du glutathion contre le stress oxydant sont :

- (i) Le glutathion est un cofacteur de plusieurs enzymes de détoxification contre le stress oxydant, par exemple la glutathion peroxydase (GPx), glutathion transférase et autres ;
- (ii) Il participe au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique ;
- (iii) Il élimine directement le radical hydroxyle et l'oxygène singulet, en détoxifiant le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes de lipides par l'action catalytique de la glutathion peroxydase ;
- (iv) Il est capable de régénérer les antioxydants les plus importants, les vitamines C et E, pour les ramener à leurs formes actives (Masella et al., 2005; Domazetovic et al., 2017; Adeoye et al., 2018).

La capacité du glutathion à régénérer les principaux antioxydants est liée à l'état redox du couple glutathion disulfure-glutathion (GSSG / 2GSH) (Pastore et al., 2003; Valko et al., 2007).

Les produits naturels dérivés de plantes ont récemment reçu beaucoup d'attention en tant qu'agents chimiopréventif et chimiothérapeutiques potentiels. Parmi ceux-ci, une grande attention a été accordée aux produits naturels ayant des activités antioxydantes établies et une

moindre toxicité dans les cellules normales (Lopez-Lazaro, 2002; Surh, 2003; Feng et al., 2005; Williamson, 2017).

Parmi les types les plus courants de polyphénols végétaux : les flavonoïdes, sont des composés qui donnent du goût et des couleurs aux fruits et aux légumes. Plus de 5000 flavonoïdes différents ont été décrits (Ross et Kasum, 2002). Il existe six grandes sous-catégories de flavonoïdes : anthocyanes, flavones, flavonols, flavanones, catéchines et flavanols et isoflavones (Hertog et al., 1995; Ross et Kasum, 2002).

Les anthocyanes méritent beaucoup d'attention, en raison de leur omniprésence dans l'alimentation humaine (Sigurdson et al., 2018).

5. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos = fleur et du kianos = bleu) constituent le plus grand groupe de pigments hydrosolubles du règne végétal et appartiennent au sous-groupe flavonoïde des polyphénols (Figure 4). Elles sont responsables des couleurs roses, rouges, violettes et bleues dans les fleurs, les fruits et autres tissus végétaux. Chimiquement, il s'agit de glycosides ou d'acylglycosides polyhydroxylés ou polyméthoxylés de leurs chromophores d'anthocyanidine respectifs. Les anthocyanidines sont des dérivés oxygénés de sels de 2-phénylbenzopyrylium (C6-C3-C6) ou de flavylium ; ils se distinguent des autres flavonoïdes en tant que classe séparée par leur capacité à former des cations flavylium (Han et al., 2007; Castaneda-Ovando et al., 2009).

Les anthocyanes offrent plusieurs prestations aux plantes notamment, l'attraction des pollinisateurs et la protection contre les bactéries et le stress oxydant. Ils ont montré un large éventail d'applications pharmacologiques contre diverses conditions de stress et maladies chroniques comme l'inflammation, le déclin cognitif, le dysfonctionnement neuronal, la fragilité et la perméabilité capillaire, l'agrégation plaquettaire, les complications cardiovasculaires, les lésions hépatiques, la peroxydation lipidique et la prolifération des cellules cancéreuses (Kong et al., 2003; Chen et al., 2016; Xie et al., 2018). Beaucoup de ces activités biologiques ont été attribuées à la puissante activité antiradicalaire et antioxydante des anthocyanes (Jin et al., 2011; Bao et al., 2018).

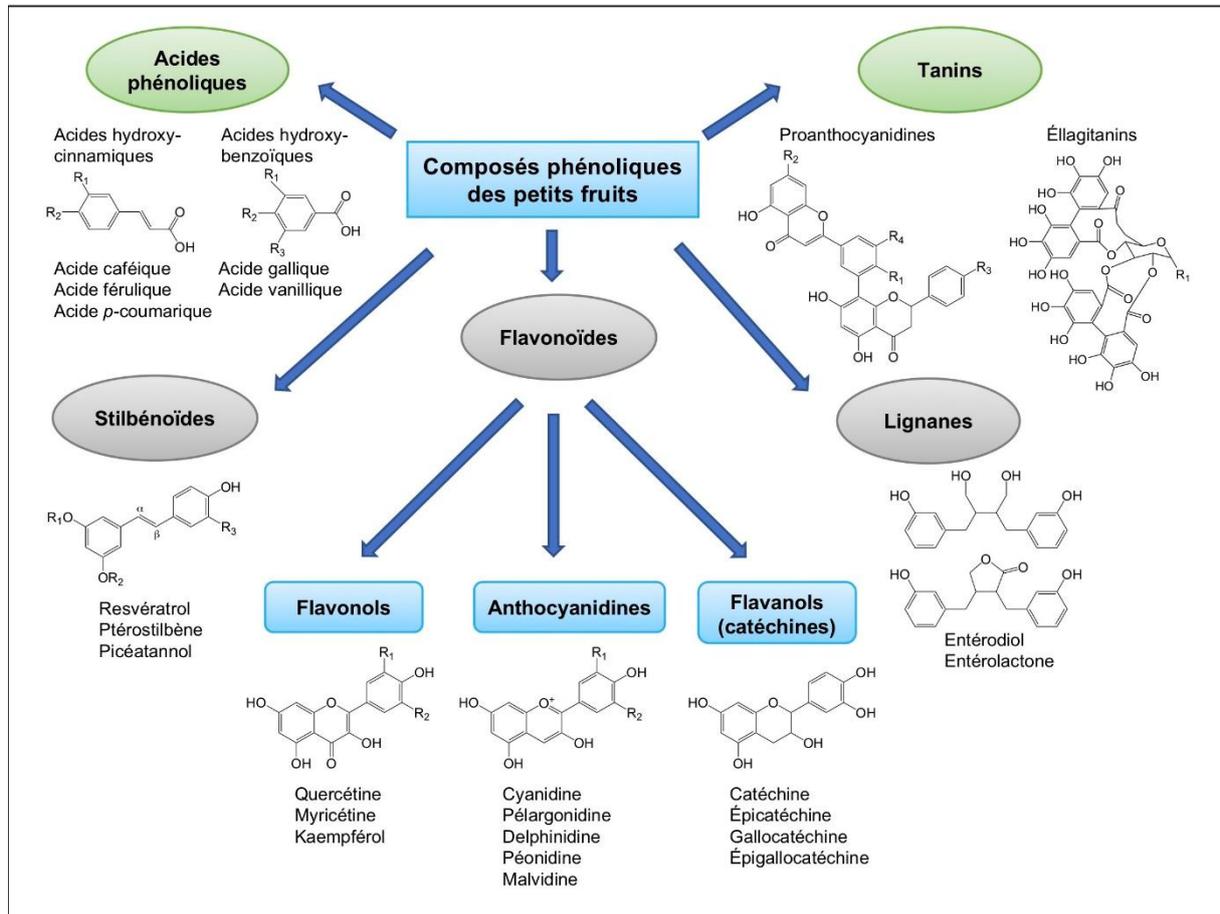
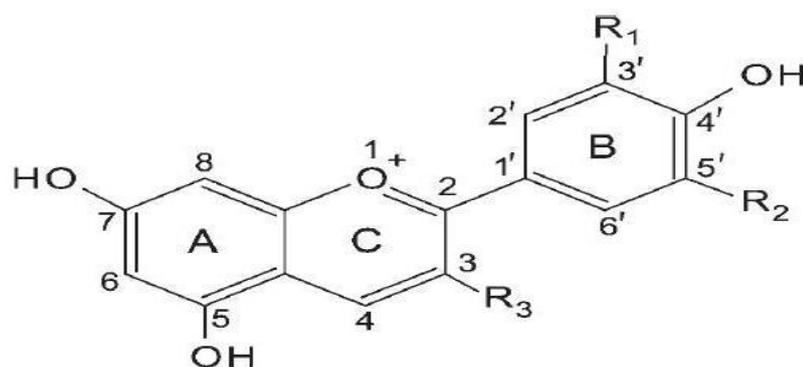


Figure 4. Composés phénoliques des petits fruits(Paredes-López et al., 2010)

Environ plusieurs centaines d'anthocyanes ont été identifiées. elles varient d'un point de vue : (1) du nombre et de la position des groupes hydroxyle et méthoxyle sur le squelette de l'anthocyanidine de base ; (2) l'identité, le nombre et les positions auxquelles les sucres sont attachés ; et (3) le degré de l'acylation du sucre (Prior, 2004). Ainsi, les structures chimiques des anthocyanes varient considérablement en fonction de l'ampleur de la glycosylation et de l'acylation (Hou et al., 2004) .

Les six anthocyanidines couramment trouvées dans les plantes sont les suivantes : pélargonidine, cyanidine, delphinidine, peonidine, pétunidine et malvidine (Tableau1). La cyanidine est l'anthocyanidine la plus répandue dans la nature. Les différences de structure chimique de ces six anthocyanidines courantes se produisent aux positions 3'et 5' du cycle B. En général, la structure chimique (position, nombre et type de substitutions) de chaque molécule d'anthocyane a une grande influence sur le degré avec lequel les anthocyanes exercent leurs propriétés bioactives et influent sur la localisation intracellulaire de ces pigments(Prior et Wu, 2006).

Tableau1. Structures des anthocyanes (Wang et al., 2008)



Aglycone	R ₁	R ₂	R ₃
Delphinidin	OH	OH	OH
Cyanidin	OH	H	OH
Petunidin	OCH ₃	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	OH
Pelargonidin	H	H	OH

5.1 Le rôle des anthocyanes dans le maintien de la santé humaine

Les anthocyanes sont impliqués dans de nombreuses activités biologiques pouvant avoir un impact positif sur la santé. Plusieurs études ont porté sur leur utilisation à des fins thérapeutiques, mais ces dernières années seulement, certaines propriétés pharmacologiques spécifiques et mesurables de pigments d'anthocyanes isolés ont été vérifiées de manière concluante par des essais *in vitro*, *in vivo* ou des essais cliniques rigoureusement contrôlés. (Lila, 2004; Cassidy et al., 2016; Wallace et al., 2016; Scarano et al., 2018). Ces pigments peuvent réduire le risque de maladies coronariennes par la modulation de la vasomotricité artérielle, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire ou la protection endothéliale (Colantuoni et al., 1991; Rechner et Kroner, 2005; Cassidy et al., 2016; Cassidy, 2018). En outre, les anthocyanes pourraient exercer une activité anticancéreuse (Anwar et al., 2016; Venancio et al., 2017), réduire les atteintes inflammatoires et également moduler la réponse immunitaire (Taverniti et al., 2014; Amini, 2017; Papakotsi, 2018; Wu et al., 2018; Xie et al., 2018). Tous ces effets pourraient être médiés par leur activité antioxydante. L'acuité visuelle peut également être nettement améliorée par l'administration de pigments anthocyaniques à l'animal et à l'homme (Muth et al., 2000; Nakaishi et al., 2000; Nomi et al., 2019).

Dans divers essais de recherche *in vitro* et *in vivo*, il a été démontré que les anthocyanes présentaient une activité intéressante contre plusieurs types de cellules cancéreuses (Peiffer et al., 2016; Mazewski et al., 2017; Fernández et al., 2018; Mazzoni et al., 2019). La capacité des pigments anthocyaniques à interférer avec le processus de carcinogenèse semble être liée à de multiples mécanismes d'action potentiels, notamment l'inhibition des cyclooxygénases (COX), une puissante activité antioxydante en tant que piègeur de radicaux, anti-inflammatoire, la suppression de la prolifération cellulaire et l'induction de protéines d'apoptose et de différenciation (Hou, 2003; Wang et Stoner, 2008; Tsai et al., 2017).

Plusieurs études ont révélé que les anthocyanes inhibent la formation de tumeurs en bloquant l'activation d'une voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK). Ces rapports ont fourni la première indication d'une base moléculaire expliquant pourquoi les anthocyanes ont des propriétés anticancéreuses (Hou et al., 2004; Layosa et al., 2019). Le rôle des anthocyanes dans la protection des maladies cardiovasculaires est fortement lié à la protection contre le stress oxydant et à l'augmentation de l'activité antioxydante plasmatique. Des extraits d'anthocyanes de myrtille, et de sureau ont montré une capacité de relaxation dépendante de l'endothélium au niveau des artères coronaires porcines (Bell et Gochenaur, 2006). De plus, l'ingestion permanente d'anthocyanes augmentait les concentrations de glutathion chez le rat

(Toufektsian et al., 2008; Norris et al., 2016; Wu et al., 2018) et inhibait l'expression de la protéine inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) ainsi que la production de NO au niveau des macrophages exposés à un stimulus inflammatoire (lipopolysaccharide) (Hämäläinen et al., 2007). Les anthocyanes sont capables d'agir sur différentes cellules impliquées dans le développement de l'athérosclérose, comme la protéine 1 chimioattractante des monocytes (MCP-1), et ont un effet protecteur contre la sécrétion de MCP-1 induite par le facteur de nécrose tumorale TNF- α dans les cellules endothéliales humaines primaires (Garcia-Alonso et al., 2009).

Chez le rat, un apport alimentaire à long terme d'anthocyanes dérivées du maïs, principalement de la cyanidine et de la pélagonidine, a rendu le myocarde moins sensible aux lésions induites par l'ischémie- reperfusion *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* par rapport aux témoins (Scarabelli et al., 2009). Wu et al. (2016); Wu et al. (2018) ont montré que l'administration des extraits d'anthocyanes à des souris en combinaison avec un régime riche en graisses, inhibaient efficacement l'augmentation du poids corporel et du tissu adipeux. Les symptômes typiques d'hyperglycémie, d'hyperinsulinémie et d'hyperleptinémie provoqués par un régime riche en graisses ne se sont pas manifestés. Les expériences suggèrent que les anthocyanes, en tant que composant alimentaire fonctionnel, peuvent aider à la prévention de l'obésité.

Les anthocyanes sont reconnus pour leur capacité à moduler les fonctions cognitives et motrices, à améliorer la mémoire et à jouer un rôle dans la prévention des baisses de la fonction neuronale liées à l'âge. Selon Dos Santos et al. (2019) l'administration d'anthocyanes retarde le déficit cognitif lié au vieillissement, par le biais de modulation des voies de signalisation liées à la neurodégénérescence. Le traitement aux anthocyanes réduit également l'expression des enzymes impliquées dans l'inflammation pulmonaire (Rossi et al., 2003). Les anthocyanes peuvent agir comme antibactériens efficaces en détruisant la paroi cellulaire de *E. coli* et *Salmonella* d'origine alimentaire ; ils contribuent également à réduire l'abondance des bactéries pathogènes qui produisent des toxines chez l'hôte, comme *Desulfovibrio sp.* et *Enterococcus*. Les anthocyanes possèdent également la capacité d'augmenter l'abondance de probiotiques tels que *Akkermansia*, *Bifidobacteria* et enfin, il semble que les anthocyanes régulent la composition des microbes intestinaux améliorant ainsi l'immunité et la santé intestinale (Ma et al., 2019)

Les anthocyanes glycosylés ont démontré de fortes activités antioxydantes dans plusieurs études. Ces composés naturels peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (EOR) et ainsi interrompre la propagation de nouvelles espèces radicalaires. Leurs doubles liaisons contribuent à l'activité de piégeage. Les cyanidines glycosides en particulier, possèdent un large spectre d'activités biologiques, notamment des effets de piégeage sur les agents cancérigènes et mutagènes activés et sur la régulation du cycle cellulaire (Mazza et Miniati, 1993 ; Hagiwara et al., 2001; Galvano et al., 2004; Lazzè et al., 2004; Serafino et al., 2004; Tsai et al., 2017) . En effet, les glycosides de cyanidine purifiés à partir d'extraits de baies possèdent des propriétés pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses humaines, y compris les cellules leucémiques (Wenzel et al., 2000; Katsuzaki et al., 2003; Lazzè et al., 2004; Li et al., 2017), ces études suggèrent que les activités antitumorales des glycosides de cyanidine pourraient être liées à leur capacité à induire l'apoptose et que ces produits pourraient également servir d'agents de traitement du cancer. Probablement, toutes ces activités sont liées aux propriétés antioxydantes des cyanidines (Kähkönen et al., 1999; Zheng et al., 2003; Galvano et al., 2004; Wang et al., 2005; Park et al., 2017). L'étude de Cyboran-Mikołajczyk et al.(2019) a prouvé qu'elles protègent efficacement les érythrocytes contre les radicaux libres dans des conditions de stress oxydatif physiologique et induit par AAPH.

La malvidine se trouve principalement en tant que pigment dans les herbes telles que la mauve (*Malva sylvestris*), selon plusieurs études, les extraits de cette plante (dont la Malvine) semblent avoir des propriétés thérapeutiques aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Marouane et al., 2011; Hussain et al., 2014; Benso et al., 2016), en effet ils agissent comme anti-diabétique (Akash et al., 2013), anti-inflammatoire (Prudente et al., 2017) , antiulcérogène (Sleiman et Daher, 2009) et anti-oxydant (Zohra et al., 2012) .

Les apports nutritionnels de référence n'existent pas actuellement pour les anthocyanes, de nos jours, il n'existe pas de dose journalière recommandée pour ces molécules bien qu'une consommation entre 250–400 mg / j, respectant la saisonnalité des sources alimentaires, a été proposée pour les flavonoïdes totaux (Peluso et Palmery, 2015). La Chine a actuellement défini un niveau spécifique proposé de 50 mg / j pour les anthocyanes (Chinese Nutrition Society, 2013).

Le Comité mixte FAO / OMS d'experts des additifs alimentaires a établi une dose journalière acceptable de 2,5 mg / kg par jour pour les anthocyanes extraites de la peau de raisin, mais pas pour les anthocyanes en général. À la suite d'une demande de la Commission européenne à l'Autorité européenne de sécurité des aliments, le groupe scientifique sur les additifs

alimentaires et les arômes a été invité à fournir un avis scientifique réévaluant la sécurité des anthocyanes. Le groupe scientifique a conclu que la base de données toxicologiques disponible était insuffisante pour établir une dose journalière numériquement acceptable pour les anthocyanes (Additives et Food, 2013).

6. Mécanisme d'Activité antioxydante des flavonoïdes :

Les capacités antioxydantes de nombreux flavonoïdes dont les anthocyanes peuvent se révéler être beaucoup plus vigoureuses que celles des vitamines C et E (Prior et Cao, 2000). Selon Procházková et al. (2011), les flavonoïdes peuvent prévenir les lésions causées par les radicaux par les mécanismes suivants :

- (1) piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (EOR),
- (2) activation des enzymes antioxydantes (Nijveldt et al., 2001),
- (3) chélation de métaux (Ferrali et al., 1997),
- (4) réduction des radicaux α -tocophéryle (Hirano et al., 2001; Heim et al., 2002),
- (5) inhibition des oxydases (Cos et al., 1998; Heim et al., 2002),
- (6) atténuation du stress oxydant causé par l'oxyde nitrique (Vanacker et al., 1995)
- (7) augmentation du taux d'acide urique (Lotito et Frei, 2006),
- (8) augmentation des propriétés antioxydantes des antioxydants de faible poids moléculaire (Yeh et al., 2005).

6.1 Piégeage direct des EOR

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres directement par don d'atomes d'hydrogène, les radicaux sont ainsi rendus inactifs selon l'équation suivante, où $R \cdot$ est un radical libre et $Fl-O \cdot$ est un radical flavonoïde phénoxy (espèces radicalaires d'oxygène monovalentes formées à partir de phénols par homolyse de la liaison O-H) (Figure 5).

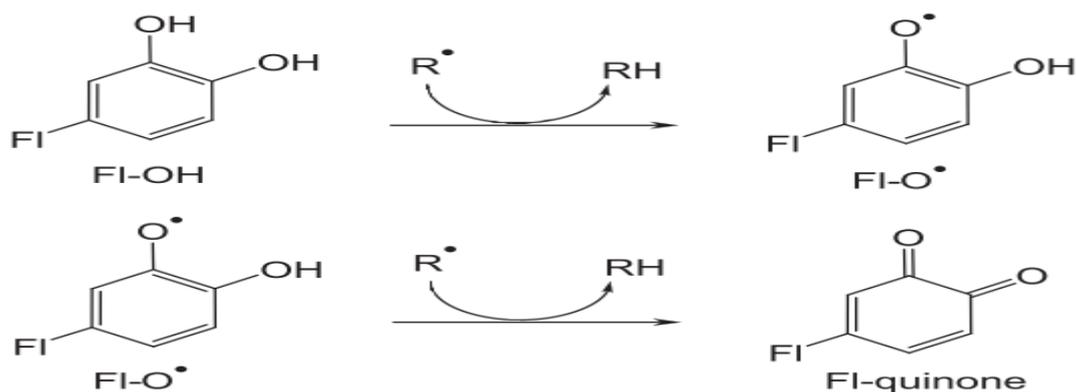


Figure 5. Piégeage des espèces réactives de l'oxygène ($R \bullet$) par un flavonoïde. Le radical libre FI-O • peut réagir avec un second radical en acquérant une structure quinone (Pietta, 2000).

6.2 Activation des enzymes antioxydantes

Un autre mécanisme possible par lequel les flavonoïdes agissent est l'interaction avec diverses enzymes antioxydantes (Nijveldt et al., 2001).

Les flavonoïdes sont capables d'induire la phase II des enzymes de détoxification (par exemple, la NAD (P) H-quinone oxydoréductase, la glutathion S-transférase et l'UDP-glucuronosyl transférase), qui sont les principales enzymes de défense contre les toxiques électrophiles et le stress oxydant (Nerland, 2007).

6.3 Activité de chélation des métaux

Les flavonoïdes sont connus pour chélater le fer et le cuivre, éliminant ainsi un facteur de développement de radicaux (Ferrali et al., 1997). Pietta. (2000) a proposé que parmi les sites de liaison des métaux dans la molécule de flavonoïdes, le fragment catéchol du cycle B ; la fraction catéchol du cycle B s'est révélée être importante pour la formation de chélate de Cu^{2+} et étant ainsi le site contributif majeur de la chélation des métaux (Brown et al., 1998).

6.4 réductions des radicaux α -tocophéryle

L' α -tocophérol représente un antioxydant majeur dans les membranes cellulaires et dans les lipoprotéines humaines de faible densité (LDL) ; Hirano et al. (2001), ont suggéré que les flavonoïdes pouvaient agir en tant que donneurs d'hydrogène au radical α -tocophéryle, qui est un prooxydant potentiel. De plus, par interaction avec le radical α -tocophéryle, ils retardent l'oxydation des LDL.

6.5 Capacité d'inhiber les oxydases

Les flavonoïdes inhibent les enzymes responsables de la formation du superoxyde ($O_2 \bullet^-$), comme la xanthine oxydase (Hanasaki et al., 1994) et les protéines kinase C (Ursini et al., 1994).

Il a également été démontré que les flavonoïdes inhibent la cyclooxygénase, lipoxygénase, succinoxydase microsomale et NADH oxydase (Korkina et Afanas' Ev, 1996; Brown et al., 1998).

La NADPH oxydase est un système associé à la membrane qui catalyse la production d' $O_2 \bullet^-$ dans les neutrophiles activés. Son mécanisme d'activation comprend l'interaction d'un agoniste avec un récepteur spécifique de la membrane des neutrophiles, l'activation de la phospholipase C et la formation ultérieure de seconds messagers activant la protéine kinase C. Cette enzyme phosphoryle la sous-unité p47phox de la NADPH oxydase, un composant clé de cette enzyme, et provoque ainsi l'activation de flambée respiratoire (augmentation de la consommation d'oxygène moléculaire par les neutrophiles suite à l'activation de la NADPH oxydase membranaire durant la phagocytose des microbes) (Umeki, 1994; Ago et al., 2003). Il a été suggéré que l'inhibition de la protéine kinase C est un mécanisme d'inhibition de la NADPH oxydase par certains flavonoïdes (Ursini et al., 1994).

6.6 Atténuer le stress oxydant causé par l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important dans le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins (Huk et al., 1998), mais ses concentrations élevées peuvent entraîner des dommages oxydatifs. Le NO est produit par l'oxydation de la L-arginine catalysée par NO synthases (NOS). La toxicité de l'oxyde nitrique est principalement médiée par le peroxyde nitrique, qui se forme lors de la réaction de NO avec $O_2 \bullet^-$ (Rubbo et al., 1994).

Les flavonoïdes exercent une activité inhibitrice de la production de NO dans plusieurs lignées cellulaires et cultures (macrophages péritonéaux de souris, cellules RAW 264.7 et J774.2) activées par des lipopolysaccharides. Cet effet est probablement provoqué par un effet inhibiteur des flavonoïdes sur l'expression de la NOS inducible, mais pas par l'inhibition de son activité (Kim et al., 1999 ; Olszanecki et al., 2002; Matsuda et al., 2003).

La manière dont les flavonoïdes inhibent l'induction de la production de NOS et de NO n'est pas encore clairement comprise, mais plusieurs explications sont avancées. La première possibilité peut être dérivée de la propriété antioxydante des flavonoïdes, grâce à laquelle ces

composés capturent les EOR. La deuxième possibilité est que les flavonoïdes puissent agir en tant qu'inhibiteurs de la molécule de signalisation des lipopolysaccharides (Kim et al., 2005).

6.7 Augmentation des niveaux d'acide urique

Lotito et Frei (2006), supposent que la forte augmentation de la capacité antioxydante plasmatique totale observée après la consommation d'aliments riches en flavonoïdes n'est pas causée par les flavonoïdes eux-mêmes, mais est probablement la conséquence de l'augmentation des taux d'acide urique, qui contribue de manière importante à la capacité totale d'antioxydant plasmatique. Cao et al. (1998) ont noté une augmentation significative de l'urate plasmatique ou sérique après la consommation de certains aliments contenant des flavonoïdes. Ainsi, plusieurs études indiquent que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes peut augmenter l'urate plasmatique, bien que le mécanisme sous-jacent reste encore flou. Par ailleurs, étant donné que le taux élevé d'urate peut constituer un facteur de risque pour certaines maladies, le prétendu « bénéfique antioxydant » pourrait ne pas correspondre à ce qu'il semble (Halliwell, 2007) .

6.8 Modification des propriétés pro-oxydantes d'antioxydants de faible poids moléculaire

Plusieurs auteurs ont décrit l'activité pro-oxydante de la β -carotène dans certaines conditions (par exemple, l'irradiation par les UVA) et ont suggéré que sa combinaison avec un antioxydant peut avoir un effet préventif (Obermüller-Jevic et al., 1999; Offord et al., 2002). Yeh et al.(2005), ont étudié l'interaction de la β -carotène en association avec quelques flavonoïdes sur des lésions de l'ADN induites par les UVA dans des cellules C3H10T1/2 et des fibroblastes d'embryon de souris. Lorsque chaque flavonoïde était associé à la β -carotène lors de la pré incubation, les dommages causés à l'ADN cellulaire induit par les UVA étaient significativement supprimés (Procházková et al., 2011).

7. Globule rouge et β thalassémie

Les globules rouges (GR) sont l'une des cibles des espèces réactives de l'oxygène (EOR) générées par un environnement de stress oxydant en raison de la présence de grandes quantités d'acides gras hautement polyinsaturés dans leurs membranes, de leur riche apport en oxygène et de leur taux élevé d'hémoglobine (Hb) qui sont des catalyseurs puissants du stress oxydant (Sadrzadeh et al., 1984; Clemens et al., 1987; Çimen, 2008; Pandey et Rizvi, 2011; Melo et al., 2019). Les troubles héréditaires de la production d'Hb sont les troubles monogéniques les plus courants chez l'homme. Celles affectant les gènes de la β globine (HBB) adultes, telles que la β -thalassémie, sont les plus pertinentes sur le plan clinique (Weatherall et al., 2010). Malgré

que la lésion primaire se localise au niveau du gène de la β -globine au cours de la β -thalassémie, le stress oxydant joue un rôle majeur dans sa physiopathologie (Pavlova et al., 2007; Fibach et Rachmilewitz, 2008).

7.1 Hémoglobine

L'hémoglobine est un tétramère composé de 4 chaînes appelées globines : 2 chaînes α (141AA) 2 chaînes β (146 AA) et d'un groupement prosthétique, l'hème, composé de protoporphyrine IX et d'un atome de Fe (Figure 6) .

Les gènes de l'Hb sont situés sur les chromosomes 16 (α) et 11 (β)(Crossley et Orkin, 1993).

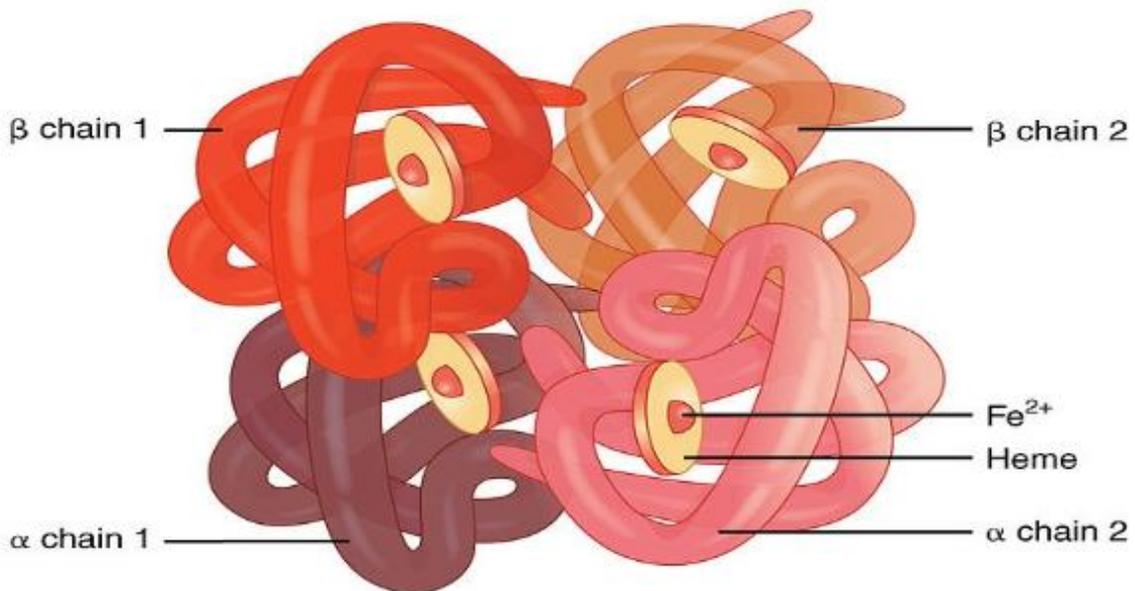


Figure 6. Structure de l'hémoglobine d'après (Marengo-Rowe, 2006)

7.2 β -thalassémies

Les β -thalassémies sont des troubles génétiques de la synthèse de l'hémoglobine caractérisées par une synthèse déficiente (β^+) ou absente (β^0) de la sous-unité β -globine de la molécule d'hémoglobine (Weatherall et Clegg, 2001) . La grande majorité des personnes atteintes de thalassémie héritent de leur trouble en tant que récessif. Les individus hétérozygotes ont une légère anémie et une microcytose et sont classés comme présentant un trait de thalassémie mineure, et les individus homozygotes ont une anémie sévère à divers degrés et se caractérisent par une β -thalassémie homozygote ou une thalassémie majeure ou intermédiaire (Thein, 1999 ; Nienhuis et Nathan, 2012). Le degré de réduction de la chaîne de la globine est déterminé par la nature de la mutation du gène de la bêta globine située sur le chromosome 11 (Galanello et Origa, 2010).

7.3 La Bêta-thalassémie majeure

La présentation clinique de la thalassémie majeure survient entre 6 et 24 mois. Les nourrissons affectés ne parviennent pas à se développer et deviennent progressivement pâles. Des problèmes d'alimentation, diarrhée, de fièvre récurrents et hypertrophie de l'abdomen causée par l'hypertrophie de la rate et du foie peuvent se produire.

Si un programme de transfusion régulier qui maintient une concentration d'Hb minimale de 9,5 à 10,5 g / dL est initié, la croissance et le développement ont tendance à être normaux jusqu'à 10 à 12 ans (Whipple et Bradford, 1936; Cao et Galanello, 2010). Cependant les patients transfusés peuvent développer des complications liées à la surcharge en fer qui induit un retard de croissance ainsi que des complications ultérieures : une atteinte du cœur (myocardiopathie ou rarement des arythmies), du foie (fibrose et cirrhose) et des glandes endocrines (diabète sucré, hypogonadisme et insuffisance des parathyroïdes, de la thyroïde, de l'hypophyse, et plus rarement des surrénales) (Borgna et Galanello, 2004; Galanello et Origa, 2010).

7.4 Physiopathologie

Les caractéristiques de la thalassémie - avec ou sans traitement - sont le déséquilibre de la chaîne d' α -globine ou de β -globine conduisant à une érythropoïèse inefficace, un ensemble de mécanismes physiopathologiques ultérieurs et un profil de multimorbidité (Tanno et al., 2007 ; Ndiaye et al., 2015) (Figure 7).

Un défaut total ou partiel de la synthèse des chaînes β se traduit par un déséquilibre entre les chaînes α et non α (ratio α /non α supérieur à 1) est induit par l'anomalie génétique.

Les chaînes alpha libres en excès forment des tétramères α_4 instables et moins solubles, ces derniers s'oxydent et précipitent dans le cytoplasme sous forme d'inclusions (Fessas et al., 1966) appelées hémichromes, toxiques pour les membranes cellulaires et nucléaires,

l'accumulation de tétramères instables de la chaîne d' α -globine dans les cellules érythroïdes entraîne la mort prématurée des cellules à l'intérieur (érythropoïèse inefficace) et à l'extérieur (hémolyse périphérique) de la moelle osseuse, facilitée par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Rivella, 2012). La manifestation immédiate est une anémie hémolytique chronique pouvant entraîner des complications aiguës telles que la cholélithiase et des effets néfastes à court et à long terme sur la croissance, la fonction des organes et la fonction vasculaire (Taher et al., 2015).

La prolifération accrue de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse conduit à une expansion médullaire et à des déformations osseuses ultérieures et à une faible masse osseuse (Rivella, 2012).

Des sites hémopoïétiques compensatoires situés à l'extérieur de la moelle osseuse sont également activés, principalement dans la rate (splénomégalie) et le foie (hépatomégalie), mais peuvent également être activé dans tous les tissus du corps présentant un potentiel hémopoïétique, conduisant à la formation de pseudotumeurs extra médullaires dans des zones anatomiques à haut risque telles que le canal rachidien (Haidar et al., 2010).

Outre les anomalies des plaquettes et du système de coagulation, une hypercoagulabilité et des manifestations vasculaires associées sont couramment observées chez les patients thalassémiques, en particulier chez les patients splénectomisés (Cappellini et al., 2012).

Enfin, l'érythropoïèse inefficace entraîne une absorption accrue du fer et une surcharge en fer induite par l'hépcidine (Taher et al., 2018) (hormone hépatique qui régule en permanence la concentration et la biodisponibilité plasmatiques du fer) (Loréal et al., 2008)

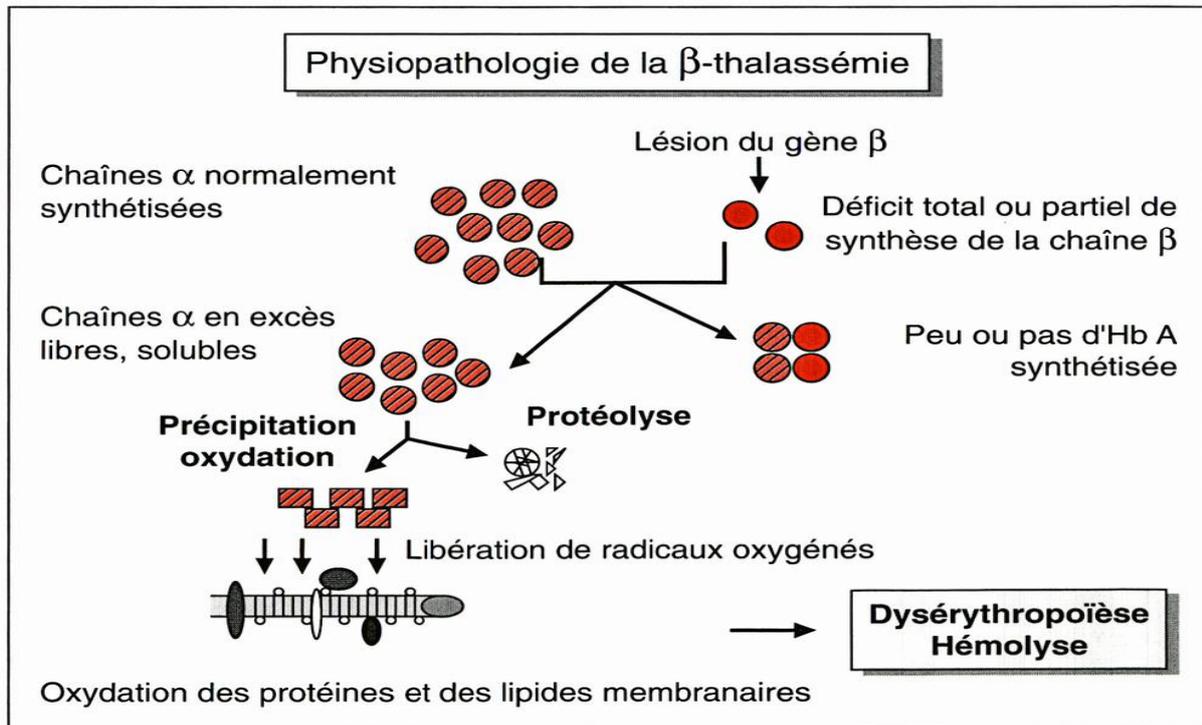


Figure 7. Physiopathologie des patients atteints de syndrome de thalassémie (Leroy-Viard et al., 1992).

8. Thalassémie et stress oxydant

Bien que le stress oxydant ne soit pas l'étiologie primaire de la thalassémie, il joue un rôle majeur dans sa physiopathologie. Le statut oxydatif des cellules est régulé par l'équilibre entre les oxydants, tels que les espèces réactives de l'oxygène (EOR), principalement produites comme sous-produits de la respiration cellulaire, et les anti-oxydants, tels que le glutathion réduit. Une balance oxydant/anti-oxydant équilibrée est une condition sine qua non pour maintenir une physiologie normale. Les EOR servent de régulateurs dans de nombreux processus, y compris la prolifération et la différenciation des précurseurs érythroïdes. Lorsque cet équilibre est défaillant, comme dans de nombreux processus pathologiques, il en résulte un stress oxydant. Les EOR en excès se lient aux composants cellulaires tels que l'ADN, les protéines et les lipides membranaires, entraînant une cytotoxicité (Fibach et Rachmilewitz, 2008).

Dans la β -thalassémie, le stress oxydant est principalement la conséquence du défaut de la production de la chaîne de la β -globine entraînant un excès d' α -globines. Les α -globines libres forment des agrégats instables qui peuvent s'auto-oxyder, se dénaturer et précipiter sous forme d'hémichromes au sein des cellules. Il en résulte une forte production des EOR, de l'hème libre et une surcharge en fer (Figure 8)(Voskou et al., 2015). Le fer libre génère des EOR à travers la réaction de Fenton (Sadzadeh et al., 1984; Kohgo et al., 2008). En fait, une production accrue des EOR se produit dans les GR isolés de patients thalassémiques (Amer et al., 2003; Leecharoenkiat et al., 2011). Les EOR peuvent oxyder les lipides, les acides nucléiques, les protéines cellulaires et altérer l'activité des facteurs de transcription, des canaux membranaires et des voies de signalisation (Arlet et al., 2014; Phull et al., 2018). De plus, le fer libre initie des réactions d'oxydo-réduction induisant une oxydation de l'hémoglobine libre et une déstabilisation de la membrane (De Franceschi et al., 2013). En conséquence, des dommages oxydants importants sur les globules rouges peuvent favoriser leur mort prématurée par hémolyse, contribuant ainsi à l'Érythropoïèse inefficace.

Le stress oxydant peut entraîner de graves altérations de la stabilité membranaire, de l'hydratation cellulaire et des protéines du cytosquelette (Arlet et al., 2014). Les hémichromes liés à la membrane cytoplasmique des progéniteurs érythroïdes interviennent dans la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la bande 3 (une protéine de transport transmembranaire anionique) (Mannu et al., 1995). Il en résulte une réorientation des domaines intramembranaire et extracellulaire, une agrégation de la bande 3 et une perturbation de la

liaison de l'ankyrine (Ferru et al., 2011). Les nouveaux agrégats de la bande 3 agissent en tant qu'antigène et se lient avec une grande affinité aux anticorps anti-bande 3 d'IgG et aux fragments du complément des macrophages (Cappellini et al., 1999; Pantaleo et al., 2008). De plus, la perturbation de la fonction de la bande -3 entraîne une diminution de la concentration de NADPH, un agent anti-oxydant et exacerbe le stress oxydant (Voskou et al., 2015) . L'oxydation de la protéine 4.1, membre du cytosquelette des érythrocytes, est une autre voie importante, la protéine 4.1 défectueuse réduit sa capacité de liaison avec la spectrine, ainsi que des interactions inefficaces entre la spectrine et l'actine, il en résulte un GR instable et fragile (Shinar et al., 1989; Advani et al., 1992; Ribeil et al., 2013) .

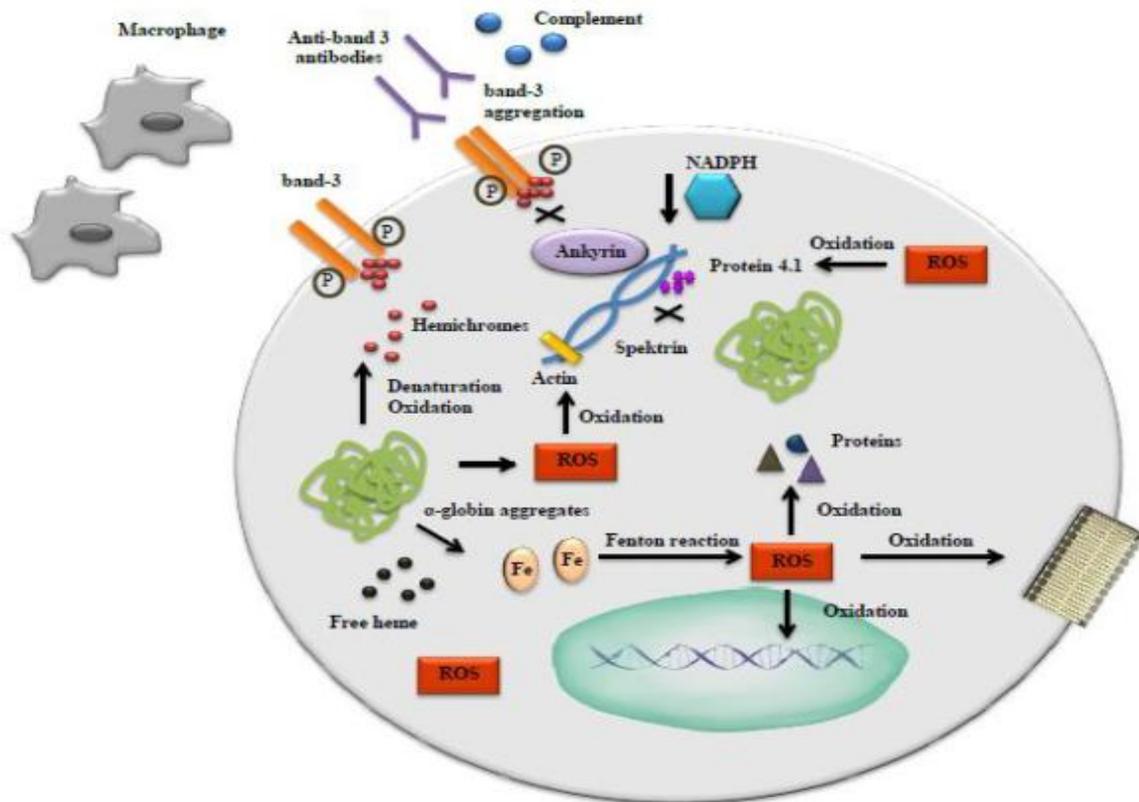


Figure 8. Stress oxydant dans la β -thalassémie (Oikonomidou et Rivella, 2017)

Les α -globines libres forment des agrégats qui se dénaturent et s'auto-oxydent sous forme d'hémichromes. En conséquence, des EOR, de l'hème libre et du fer sont produits. Les EOR sont également produits par la réaction de Fenton à partir de fer libre. Les EOR oxydent les lipides, les acides nucléiques et les protéines cellulaires.

Les hémichromes induisent la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la bande 3, ce qui entraîne l'agrégation de la bande 3 et la perturbation de la liaison de l'ankyrine. L'anticorps anti-bande 3, avec complément, reconnaissent les clusters de la bande 3 / hémichrome et interviennent dans la phagocytose des érythrocytes par les macrophages. La perturbation de la bande 3 entraîne une diminution de la concentration de NADPH, induisant en outre un stress oxydant. Les EOR induisent une oxydation de la protéine 4.1, de la spektrine et de l'actine, conduisant à des GR instables et fragiles.

9. Culture *in vitro*, Lymphocytes, et anthocyanes

Les tests *in vitro* sont des outils performants pour réaliser des criblages d'activité et d'influence de substances environnementales capables de perturber les fonctions de l'organisme.

En effet les systèmes de culture cellulaire peuvent fournir une mine d'informations sur les effets biologiques des composés phytochimiques issus des légumes et des fruits et sur les mécanismes par lesquels les régimes riches en légumes et en fruits peuvent réduire le risque de maladies chroniques (Bub et al., 2003).

Il est bien établi que le système immunitaire est particulièrement sensible au stress oxydant et qu'une réponse immunitaire efficace repose principalement sur la communication de cellule à cellule. De plus, l'activation et la prolifération des lymphocytes sont étroitement liées au statut redox intracellulaire de la cellule (Santangelo, 2003; Kabe et al., 2005; Kesarwani et al., 2013; Meraou et al., 2016; Bouamama et al., 2017; Meraou, 2017).

Les lymphocytes et particulièrement ceux de la lignée T sont des leucocytes qui ont un rôle central dans le système immunitaire, notamment la réponse immunitaire de type cellulaire. Les EOR ont des effets sur la fonction et la prolifération des lymphocytes T. De faibles concentrations de EOR dans les cellules T sont une condition préalable à la survie cellulaire, mais leur accumulation accrue peut conduire à l'apoptose / nécrose (Gajski et al., 2016). Les états d'oxydoréduction des lymphocytes T sont également régulés par plusieurs vitamines et composés alimentaires. Les changements dans la régulation redox des lymphocytes T peuvent affecter la pathogenèse de beaucoup de maladies humaines. De nombreuses stratégies pour contrôler le stress oxydatif ont été utilisées pour diverses maladies, notamment l'utilisation d'antioxydants provenant de produits alimentaires et l'ingénierie pharmacologique (Kesarwani et al., 2013) .

Les flavonoïdes dérivés des aliments modulent une variété de processus inflammatoires et de fonctions immunitaires (Eun-Sun et al., 2008; Ginwala et al., 2016; Martínez et al., 2019).

Plusieurs études ont montré les effets immunomodulateurs des anthocyanes chez l'homme et les rongeurs (Wang et al., 2000; Sterling, 2001; Lazze et al., 2003; Hou et al., 2005; Amini, 2017; Farzaei et al., 2018; Papakotsi, 2018), indiquant le potentiel des anthocyanes dans la promotion des progrès dans le domaine de l'immunothérapie.

Matériel et méthodes

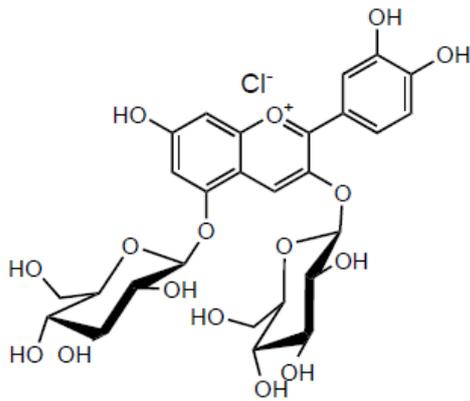
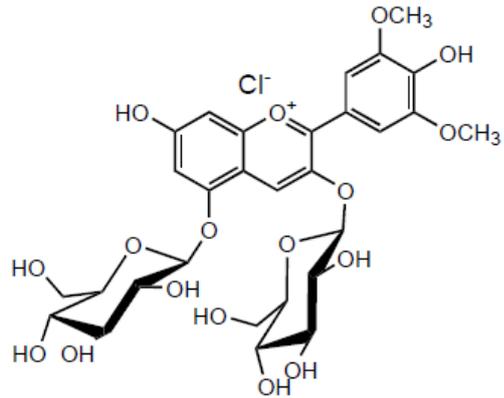
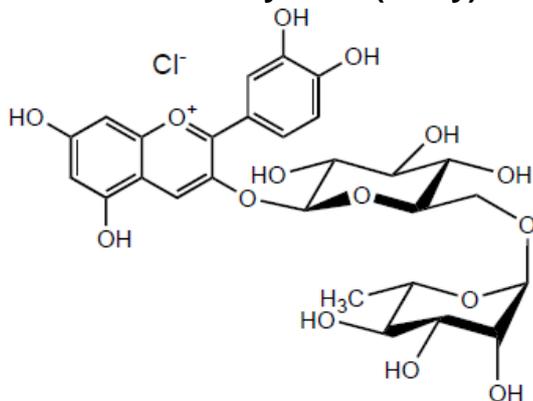
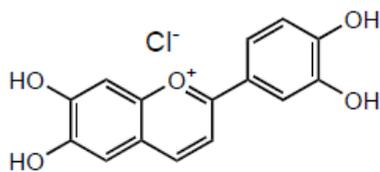
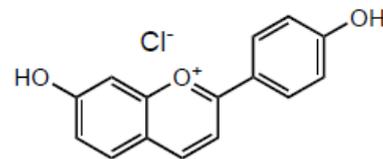
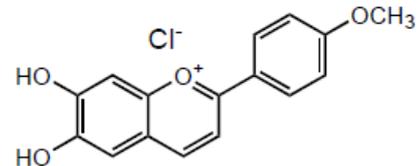
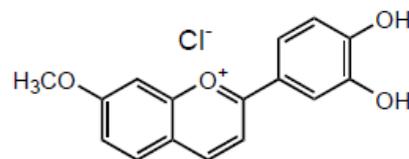
Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé au sein du laboratoire PPABIONUT physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition, université de Tlemcen.

Pour notre étude, nous avons choisi de tester 7 anthocyanes (3 anthocyanes naturelles et 4 anthocyanes de synthèse) (Figure 9) qui nous ont été fournis par le laboratoire de chimie bioorganique et médicinale de l'université de Strasbourg.

Les anthocyanes naturelles : Le chlorure de cyanine, le chlorure de kéraucyanine et le chlorure de malvine proviennent d'EXTRASYNTHÈSE.

Les autres anthocyanes sont issues de synthèse chimique, à titre d'exemple, le chlorure de 3',4'-dihydroxy-7-méthoxy-flavylium a été synthétisé selon une procédure rapportée (Elhabiri *et al.*, 1997). Le chlorure de 6,7,3',4'-tétrahydroxy-flavylium a été obtenu par condensation dans des conditions acides de 3,4-dihydroxyacétophénone et de 2,4,5-trihydroxybenzaldéhyde 224 mg de 3,4-dihydroxyacétophénone et 219 mg de 2,4,5-trihydroxybenzaldéhyde ont été solubilisés dans 20 ml d'acide formique contenant 10% d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures puis évaporé à sec sous vide. Le résidu a été lavé plusieurs fois à l'éther puis solubilisé dans 2 mL de méthanol acidifié avec 5% d'acide chlorhydrique concentré. Le chlorure de 6,7,3',4'-tétrahydroxy-flavylium a été obtenu sous forme de cristaux rouges par diffusion lente d'éther (rendement 35%).

$^1\text{H NMR } \delta\text{H}$ [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}-\text{CF}_3$ in D]: 8.98 (d, J 8.8, H-4), 8.28 (d, J 8.8, H-5'), 7.89 (dd, J 8.6 and J 2.2, H-6'), 7.78 (d, J 2.2, H-8), 7.46 (d, J 10.3, H-5 and H-2'), 7.03 (d, J 8.6, H-3). $^{13}\text{C NMR } \delta\text{H}$ [100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}-\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$]: 168.25, 161.12, 154.31, 154.20, 150.00, 149.67, 147.14, 123.58, 120.89, 120.11, 117.23, 115.23, 112.42, 110.59, 103.02 (Charif *et al.*, 2020).

**Chlorure de cyanine (Cl-Cy)****Chlorure de malvine (Cl-Mlv)****Chlorure de kéracyanine (Cl-Kcy)****chlorure de 6,7,3',4'-
tétrahydroxy-flavylium
(Syn16)(molécule de
synthèse)****chlorure de 4',7-dihydroxy-
flavylium (Syn13)
(molécule de synthèse)****chlorure de 6,7-dihydroxy-4'-méthoxy-
flavylium (Syn 15)
(molécule de synthèse)****chlorure de 3',4'-dihydroxy-7-méthoxy-
flavylium (Syn17) (molécule de
synthèse)****Figure 9. Structures chimiques des différentes anthocyanes étudiées dans ce travail**

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

Les propriétés antioxydantes/antiradicalaires des anthocyanes testés sont évaluées par la méthode de piégeage du radical DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon la méthode (Brand-Williams et al., 1995). Le radical DPPH, en solution alcoolique, présente une intense coloration violette qui disparaît en présence de composés donneurs de H• (Figure 10).

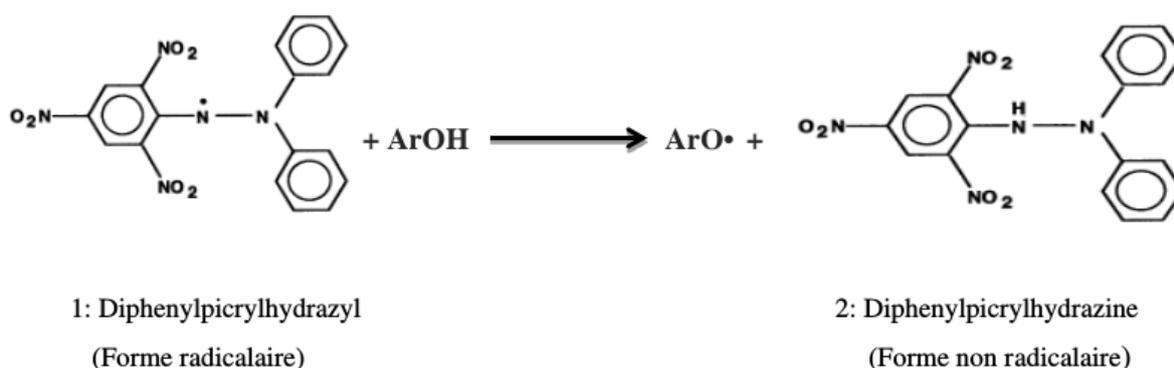


Figure 10. Mécanisme de réduction du radical DPPH• (Molyneux, 2004)

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 comparées à celle d'un standard classique : l'acide ascorbique.

Des micro-volumes de solutions méthanoliques d'anthocyanes ou d'acide ascorbique sont ajoutés à 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH• à 150 µM. La réaction est suivie pendant 30 mn et les absorbances mesurées à 515 nm toutes les 30 secondes par spectrophotométrie. La solution méthanolique des échantillons a servi de blanc.

Le pourcentage de DPPH• restant en fonction de la concentration d'anthocyane 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 antioxydantes du composé considéré sont élevées.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule :

$$CE50 = [(ADPPH - A \text{ échantillon}) / ADPPH] \times 100$$

ADPPH : est la valeur d'absorbance du DPPH.

A échantillon : est la valeur d'absorbance de la solution à examiner qui représente la différence entre la valeur d'absorbance de la solution à tester et la valeur d'absorbance du blanc.

2. Etudes *in vitro* sur les globules rouges

Les anthocyanes sont préparés dans du DMSO, à une concentration de 20 mM puis dilués aux concentrations de 50, 100 et 200 μ M dans le milieu réactionnel pour les globules rouges normaux et 100 μ M pour les globules rouges thalassémiques.

Le TBHP est d'abord préparé en solution aqueuse, puis ajusté à une concentration finale de 200 μ M dans le milieu réactionnel. (Au préalable, les cellules ont été incubées avec le TBHP à des concentrations allant de 50 à 1000 μ M, afin de déterminer la condition la mieux adaptée, la concentration de 200 μ M a été choisie comme étant celle donnant une hémolyse bien détectable et une altération de l'état rédox dans nos conditions expérimentales).

2.1. Isolement des érythrocytes :

Les érythrocytes sont isolés par centrifugation à 2000 tr/min pendant 10 min à partir de sang humain d'un donneur unique non-fumeur et ne présentant aucune maladie apparente, et d'un donneur atteint d'une β thalassémie majeure, récolté dans des tubes héparinés.

Après élimination du plasma les érythrocytes sont lavés 3 fois avec un tampon phosphate (PBS) pH 7,4, puis suspendus dans ce même tampon à une concentration de 2% (v/v) (Deng *et al.*, 2006).

2.2. Pré-incubation :

Subséquentement, la suspension des érythrocytes à 2% est aliquotée dans des tubes secs à un volume de 1ml auquel des micro-volumes d'anthocyane sont ajoutés, de manière à obtenir une concentration finale de 50, 100 et 200 μ M puis incubés à 37°C pendant 30min sous agitation, deux tubes sont prévus pour chaque concentration l'un pour tester l'effet antioxydant propre de l'anthocyane (effet direct), l'autre pour tester son effet protecteur contre le TBHP. Les essais sont réalisés en triples.

2.3 Incubation

Après 30min de pré-incubation, l'effet protecteur des anthocyanes est vérifié suite à une exposition des globules rouges à un générateur de radicaux libres le TBHP par une incubation de 90 min avec ce dernier à une concentration finale de 200 μ M.

2.4 Test de viabilité cellulaire à la Calcéine-AM

L'évaluation des taux de viabilité cellulaire est effectuée selon la méthode décrite par (Bratosin *et al.*, 2005).

Ce test est fondé sur l'utilisation de la Calcéine-AM, un ester acétique non-fluorescent de la fluorescéine (Figure11), qui traverse passivement les membranes des cellules viables et y est transformé par les estérases cytosoliques en Calcéine fluorescente qui donne un signal vert intense à 530 nm. Celle-ci n'est retenue que par les cellules possédant une membrane intacte. La disparition de la Calcéine signifie donc, à la fois, la diminution de l'activité estérasique caractéristique des cellules en apoptose, et la fuite de ce composé hors des cellules en apoptose en raison de la perméabilisation de leur membrane. Ces deux mécanismes complémentaires font de la Calcéine-AM un excellent test de viabilité érythrocytaire.

Après incubation les érythrocytes sont centrifugés, lavés deux fois avec du PBS puis remis en suspension à une concentration de 0.1% à laquelle est ajoutée de la Calcéine-AM à une concentration finale de 2 μ M. La fluorescence est lue à des longueurs d'onde d'excitation / émission de 485 nm / 528 nm après une incubation de 45min à 37° à l'obscurité. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs de contrôle (globules rouges non traités aux anthocyanes ni au TBHP).



Figure11. Formule chimique de l'acétoxyméthyl ester de la fluorescéine (Calcéine-AM).

3. Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes repose sur la séparation des cellules sanguines en fonction d'un gradient de densité utilisant l'Histopaque (densité égale à 1077) (SIGMA). Le sang prélevé recueilli dans des tubes héparinés, est versé doucement dans un tube conique contenant de l'Histopaque. Une centrifugation à 2000 tr/min pendant 30 min permet de récupérer les lymphocytes à partir de l'interface qui se trouve entre le plasma et l'Histopaque, les lymphocytes sont ensuite lavés avec une solution saline équilibrée puis suspendu dans de l'RPMI 1640 (riche en glucose et en acides aminés) (Figure 12).

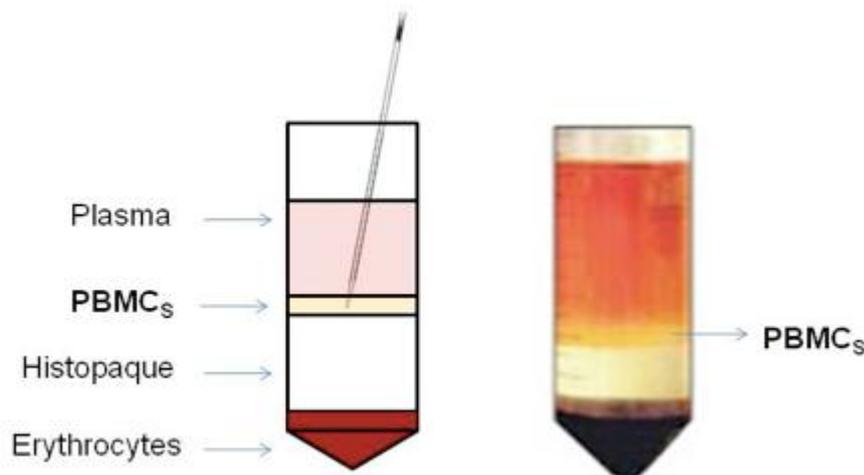


Figure 12. Représentation schématique du résultat de la stratification selon gradient de densité

3.1 Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Après coloration au bleu de trypan (0,4%) un comptage de cellules est réalisé sur la cellule de Malassez.

Le TTL permet d'étudier la prolifération *in vitro* des lymphocytes T stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavaline A (Con A, Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/ml. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits.

Les lymphocytes sont mis en culture (4×10^5 cellules/puit) dans le milieu RPMI 1640 auquel sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10% sérum du veau foetal, L - Glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol (5×10^{-5} M), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 µg/ml) en présence ou en absence de la Con A (5 µg/ml).

Afin de déterminer les effets des anthocyanes sur la prolifération *in vitro* des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence des différents anthocyanes à une concentration finale de 25 et 50µM, puis celles-ci sont incubées 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂. Une fois

l'incubation achevée, une solution aqueuse de TBHP est disposée dans la plaque (seulement dans les puits servant à la vérification de l'effet protecteur, des contrôles parallèles ont été réalisés sans TBHP pour tous les puits) à une concentration finale de 100µM et l'incubation est poursuivie 48 heures à 37 °C, et 5% de CO₂. Les essais sont réalisés en triples.

À la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans une nouvelle plaque Elisa 96 puits.

Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules.

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 et le contenu intracellulaire sert aux dosages des marqueurs du stress oxydant intracellulaire.

3.2 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 bleu violacé (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'addition du HCL 0,04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan.

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 :

$IP = (\text{densité optique des cellules stimulées} / \text{densité optique des cellules non stimulées}) \times 100$

Cellules stimulées : cellules prélevées des puits après les incubations en présence de l'agent mitogène.

Cellules non stimulées : cellules incubées sans l'agent mitogène

4 Détermination des marqueurs du stress oxydant

4.1 Dosage du glutathion réduit

Les taux de glutathion réduit (GSH) sont déterminés par la méthode d'Ellman (Ellman, 1959). Le réactif d'Ellman, l'acide 5,5'-dithiobis -2-nitrobenzoïque (DTNB), est réduit par les groupements thiols du GSH pour être transformé en acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) de couleur jaune (Figure 13).

L'acide thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm avec un coefficient d'extinction égal à $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

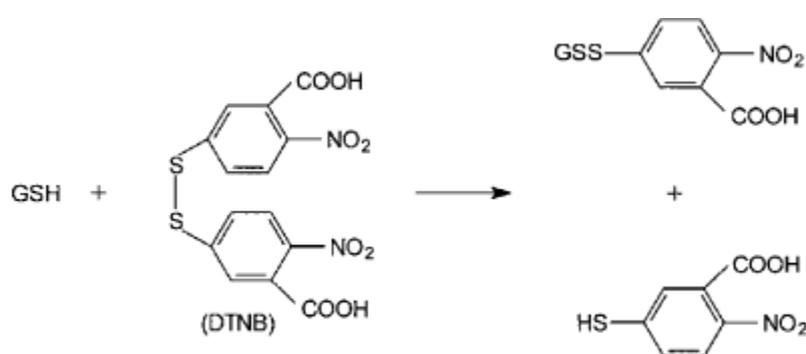


Figure 13. Réaction du réactif d'Ellman avec le glutathion.

4.2 Dosage du malondialdéhyde (MDA) (Draper et Hadley, 1990)

Le marqueur d'oxydation lipidique le plus utilisé est le malondialdéhyde, notamment pour la sensibilité de la méthode de dosage. La technique utilise un traitement acide à chaud, à l'acide thiobarbiturique (TBA). 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 = $(1,56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$.

5. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel SPSS (version 20). La comparaison entre deux groupes (incubés avec et sans TBHP) est réalisée par le test « t » de Student. Les multiples comparaisons entre les différentes incubations du même groupe sont réalisées par le test ANOVA. Lorsque des changements significatifs sont observés dans les tests ANOVA, cette analyse est complétée par le test TUKEY afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, ...) sont significativement différentes.

Résultats et interprétations

1. Propriétés antiradicalaires (DPPH)

Les résultats obtenus lors de l'étude des activités antiradicalaires avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) sont représentés en Tableau 2. Les valeurs de CE50 (concentration efficace de l'anti-oxydant permettant de diminuer la concentration initiale de DPPH• de 50%) sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante (plus le CE50 est faible plus le pouvoir antioxydant est fort). L'acide ascorbique a été utilisé comme standard à des fins comparatives. Parmi les molécules testées, le Cl-Cy a montré l'activité antiradicalaire la plus élevée (deux fois plus puissants que l'acide ascorbique) suivi de la Syn 16 et le Cl-Kcy.

Tableau2 : Activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH• des anthocyanes étudiées et du standard acide ascorbique.

MOLECULES	CE50±ET
Cl-Cy	2.10±0,11
Cl-Kcy	2.71±0.01
Cl-Mlv	8.9±0.02
Syn13	N.D
Syn15	4.75±0.01
Syn16	2.34±0,15
Syn17	3.07±0,14
Vit C	4.51±0,27

2. Effet *in vitro* des anthocyanes sur les érythrocytes normaux

Les érythrocytes sont mis en incubation en présence des différentes anthocyanes pendant 90min, par la suite différents marqueurs sont analysés afin de déterminer les effets de ces anthocyanes sur le taux de viabilité érythrocytaire et le statut oxydant/anti-oxydant.

Deux protocoles sont utilisés afin de visualiser l'effet direct ou l'effet protecteur de ces anthocyanes.

Pour l'effet direct, les érythrocytes sont mis en incubation avec les anthocyanes seulement, trois concentrations sont testées (200,100, et 50 μ M).

Pour l'effet protecteur, les érythrocytes sont d'abord incubés avec les anthocyanes pendant 30min avant l'ajout d'un générateur de radicaux libres (TBHP), les trois concentrations d'anthocyanes sont également testées.

2.1. Test de viabilité érythrocytaire à la Calcéine

Le test de viabilité érythrocytaire à la Calcéine est un test de choix en raison, de sa sensibilité, de sa fiabilité et sa reproductibilité.

La Calcéine est un ester acétique non-fluorescent de la fluorescéine, qui traverse passivement les membranes des cellules viables et y est transformé par les estérases cytosoliques en calcéine fluorescente qui donne un signal vert intense à 530 nm. Celle-ci n'est retenue que par les cellules possédant une membrane intacte.

Nos résultats montrent que le traitement au TBHP induit une hémolyse importante de 33.78% (Figure 14).

Par ailleurs, une supplémentation en chlorure de cyanine (Cl-Cy) n'affecte pas les taux de viabilité cellulaire des globules rouges quelque soit sa concentration (200,100 ou 50 μ M) , tandis qu'il exerce un effet anti-hémolytique important en réduisant le taux d'hémolyse (induit par l'addition du TBHP) quelque soit sa concentration.

Le Chlorure de kéracyanine (Cl-Kcy) à 100 et 50 μ M garde les taux de viabilité similaires à ceux du contrôle et exerce une activité hémolytique (24%) à 200 μ M, par ailleurs il exerce une activité anti hémolytique significative contre le TBHP à 50 μ M mais n'assure aucune protection contre les effets du TBHP à 200 μ M.

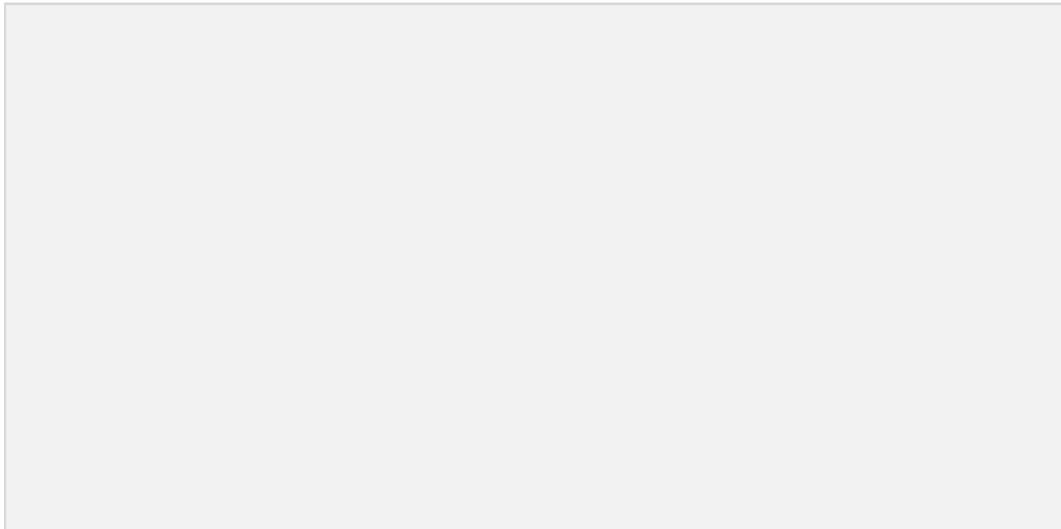
Le chlorure de malvine (Cl-Mlv) n'entraîne aucune modification des taux de viabilité érythrocytaire quelque soit sa concentration et assure une protection totale contre l'hémolyse

induite par le TBHP à une concentration de 200 μ M et partielle à 50 μ M mais n'apporte aucune protection à 100 μ M.

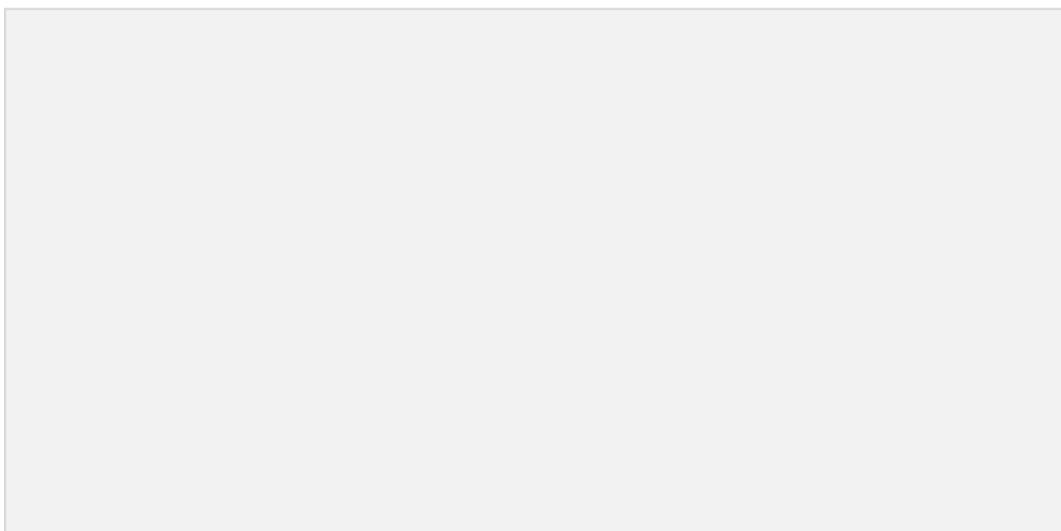
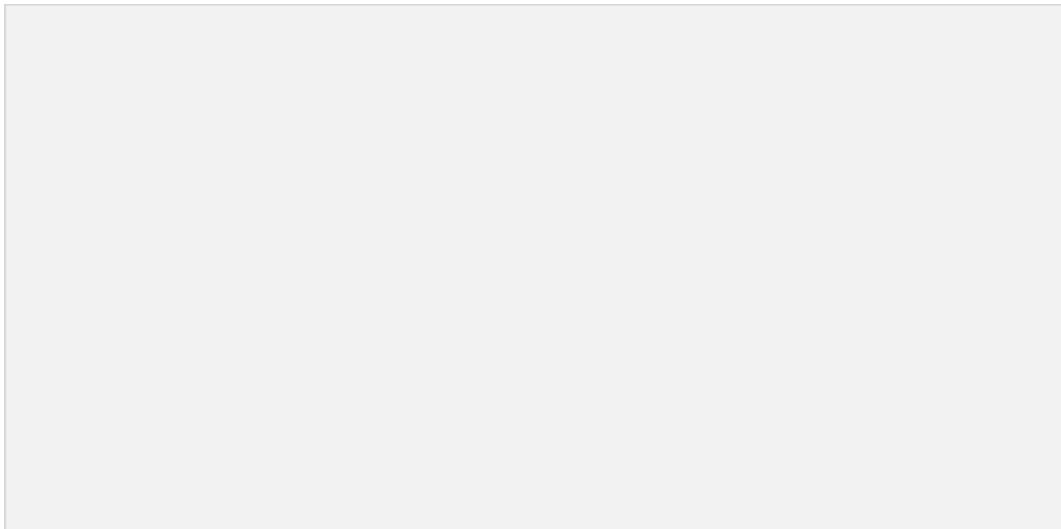
D'autre part, la Syn13 et Syn 15 exercent une activité hémolytique, et n'assurent aucune protection contre le TBHP quelque soit la concentration utilisée (200 ,100 ou 50 μ M) .

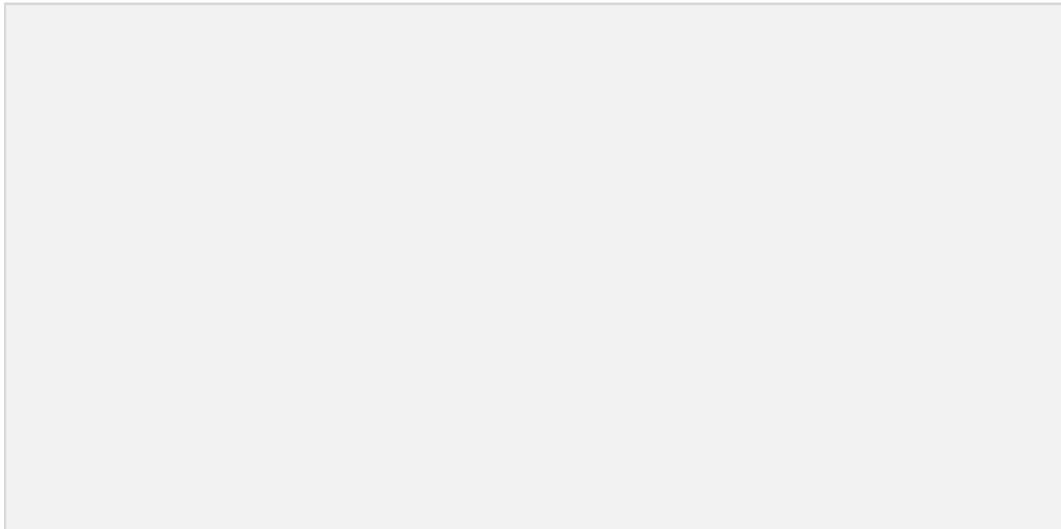
La Syn16 ne modifie pas les taux de viabilité érythrocytaire quelque soit sa concentration, et assure une protection significative contre le TBHP quelque soit la concentration utilisée.

La Syn17 entraine une diminution significative des taux de viabilité à 50 μ M et assure une activité anti-hémolytique significative contre le TBHP à 200 et à 100 μ M.

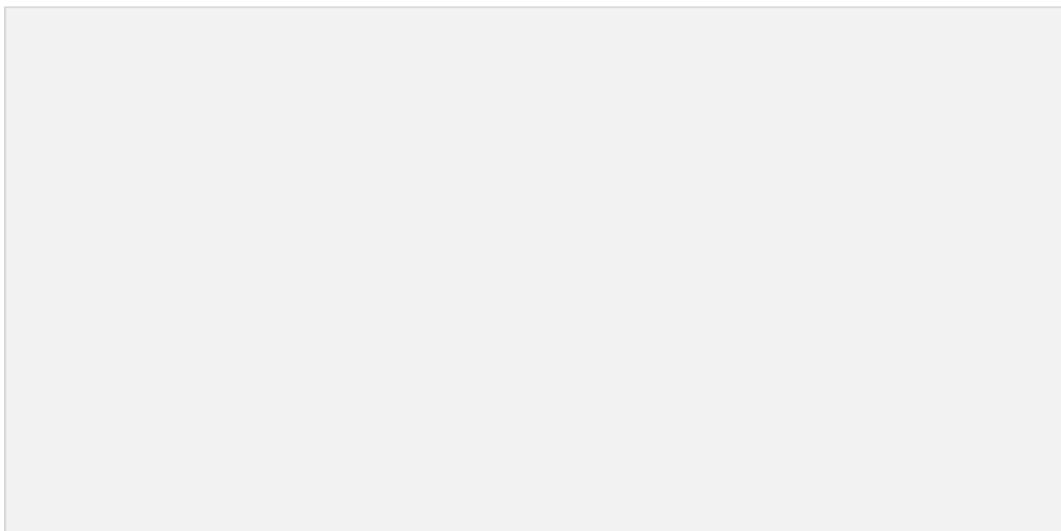
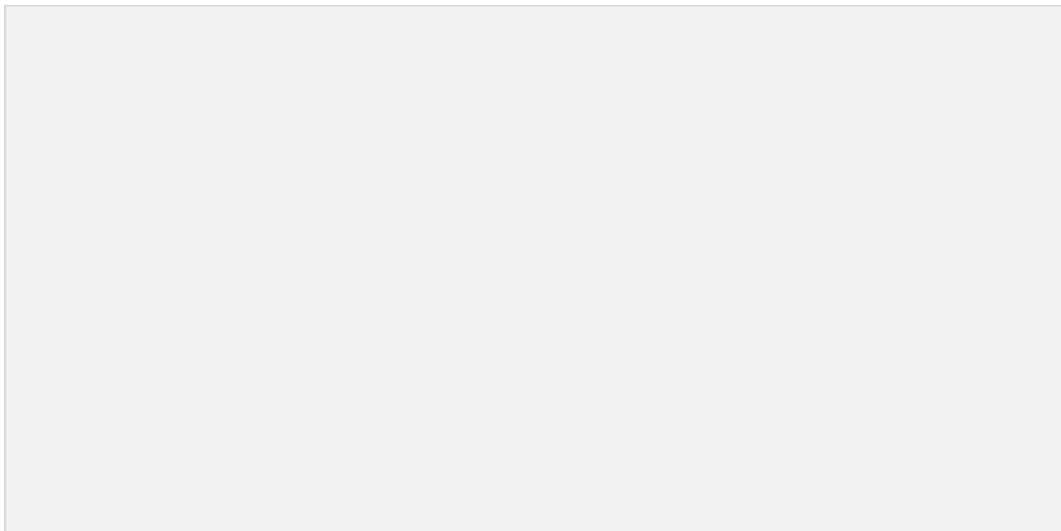


■ sans TBHP
■ avec TBHP





■ sans TBHP
■ avec TBHP



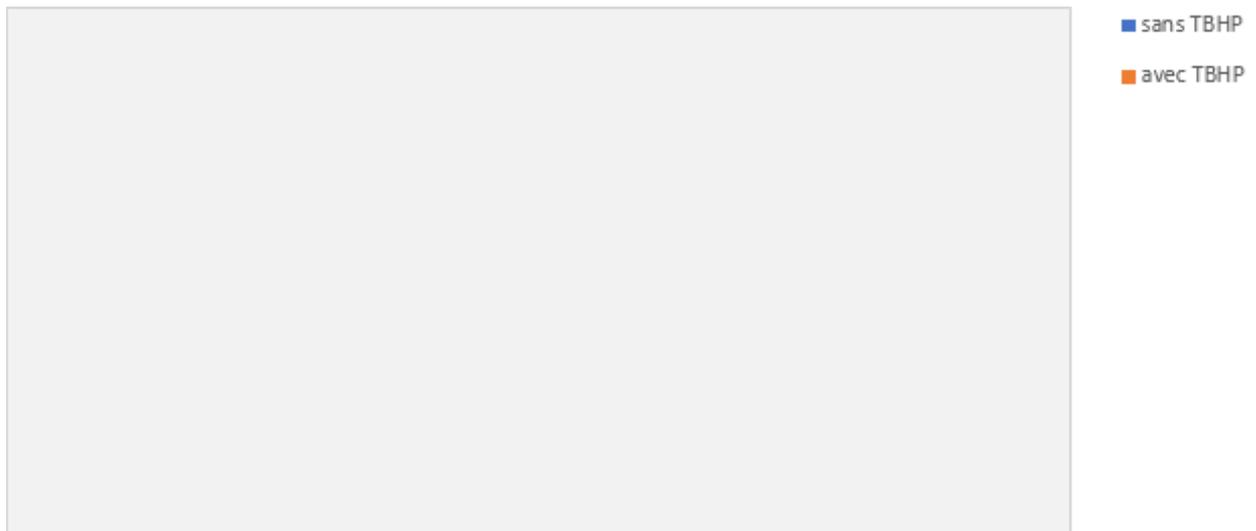


Figure 14 . Taux de viabilité d'une solution de globules rouges à 2% supplémentés en anthocyanes (200 μ M,100 μ M,50 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre globules rouges incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

2.2. Teneur en GSH érythrocytaire

Nos résultats montrent une augmentation significative des teneurs en GSH des globules rouges traités avec le Cl-Cy à 100 μ M et la Cl-Mlv à 100 et à 50 μ M (Figure15).

Par ailleurs une diminution des taux de GSH est observée en présence du Cl-Cy, Cl-Mlv et la Syn13 à 200 μ M et les Syn16 et Syn17 à 50 μ M.

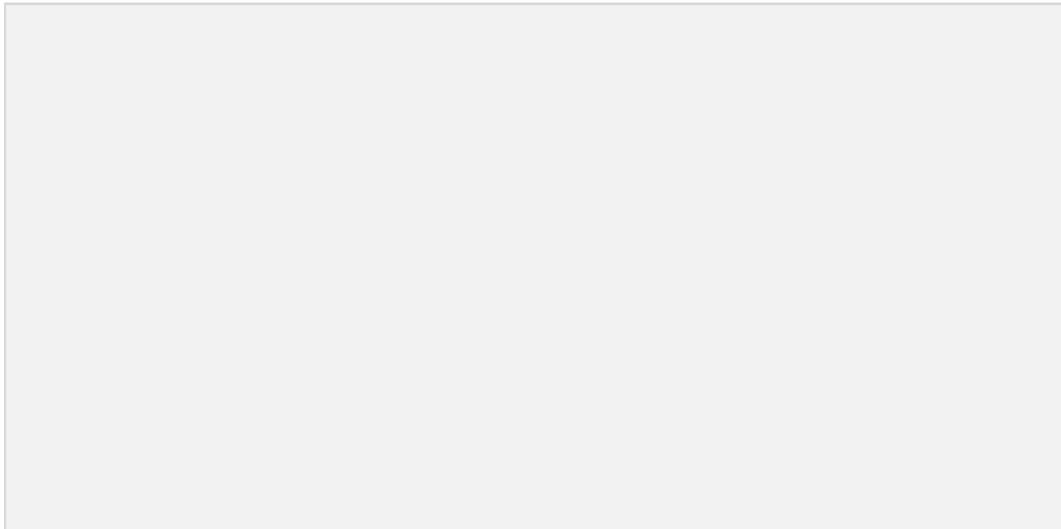
Pour le reste des concentrations les valeurs restent comparables au contrôle.

Nos résultats montrent que le traitement avec le générateur des radicaux libre (TBHP) induit une diminution significative des teneurs en GSH au niveau des globules rouges normaux.

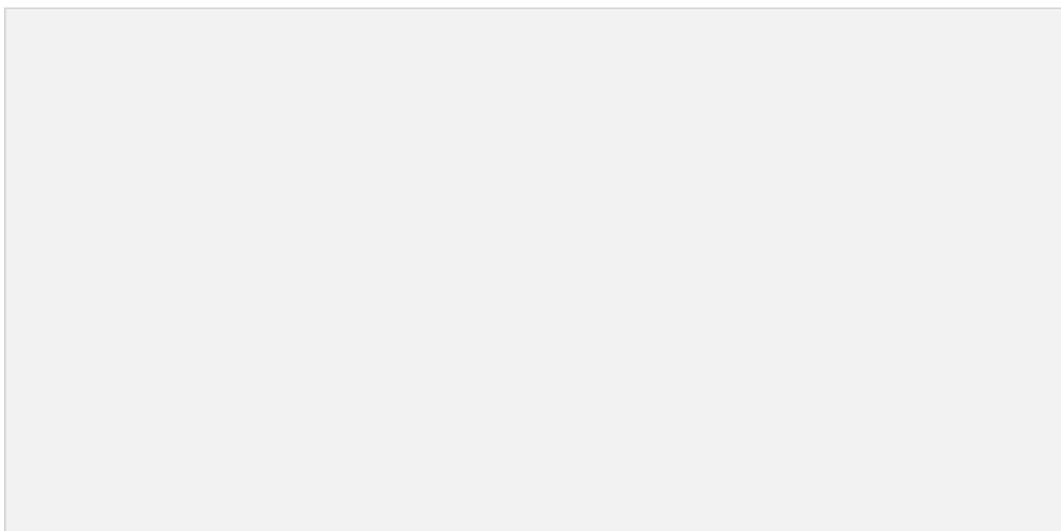
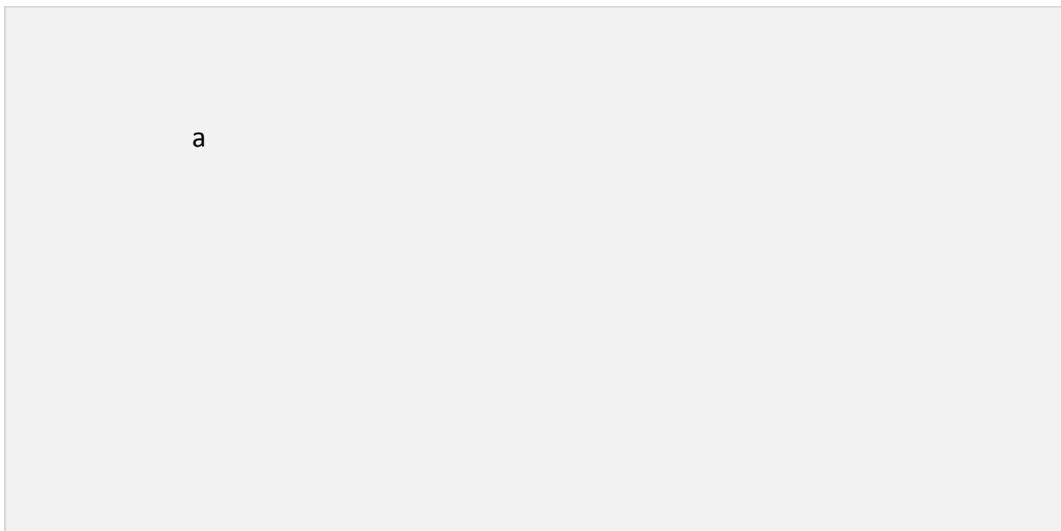
Le traitement avec : la Cl-Mlv à 200,100 et 50 μ M, le Cl-Kcy, la Syn16, et la Syn17 à 200 et à 100 μ M, ainsi qu'avec le Cl-Cy à 100 et 50 μ M au préalable d'un ajout du TBHP, contrecarre l'effet de ce dernier sur les taux du GSH.

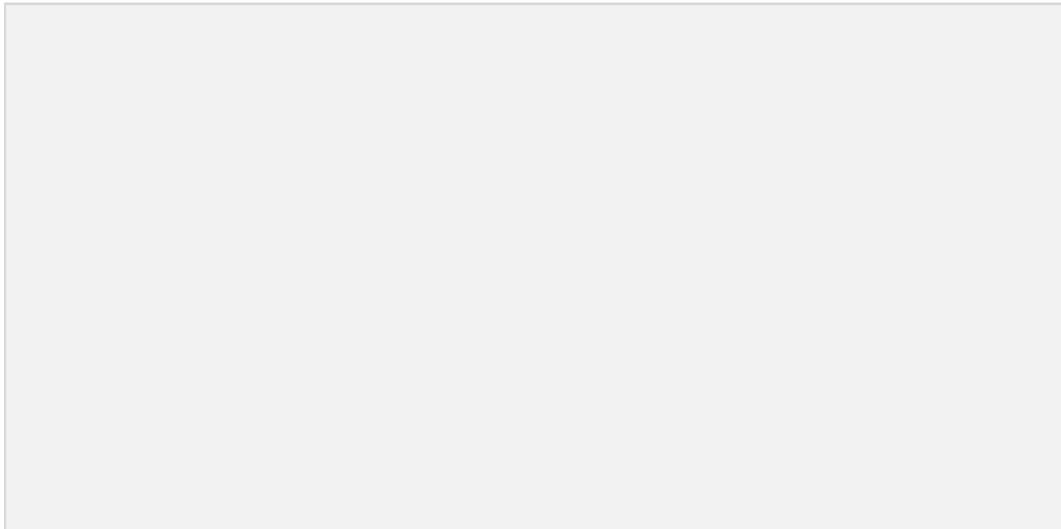
Par ailleurs le Cl-Cy à 200 μ M, le Cl-Kcy et la Syn16 à 50 μ M, et la Syn 15 à 200 et 100 μ M n'entraînent aucune modification des taux du GSH au niveau des érythrocytes soumis au TBHP.

Toutefois une diminution des teneurs en GSH est notée au niveau des érythrocytes soumis au TBHP traités avec la Syn15 et la Syn17 à 50 μ M.



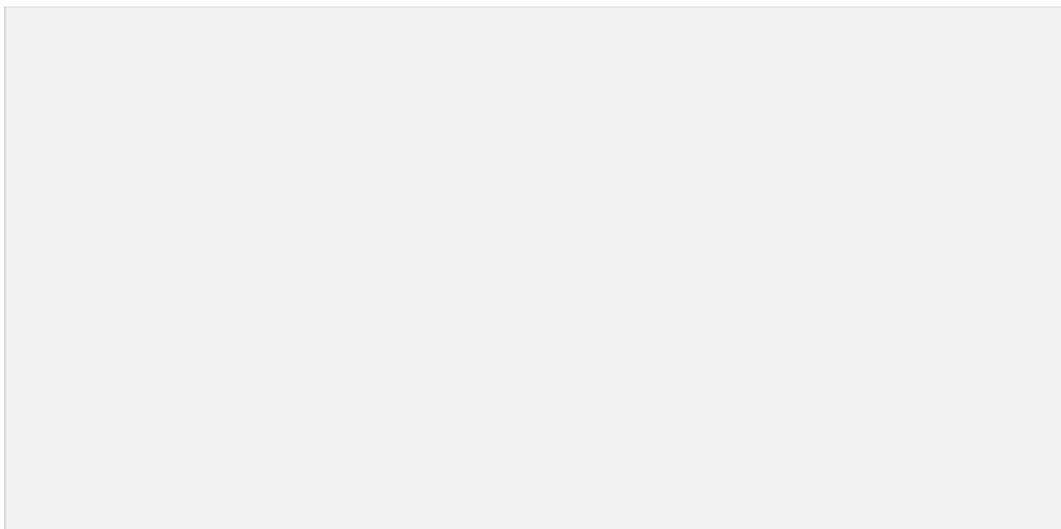
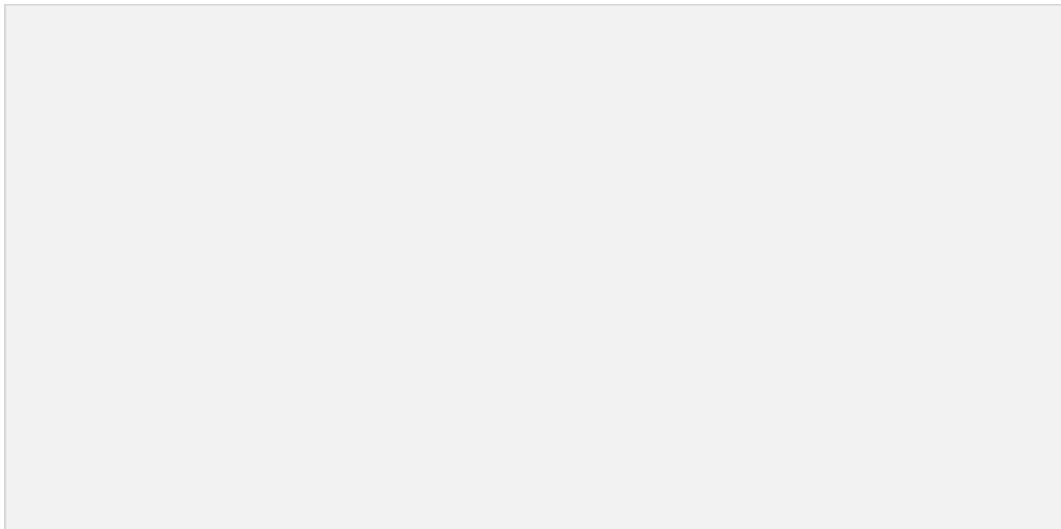
■ sans TBHP
■ avec TBHP





■ sans TBHP

■ avec TBHP



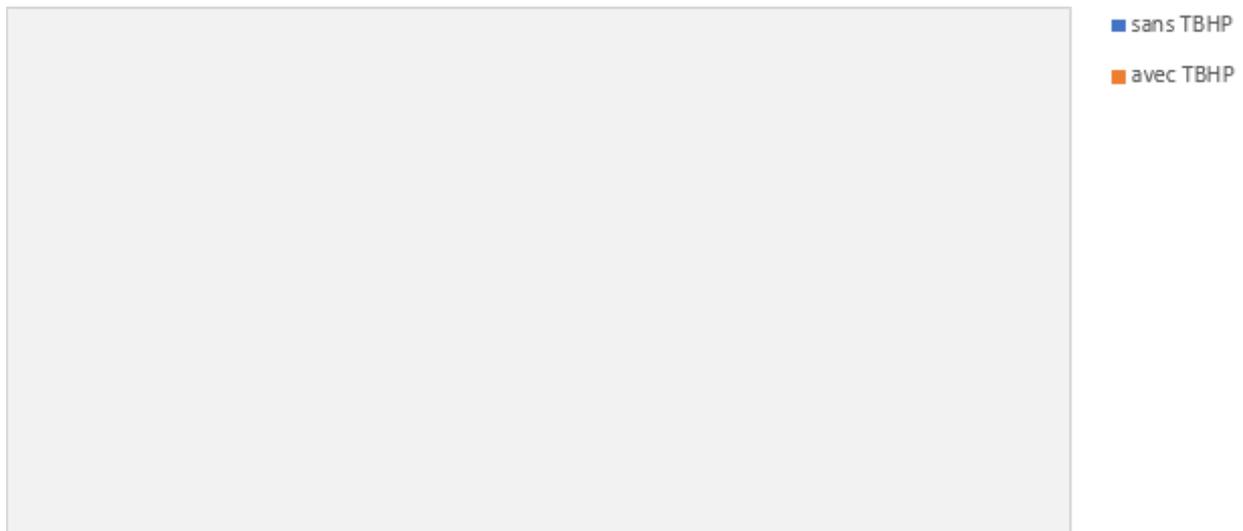


Figure 15. Teneurs en GSH d'une solution de globules rouges à 2% supplémentés en anthocyanes (200µM,100µM,50µM) en absence et en présence de TBHP (200µM) a 37°C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre globules rouges incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

2.3. Teneurs en MDA érythrocytaires

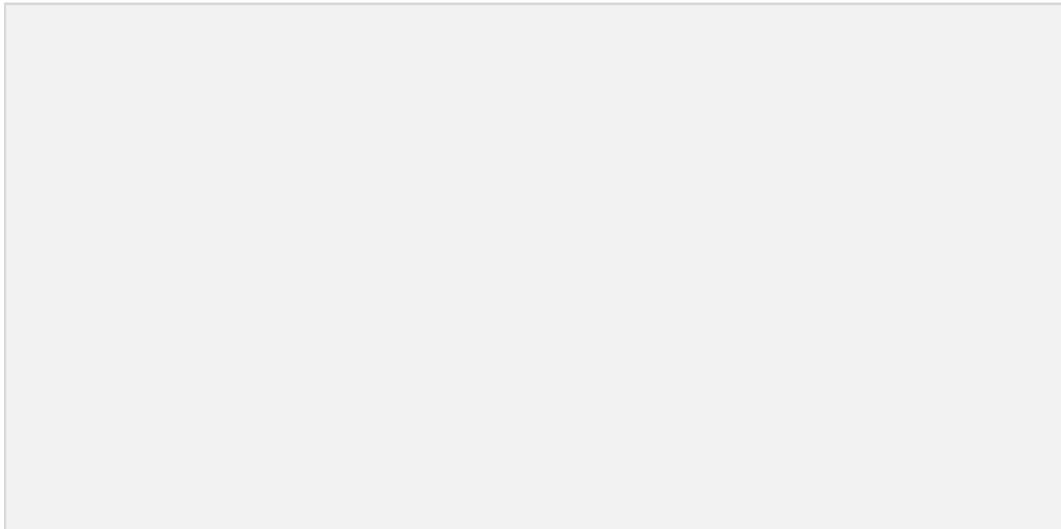
Une diminution significative des teneurs en MDA est notée suite au traitement au Cl-Cy et a la Syn16 à 100 et 50 μ M. Par ailleurs une augmentation des teneurs en MDA est observée suite au traitement au Cl-Cy à 200 μ M, et la Syn13 quelque soit sa concentration (200,100 et 50 μ M) ainsi que la Syn17 a100 μ M et 50 μ M (Figure16).

Aucun changement significatif n'est relevé pour le reste des anthocyanes et concentrations.

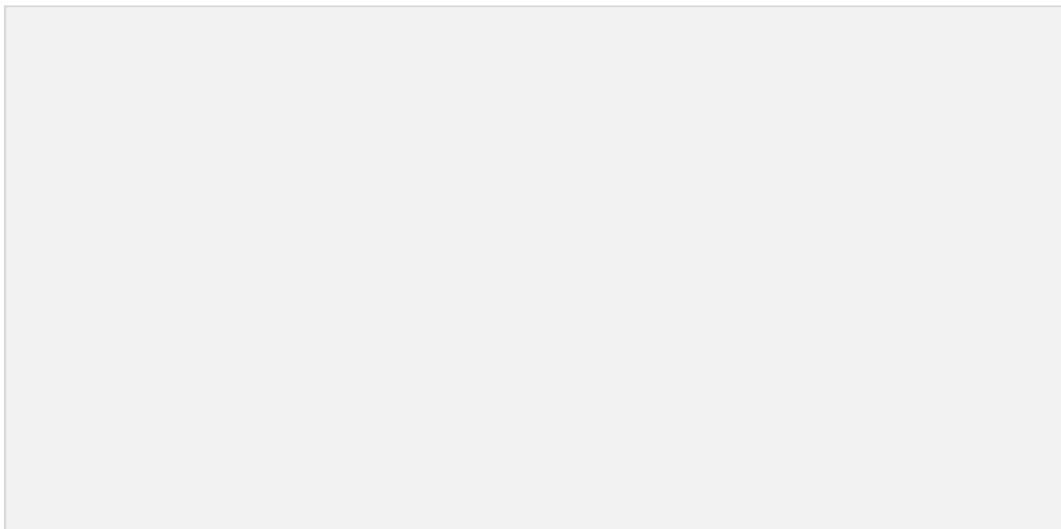
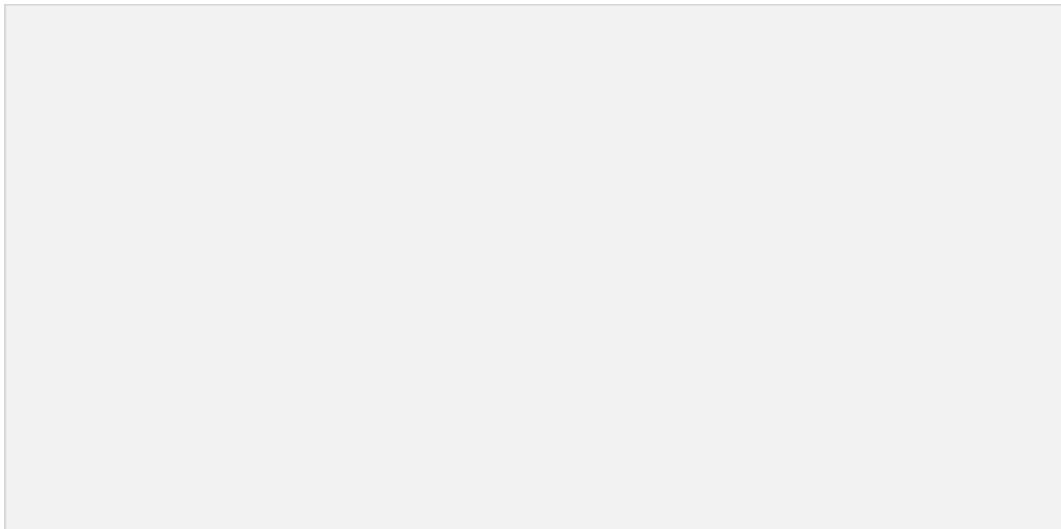
Les teneurs en MDA ont montré une augmentation significative à la suite du traitement au TBHP.

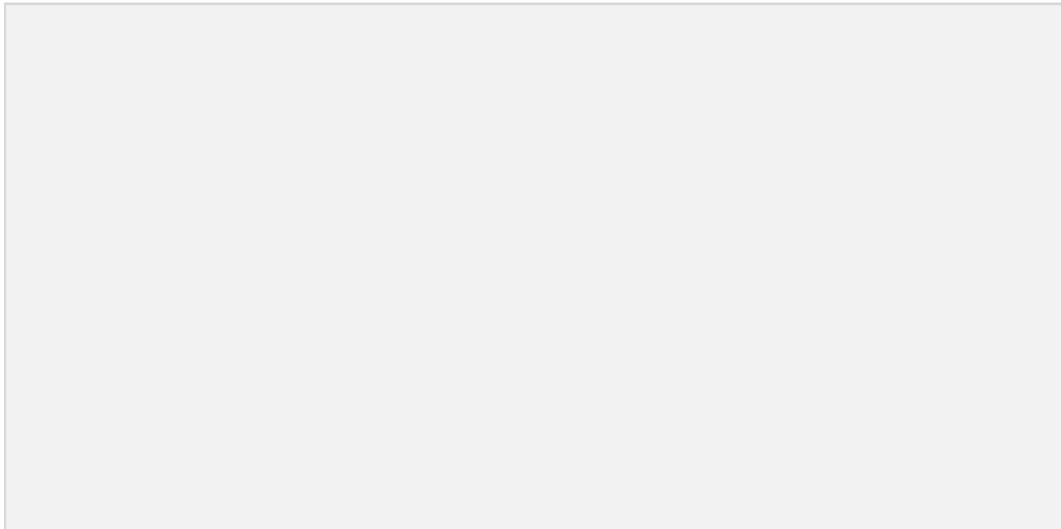
La préincubation des érythrocytes avec le Cl-Cy et le Cl-Mlv prévient cette augmentation d'une manière significative à 100 et 50 μ M, de même pour le Cl-Kcy,et la Syn16 à 200 et 100 μ M.

Pour les autres concentrations les modifications des taux du MDA sont peu ou pas significatives.

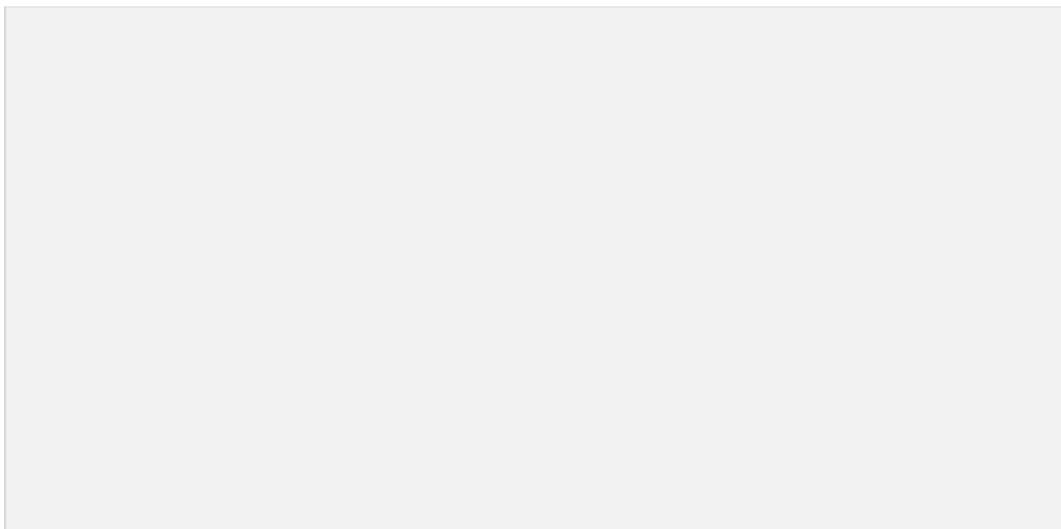
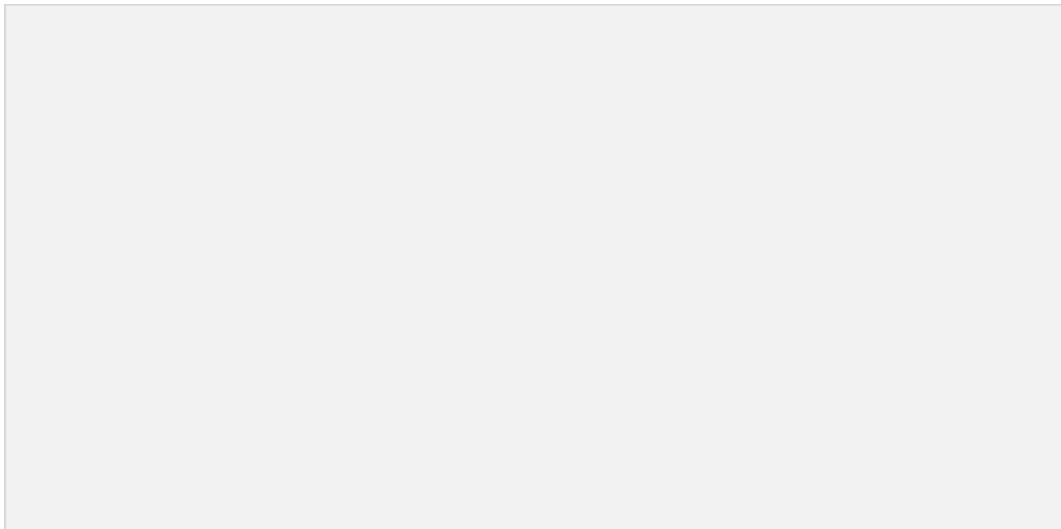


■ sans TBHP
■ avec TBHP





■ sans TBHP
■ avec TBHP



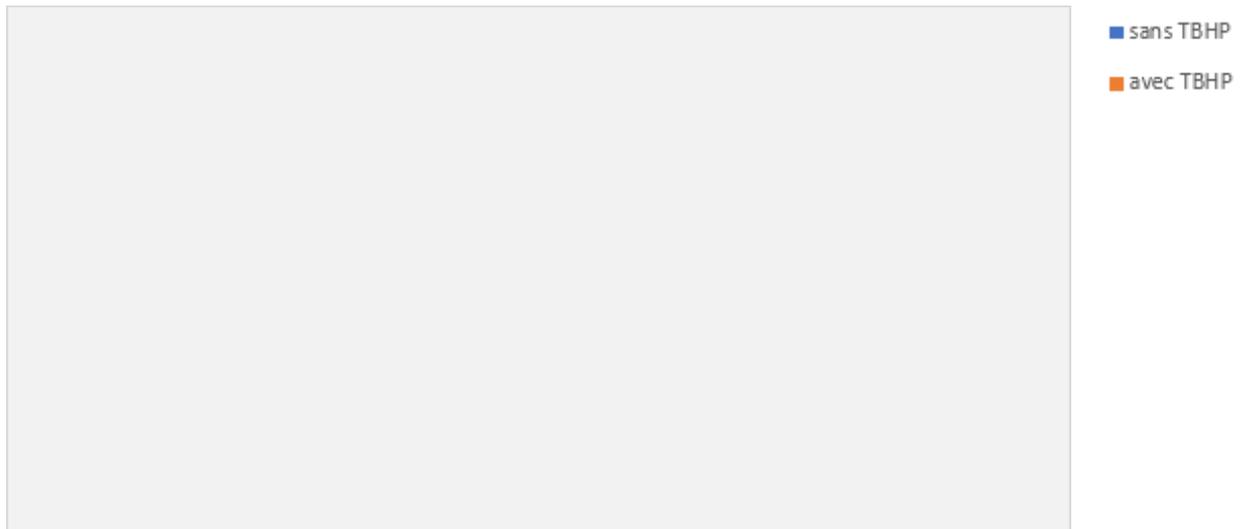


Figure 16. Teneurs en MDA d'une solution de globules rouges à 2% supplémentés en anthocyanes (200µM,100µM,200µM) en absence et en présence de TBHP (200µM) a 37°C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre globules rouges incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

3. Effet *in vitro* des anthocyanes sur les érythrocytes des β thalassémiques

3.1 Test de viabilité érythrocytaire à la Calcéine

Aucun changement significatif des taux de viabilité n'est noté suite au traitement des globules rouges avec les anthocyanes testées, à l'exception de la Syn16 où une diminution significative est observée (Figure 17).

Par ailleurs, une hémolyse importante de plus de 46% a eu lieu suite au traitement des globules rouges des β thalassémiques au TBHP.

Un traitement des globules rouges thalassémiques aux anthocyanes testées au préalable du TBHP prévient cette hémolyse d'une manière significative.

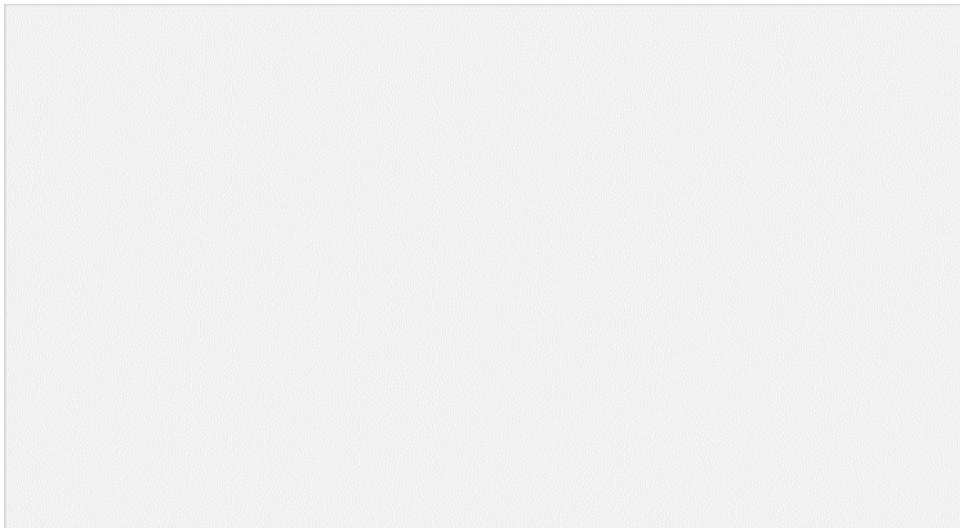


Figure 17. Taux de viabilité d'une solution de globules rouges thalassémiques à 2% supplémentés en anthocyanes (100 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre globules rouges thalassémiques incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

3.2. Teneur en GSH érythrocytaire

Les valeurs du GSH ont significativement augmenté suite à la supplémentation des érythrocytes thalassémiques en anthocyanes sauf avec la Syn16 où aucun changement significatif n'est observé (Figure18).

Par ailleurs, le taux du GSH là aussi, a nettement diminué après l'addition du TBHP.

Les résultats obtenus avec les érythrocytes thalassémiques supplémentés en anthocyanes puis incubés avec le TBHP contrastent ceux obtenus avec le TBHP, en effet, une amélioration significative des taux du GSH est notée suite au traitement avec les différentes anthocyanes, elle est même très significative pour les Cl-Cy, Cl-Kcy, Syn17.

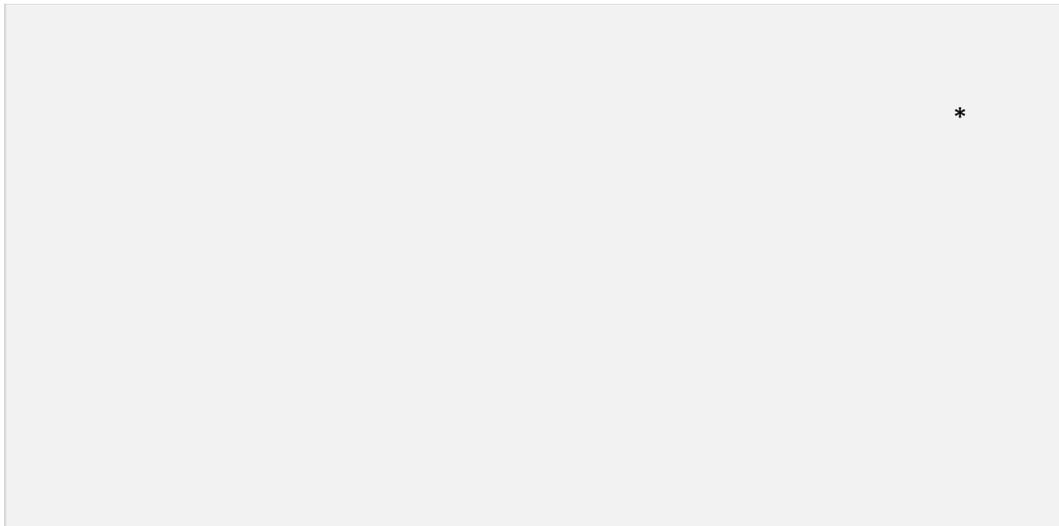


Figure 18. Teneurs en GSH d'une solution de globules rouges thalassémiques à 2% supplémentés en anthocyanes (100 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) à 37°C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre globules rouges thalassémiques incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

3.3. Teneur en MDA érythrocytaire

L'analyse du MDA montre une diminution significative des teneurs en MDA au niveau des érythrocytes thalassémiques quelque soit l'anthocyane testée (Figure19).

Les teneurs en MDA érythrocytaires ont significativement augmenté à la suite de l'ajout du TBHP. Cette augmentation est basculée d'une manière significative suite à une préincubation des érythrocytes thalassémiques avec les anthocyanes testées, elle est particulièrement très significative avec le Cl-Cy et le Cl-Kcy.

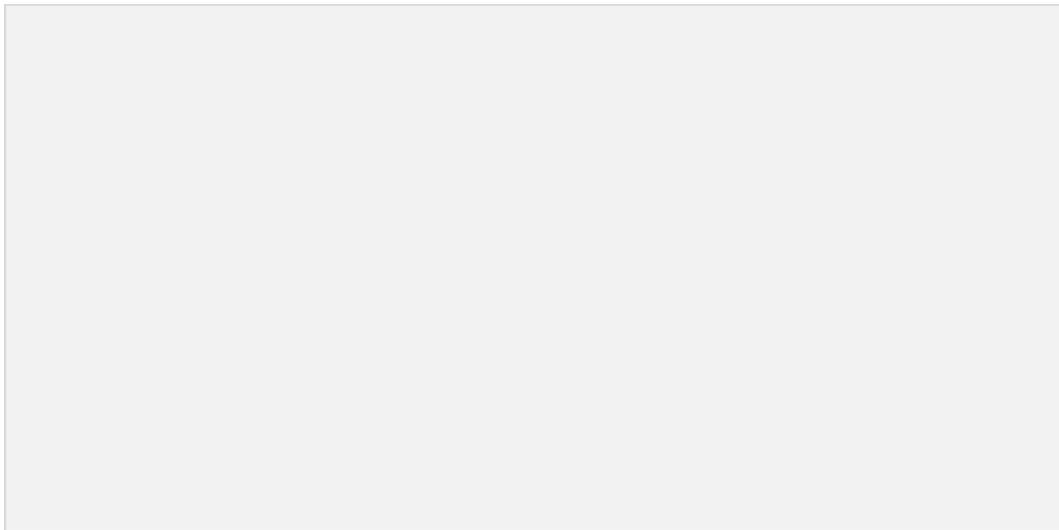


Figure 19. Teneurs en MDA d'une solution de globules rouges thalassémiques à 2% supplémentés en anthocyanes (100 μ M) en absence et en présence de TBHP (200 μ M) a 37°C

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre globules rouges thalassémiques incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

4. Etude *in vitro* sur les lymphocytes

Cette partie est consacrée à l'étude de l'effet de 2 anthocyanes naturelles (CI-Kcy et CI-Mlv) et 4 anthocyanes de synthèse (Syn 13, Syn 15, Syn 16 et Syn 17) sur les lymphocytes.

Les lymphocytes sont mis en culture en présence de différents antioxydants pendant 48 heures. Par la suite, différents marqueurs sont analysés afin de déterminer les effets de ces antioxydants sur la fonction lymphocytaire. Deux protocoles sont utilisés afin de visualiser l'effet direct et l'effet préventif.

Pour l'effet direct les lymphocytes sont incubés avec les anthocyanes seulement.

Pour l'effet préventif, les lymphocytes sont d'abord incubés avec les anthocyanes, puis avec un générateur de radicaux libres (TBHP).

4.1. Indice de prolifération lymphocytaire

Le Tableau 3 montre l'effet des anthocyanes étudiées sur la prolifération lymphocytaire.

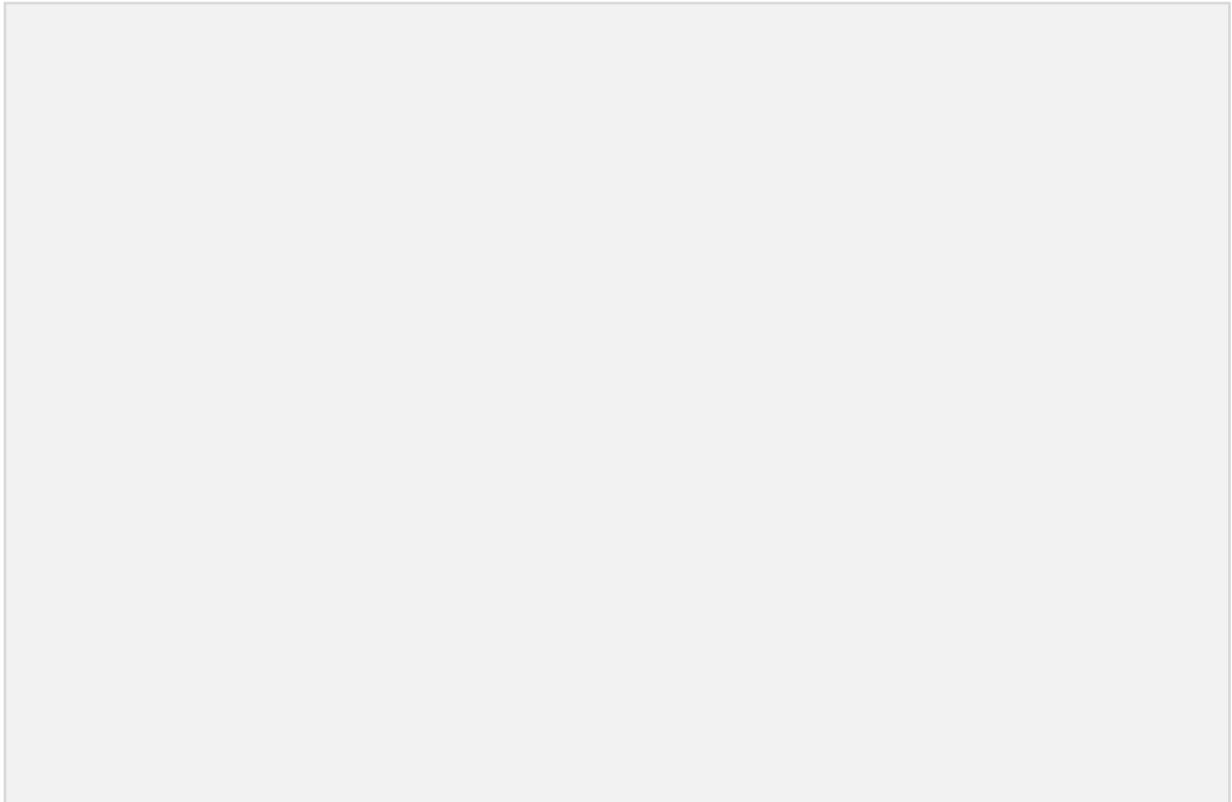
La prolifération lymphocytaire *in vitro* en présence d'agent mitogène, la Concanavoline A (ConA) est représentée sous forme d'indice de prolifération.

L'ajout des anthocyanes (25 et 50 μ M) dans le milieu de culture potentialise l'effet de la Con A et stimule la prolifération lymphocytaire, à l'exception de la Syn16 qui garde les taux de proliférations similaires aux contrôles.

Par ailleurs, une baisse significative de la prolifération lymphocytaire est observée au niveau des lymphocytes agressés par l'agent oxydant TBHP.

Dans l'expérience liée à la prévention, le prétraitement des lymphocytes par les anthocyanes étudiées freine le déclin de la prolifération cellulaire causée par le TBHP.

Tableau3. Indice de prolifération lymphocytaire en présence des différentes anthocyanes étudiées.



Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre lymphocytes incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

4.2 Teneur en GSH lymphocytaire

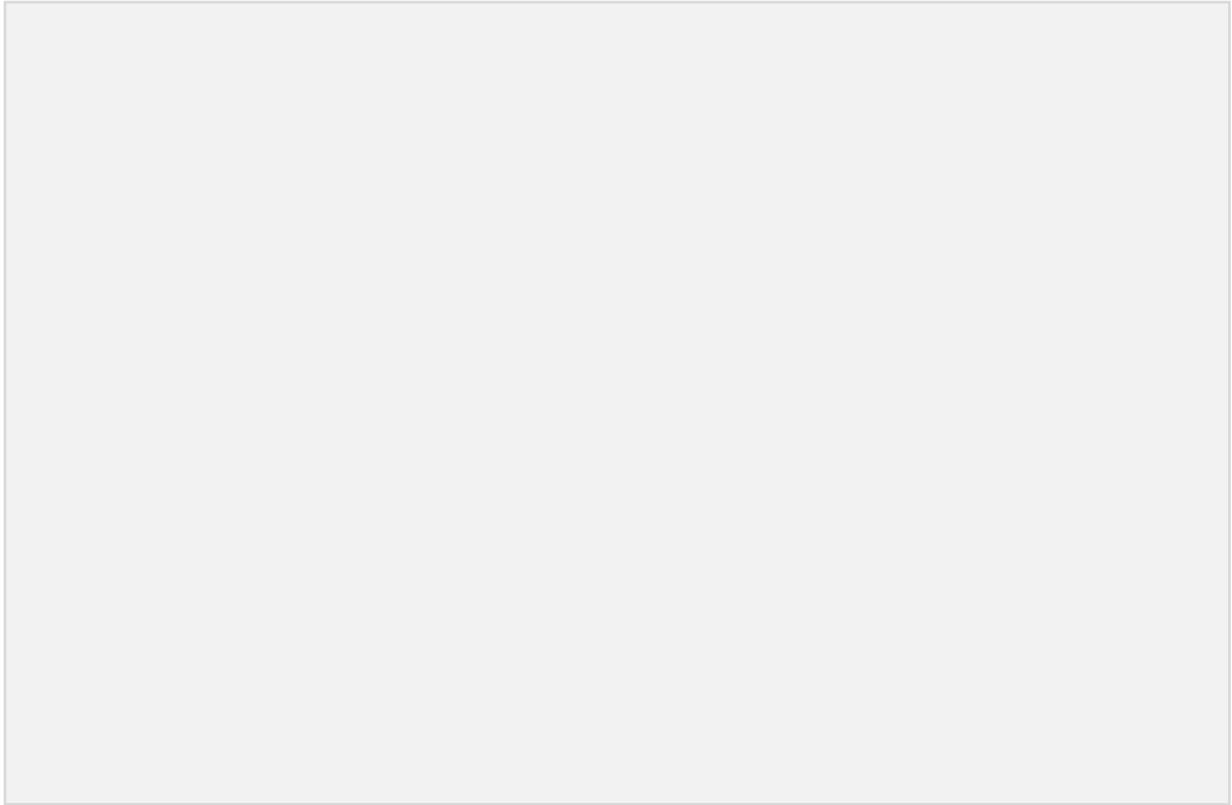
Le taux du GSH augmente en présence du Cl-Kcy à 25 et 50 μ M. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée suite à l'ajout du Cl-Mlv, Syn13, Syn17 quelque soit leurs concentrations, toutefois une diminution des teneurs en GSH est relevée suite à l'ajout de 50 μ M de la Syn 15 (Tableau 4).

L'exposition au TBHP, produit un effet indésirable significatif sur le statut antioxydant des lymphocytes, qui est traduit par une réduction significative des teneurs en GSH comparées aux valeurs contrôles.

L'addition de la Syn17 à 25 et 50 μ M et la Syn13 à 50 μ M au préalable de l'ajout du TBHP permet de protéger les taux de GSH au sein des lymphocytes. Ce qui n'est pas le cas avec le Cl-Mlv quelque soit sa concentration.

En outre, la Syn 15 engendre une chute des teneurs en GSH à 25 et 50 μ M. Par ailleurs aucun changement significatif n'est observé pour les autres concentrations et anthocyanes.

Tableau4. Effets des différentes anthocyanes sur le taux de glutathion réduit lymphocytaire



Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre lymphocytes incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

4.3 Teneur en MDA lymphocytaire

Le Cl-Mlv, la Syn13 et la Syn16 à 25 μ M, réduisent les taux du MDA lymphocytaire comparativement au contrôle, tandis que les teneurs en MDA lymphocytaires ne sont pas affectés pour le reste des concentrations et anthocyanes (Tableau 5).

L'effet oxydant du TBHP est clairement avéré là aussi, puisque les taux du MDA des lymphocytes supplémentés en TBHP sont significativement élevés par rapport aux contrôles.

L'effet préventif est observé pour les anthocyanes : Cl-Kcy , Cl-Mlv , Syn 13 et Syn15 a 25 et 50 μ M ainsi que pour et les Syn 16 et Syn17 à 25 μ M qui entraînent une diminution des taux du MDA au niveau des lymphocytes soumis au TBHP.

Tableau5. Effets des différentes anthocyanes sur le taux de MDA lymphocytaire

Chaque valeur représente la moyenne \pm ET des dosages réalisés en triple. La comparaison des moyennes entre lymphocytes incubés avec et sans TBHP est réalisée par le test t de Student: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Les comparaisons multiples entre les différentes incubations du même groupe sont effectuées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les différences significatives (P < 0,05) entre les différentes incubations sont marquées par des lettres différentes (a,b,c,).

Discussion

Les données récentes en relation avec le stress oxydant et l'équilibre alimentaire apportent des éléments de réflexion sur le rôle des facteurs nutritionnels au cours des états pathologiques.

La réaction en chaîne destructive initiée par les radicaux libres peut être interrompue par des antioxydants, capables de convertir les radicaux libres en dérivés inoffensifs. Les anthocyanes sont connus pour être de puissants nutriments antioxydants (Wang et al., 1997; Wang et Stoner, 2008; Smeriglio et al., 2016; Bao et al., 2018). L'apport alimentaire de ces antioxydants est maintenant considéré comme capable de moduler l'activité du système de défense et d'avoir ainsi un impact sur le degré de protection fournie à la cellule ou au tissu contre les réactions oxydatives impliquées dans l'apparition de plusieurs pathologies tel que la thalassémie (Alidoost et al., 2006; Mirzaei et al., 2013).

La séquence des événements consécutifs à la précipitation des chaînes α Hb et aux transfusions thérapeutiques répétées conduit à une surcharge systémique en fer et affectent de manière remarquable le statut redox des globules rouges thalassémiques (Livrea et al., 1996; Alidoost et al., 2006; Romanello et al., 2018; Keshk et al., 2019). La physiopathologie de la thalassémie est majoritairement associée à la génération de fer labile dans les globules rouges pathologiques. L'apparition de telles formes de fer aux surfaces interne et externe de la cellule, expose celle-ci à des conditions telles que le métal labile favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EOR), entraînant des dommages cumulatifs pour les cellules. Une autre source d'accumulation de fer résulte d'une absorption accrue due à une diminution de l'expression de l'hépcidine (Rachmilewitz et al., 2005).

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet antioxydant *in vitro* de quelques anthocyanes naturelles et synthétiques sur deux modèles cellulaires à savoir les globules rouges (normaux et de patient atteint de la β thalassémie) et les lymphocytes humains normaux, soumis ou pas à des lésions induites par un générateur de radicaux libres le TBHP.

Bien que de multiples travaux se sont intéressés aux effets bénéfiques des anthocyanes sur l'organisme, les éventuels biais et complexité du domaine du *in vivo*, confère à l'étude *in vitro* une démarche incontournable qui permet de mieux cibler, contrôler et comprendre les réponses en fonction de chaque type cellulaire.

Le globule rouge est l'une des cibles des espèces réactives de l'oxygène générées lors de dommages dus au stress oxydant, en raison de la présence d'acides gras polyinsaturés au niveau

leurs membranes, leur riche apport en oxygène et leur concentration en Hb, qui constituent un puissant catalyseur et promoteurs du stress oxydant érythrocytaire (Sadrzadeh et al., 1984; Clemens et al., 1987; Melo et al., 2019).

Le maintien de la structure normale des globules rouges devrait donc constituer une des approches thérapeutiques importantes au cours des pathologies associées à des troubles hématologiques (Toptas et al., 2006).

En effet, les globules rouges se caractérisent par une forte corrélation entre la structure et la fonction biologique, ce qui en fait un modèle parfait pour étudier l'interaction de différentes molécules avec l'organisme au niveau cellulaire (Bruno-Franco et Mazzei, 2004; Pagano et Faggio, 2015).

L'applicabilité du test de cytotoxicité *in vitro* dans les globules rouges est un outil alternatif pour l'évaluation supplémentaire de la toxicité des composés (Cyboran-Mikołajczyk et al., 2019).

Le lymphocyte est l'un des principaux acteurs du système immunitaire.

Il existe peu de maladies, peut-être aucune, où le système immunitaire ne soit pas relié, à un niveau quelconque, à la pathogénie

Qu'il s'agisse de réponses basiques ou complexes, le système immunitaire, comme n'importe quel autre système de l'organisme, dépend d'un apport alimentaire adéquat et est très sensible aux déficits et déséquilibres nutritionnels ainsi qu'aux molécules bioactives tel que les anthocyanes dont les activités anti-inflammatoire et immunomodulatrice sont l'une des principales propriétés (Bowen-Forbes et al., 2010; González-Gallego et al., 2018; Valenza et al., 2018).

Le traitement au TBHP déclenche une cascade de réactions oxydatives qui imitent et accélèrent les événements physiopathologiques et les mécanismes de lésion cellulaire oxydative (Coleman et al., 1989; Altman et al., 1994). Les hydroperoxydes organiques se forment suite à l'addition d'oxygène aux radicaux alkyles et / ou par extraction d'atomes d'hydrogène de radicaux peroxy (Sandström, 1991). Le TBHP peut alors se décomposer en radicaux alkoxy et peroxy qui accélèrent les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Baker et He, 1991; Sandström, 1991). Cette décomposition est facilitée par les ions métalliques et leurs complexes. Les mécanismes proposés pour la toxicité induite par le TBHP incluent la modification de l'homéostasie du calcium intracellulaire suivant l'épuisement du glutathion et des protéines thiols (Guidarelli et al., 1997a; Guidarelli et al., 1997b; Kim et al., 1998;

Gutteridge et Halliwell, 2010), le début de la peroxydation lipidique (Fraga et Tappel, 1988; Hwang et al., 1996) et la production de radicaux butoxyyle (Altman et al., 1994). La génotoxicité du TBHP découle d'une réaction induite par un métal de transition conduisant à la génération de différentes EOR (Coleman et al., 1989; Guidarelli et al., 1997b; Halliwell et Gutteridge, 1999).

Nous avons déterminé dans un premier temps le pouvoir anti-oxydant des anthocyanes testées par le biais du DPPH.

Les résultats du DPPH montrent que le Chlorure de cyanine (Cl-Cy) est l'anthocyane avec le pouvoir antiradicalaire le plus élevé suivi par le chlorure de 6,7,3',4'-tétrahydroxy-flavylium (Syn16), le Chlorure de këracyanine (Cl-Kcy), chlorure de 3',4'-dihydroxy-7-méthoxy-flavylium (Syn17), le chlorure de 6,7-dihydroxy-4'-methoxy-flavylium (Syn 15) et le Chlorure de malvine (Cl-Mlv), tandis que le chlorure de 4',7-dihydroxy-flavylium (Syn13) ne montre aucun pouvoir antiradicalaire; ces résultats montrent que l'activité antiradicalaire de ces anthocyanes est structure-dépendante. En effet elle est proportionnelle au nombre et à la position des groupes hydroxyles, puisque les anthocyanes avec le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé sont celles possédant le plus de groupes hydroxyles, avec une structure catéchol au niveau de l'anneau B.

Nos résultats concordent avec ceux de (Wang et al., 1997; Kondo et al., 1999; Okawa et al., 2001)

Nous avons ensuite examiné l'effet du stress généré par un générateur de radicaux libres à savoir le TBHP sur la viabilité cellulaire ainsi que l'effet potentiellement protecteur (au niveau des cellules pré-incubées avec les anthocyanes puis, soumises au TBHP), et l'effet direct (cellules incubées avec les anthocyanes seulement) de ces anthocyanes, puis nous avons estimé le statut oxydant/anti-oxydant de ces modèles.

Le traitement au TBHP déclenche une cascade de réactions oxydatives qui imitent et accélèrent les événements physiopathologiques conduisant à l'hémolyse des globules rouges thalassémiques. En présence d'agents oxydants, l'hémoglobine libère du fer pour former de la méthémoglobine (metHB) sous une carence en glutathion, engendrant une peroxydation lipidique (Neto et al., 2011) et une hémolyse (Comporti et al., 2002).

Nos résultats montrent que le traitement avec un hydro peroxydant organique le TBHP induit une hémolyse importante, une augmentation des taux de MDA et une déplétion significative en

GSH dans les globules rouges normaux et β -thalassémiques, ce qui est en accord avec les études précédentes (Trotta et al., 1982; Rice-Evans et al., 1985; Albertini et al., 1996; Almar et al., 1998; Roy et Sil, 2012; Lv et al., 2017; Senchenkova et al., 2017) montrant que l'exposition des globules rouges au TBHP entraîne une diminution du taux de GSH et une production des EOR, notamment des radicaux OH° induisant une peroxydation lipidique et la formation de la metHb. Cette dernière semble jouer un rôle crucial dans le mécanisme de sensibilisation et de lyse des globules rouges induit par le TBHP. Cependant, en raison de la défense antioxydante limitée et des quantités plus élevées d'hémoglobine dans la membrane des globules rouges thalassémiques, ces derniers sont plus susceptibles que les globules rouges sains à l'hémolyse oxydante induite par TBHP (Tesoriere et al., 2006).

Nos résultats montrent qu'une supplémentation en Cl-Cy n'affecte pas les taux de viabilité cellulaire des globules rouges thalassémiques à $100\mu\text{M}$ et celle des globules rouges normaux quelque soit la concentration ($200, 100$ ou $50\mu\text{M}$) ; un pré-traitement avec le Cl-Cy prévient les globules rouges normaux traités avec le TBHP de l'hémolyse quelque soit la concentration utilisée, de même pour les globules rouges thalassémiques traités avec le Cl-Cy à $100\mu\text{M}$. Ceci peut s'expliquer par les propriétés antioxydantes des anthocyanes, et leurs capacité de piégeage des EOR générées par l'oxydation de l'Hb en metHb (Ozturk et al., 2003). Cette oxydation pouvant donner naissance à $\text{O}^2 \cdot^-$ et au H_2O_2 et dans certains cas au radical peroxy au niveau de la membrane qui est relativement inaccessible aux enzymes antioxydantes cytoplasmiques, entraînant une peroxydation des lipides membranaires et une hémolyse (Clemens et al., 1984).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Cyboran-Mikołajczyk et al. (2019), indiquant que la cyanidine et ses O-glycosides possèdent une grande capacité à piéger et à neutraliser les radicaux libres induits par un générateur de radicaux libres *in vitro* ; et ceux de Sangkitikomol et al. (2010); et Mpiana et al. (2013), montrant l'effet protecteur de l'anthocyanes contre l'hémolyse des globules rouges médiée par un générateur de radicaux libres.

Par ailleurs le Cl-Kcy, le Cl-Mlv, et la Syn17 assurent une protection des globules rouges thalassémiques contre le TBHP, et montrent des résultats mitigés concernant les globules rouges normaux, en outre, la Syn16 assure une protection des globules rouges thalassémiques et normaux contre le TBHP quelque soit sa concentration, mais diminue le taux de viabilité au niveau des érythrocytes thalassémiques, ceci peut-être dû à la propriété concentration-dépendante des anthocyanes. En effet, Sulaiman et Hussain. (2012) ont démontré que les anthocyanes présentent des propriétés cytoprotectrices dépendantes de la concentration et du temps contre les dommages hémolytiques induits par des agents oxydants.

D'autre part la Syn13 et la Syn 15, anthocyanes de synthèse exhibent une activité cytotoxique vis-à-vis des globules rouges normaux en diminuant significativement le taux de viabilité , et n'assurent aucune protection contre le TBHP quelque soit la concentration utilisée , ceci est dû à l'activité pro-oxydante des certains flavonoïdes (Cao et al., 1997; Fukumoto et Mazza, 2000). En effet certains antioxydants sont à double caractère où ils présentent un effet pro-oxydant qui génère des radicaux libres réactifs et qui induisent des effets cytotoxiques à certaines concentrations élevées (pharmacologiques) ; ou à des concentrations très faibles. Il a été suggéré que pour les polyphénols possédant les deux activités (oxydante et anti-oxydante), un cycle redox pouvait exister à faibles concentrations quand il n'y a pas assez de polyphénols pour piéger les radicaux libres , et qu'une fois que les polyphénols sont en concentrations suffisante il y a piégeage des radicaux libres (Perron et al., 2011).

Ceci est bien reflété par l'augmentation des taux de MDA des globules rouges incubés avec la Syn13 particulièrement.

Contrairement à la Syn13, le Cl-Cy à 100 et 50 μM diminue significativement les taux du MDA des globules rouges normaux et thalassémiques (à 100 μM) traités avec du TBHP. Il a été rapporté que les anthocyanes inhibent la peroxydation lipidique dans plusieurs modèles lipidiques *in vitro*, tels que la membrane liposomale, le système microsomal hépatique et les LDL exposées aux dommages oxydatifs (García-Alonso et al., 2004) ; cette protection s'explique par la capacité des anthocyanes à piéger les radicaux libres tout en épargnant d'autres antioxydants de l'oxydation (Rodrigo et al., 2011).

Rice-Evans et al. (1996) ont démontré que la cyanidin-3-glucoside inhibe la consommation de tocophérols associés à la membrane en ramenant le radical tochophéryle directement à sa forme réduite, ou en éliminant les radicaux près de la surface membranaire afin de les empêcher d'attaquer le tocophérol. De plus, les anthocyanes peuvent empêcher l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions métalliques en chélatant ces métaux, et forment un complexe anthocyane-métal; de cette manière, les anthocyanes offrent un effet anti-hémolytique indirect en préservant la réduction non enzymatique de la métHb par l'ascorbate (Sarma et al., 1997).

D'autre part le Cl-Kcy, et Cl-Mlv montrent des résultats mitigés, elles n'exercent aucun effet sur les taux des MDA des globules rouges normaux quelque soit la concentration, agissent de la manière concentration-dépendante envers le MDA des globules rouges normaux traités avec du TBHP, mais assurent une diminution significative des taux du MDA au niveau des globules rouges thalassémique traités ou pas avec du TBHP. Ceci peut être expliqué par l'activité chélatrices des anthocyanes qui sont considérés comme de bons chélateurs susceptibles de

former des complexes stables avec les ions impliqués dans de nombreuses réactions radicalaires produisant des espèces très réactives via la réaction de Fenton (Laguerre et al., 2007) . En effet une surcharge en fer (caractéristique des globules rouges thalassémiques ou induite par le TBHP au niveau des érythrocytes normaux) mène à une augmentation des taux du MDA comme résultat de la peroxydation lipidique via la réaction de Fenton et d'Haber-Weiss, ce qui peut expliquer la diminution du MDA au niveau de globules rouges normaux traités avec du TBHP et thalassémiques incubés avec ces anthocyanes. La formation de complexes anthocyane-Fe empêche l'ion Fe^{2+} de former les radicaux $\bullet OH$ impliqués dans la peroxydation lipidique et donc la formation du MDA. Gabrielska et Oszmiański. (2005) ont montré que la cyanidine-3-rutinoside possède une activité antioxydante contre l'oxydation des liposomes, induite par le Fe (II) *in vitro* .En outre Huang et al.(2016) ont démontré que la malvidin-3-glucoside et la malvidin-3-galactoside possédaient d'excellentes propriétés antioxydantes en assurant une protection des cellules endothéliales contre le stress oxydant *in vitro* .

Le GSH est l'une des molécules antioxydante endogènes les plus importantes au niveau des érythrocytes (Quintana-Cabrera et Bolaños, 2013; Melo et al., 2019).Il joue un rôle essentiel dans la protection de la membrane par le maintien de la structure de l'Hb et celle des protéines du cytosquelette par réduction continue de la liaison disulfure, puisque l'oxydation du groupe $-SH$ membranaire entraîne une altération des propriétés micro-élastiques de la membrane sous stress oxydant physiologique et pathologique (Reglinski et al., 1988; Kalpravidh et al., 2013).

Le GSH diminue de manière significative en présence du TBHP dans les globules rouges normaux et thalassémiques. La diminution du GSH se produit lorsque le TBHP est métabolisé par la GSH peroxydase, responsable de la réduction du GSH au niveau des globules rouges normaux (Rohn et al., 1993). En outre, comme indiqué par Chen et al.(2000) , lorsque le système de défense menant à la réduction du GSSG (produit de l'oxydation du GSH par le TBHP) en GSH est submergé, le TBHP est capable de produire des radicaux libres et commencer la réaction en chaîne oxydative au niveau des globules rouges.

La réduction de GSSG en GSH par la glutathion réductase induit l'oxydation de NAD (P) H en NAD (P) + ; La perte de NAD (P) H cellulaire peut également être un événement important associé à la mort cellulaire par TBHP. Par ailleurs, l'interaction directe des radicaux t-butyl alkoxy formés par le TBHP en présence de métaux de transition (comme le fer dans les hématies thalassémiques), avec un acide gras insaturé membranaire déclenche la peroxydation des lipides et la destruction des membranes cellulaires (Chen et Stevens, 1991).

Nos résultats montrent une augmentation significative des taux du GSH de globules rouges normaux et thalassémiques pré-incubés avec le Cl-Cy et le Cl-Mlv à 100 µM traités ou pas avec du TBHP ou pas à un stress oxydant (TBHP). Nos résultats sont en accord avec ceux de Zhu et al. (2012) qui ont démontré que l'anthocyane C3G(cyanidin-3-O-β-glucoside) a pour effet d'activer la synthèse du GSH par le biais d'un nouveau mécanisme de défense antioxydant contre la production excessive des EOR. En outre, Petruk et al. (2017) ont indiqué que les fibroblastes pré-incubés avec la malvidine et la cyanidine dérivées du fruits d'açaï (*Euterpe oleracea Mart*) combattent le stress oxydant *in vitro* en augmentant les taux du GSH.

Les globules rouges normaux traités avec les anthocyanes Cl-Kcy, Syn16, Syn17 ne montrent aucune amélioration des teneurs en GSH ; néanmoins les Cl-Kcy et Syn17 améliorent les teneurs en GSH des globules rouges thalassémiques et assurent une protection contre la déplétion en GSH causée par TBHP au niveau des globules rouges normaux (200 et 100 µM), et thalassémiques, ce qui corrobore l'hypothèse de l'activité chélatrice de ces anthocyanes ; le fer catalyse la conversion du H₂O₂ en radicaux hydroxyles hautement réactifs, la présence des anthocyanes chélate le fer assurant ainsi une réduction du dommage oxydatif, avec une élévation du niveau de GSH et des antioxydants enzymatiques.

Concernant le deuxième modèle cellulaire étudié ; **les lymphocytes** :

Le suivi *in vitro* de la prolifération cellulaire est largement utilisé et est considéré comme l'une des techniques indispensables afin de déterminer la réponse immunitaire suite à l'exposition des cellules à différentes concentrations des micronutriments comme les anthocyanes.

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin, utilisant un gradient d'Histopaque afin de récolter des cellules qui sont par la suite mise en culture dans de l'RPMI contenant les nutriments nécessaires pour permettre la survie cellulaire. L'utilisation de la Concanavoline A (Con A), agent mitogène spécifique des lymphocytes T, permet d'activer seulement la prolifération des cellules T.

Nos résultats montrent une diminution significative de la prolifération lymphocytaire et des teneurs en GSH en faveur d'une consommation de cet antioxydant face au stress oxydant, ainsi qu'une augmentation concomitante significative des taux du MDA au niveau des lymphocytes incubés avec le TBHP, ce qui est en accord avec plusieurs travaux affirmant l'effet néfaste des EOR sur les lymphocytes en culture (Cemerski et al., 2003; Kasic et al., 2011).

En effet, le traitement des lymphocytes avec le TBHP induit l'activation de la caspase 3 à partir de précurseurs zymogènes inactifs, en commençant par l'événement apoptotique (Bellocco et al., 2016). Les caspases sont une famille de protéases de cystéine qui servent d'effecteurs

principaux lors de l'apoptose afin de démanteler de manière protéolytique la plupart des structures cellulaires, notamment le cytosquelette, les jonctions cellulaires, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le noyau (Taylor et al., 2008).

Il a été démontré que le TBHP induit un stress oxydant au niveau de différents systèmes, tel que le foie (Cawthon et al., 1999), les ovocytes (Tarín et al., 2002) et la rétine (Spector et al., 2002) et les lymphocytes (Akhtar et al., 2020). Il agit principalement par la formation du malondialdéhyde dans des conditions cytotoxiques entraînant la mort cellulaire. Les études suggèrent l'implication de la peroxydation des lipides cellulaires, l'alkylation de macromolécules cellulaires telles que les protéines et l'ADN (Hou et al., 2009), ainsi que des altérations des taux de calcium et de glutathion cellulaires (Guidarelli et al., 1997b). Les antioxydants alimentaires capables de piéger les radicaux libres sont d'un grand intérêt pour lutter contre les dommages cellulaires induits par le stress oxydant. Plusieurs études ont montré que les antioxydants préviennent la toxicité du TBHP, en inhibant la peroxydation des lipides et en augmentant les activités des enzymes antioxydantes (Tripathi et al., 2009; Sarkar et Sil, 2010).

Les anthocyanes sont également connus comme modificateurs des processus inflammatoires et comme composés dotés de propriétés antitumorales et antioxydantes (Wang et al., 1999 ; Thomasset et al., 2009 ; Dinda et al., 2016). Il a été démontré que les anthocyanes de cerisier de cornaline agissent en tant que modulateurs des processus immunitaires et présentent des propriétés antitumorales et antioxydantes (Wang et al., 1999 ; Seeram et Nair, 2002 ; Wang et al., 2006 ; Haghi et al., 2014) .

La supplémentation des lymphocytes soumis ou pas à un stress oxydant (TBHP) en anthocyanes augmente d'une manière significative le taux de prolifération lymphocytaire à l'exception de la Syn16 qui n'a pas d'effet notable et garde le taux de prolifération à des taux comparables au contrôles ; bien qu'elle stimule la prolifération des lymphocytes traités avec le TBHP. On a trouvé que le cyanidine-3-O-galactoside était capable de contrecarrer les effets cytotoxiques du TBHP, en diminuant ou en évitant complètement la mort cellulaire, la libération de LDH, l'activation de la caspase 3 et les dommages de l'ADN (Bellocco et al., 2016) .

Paixao et al. (2012) ont montré que la malvidine 3-O-glucoside (Mv3glc) offre une protection contre les effets délétères induits par une oxydation *in vitro* au niveau des cellules endothéliales due à sa capacité à piéger les EOR résultant de l'agression oxydative cellulaire par inhibition des cascades de signalisation mitochondrial .En effet, la Mv3glc a prouvé son efficacité dans

la prévention contre l'activation des caspases-3 et -9 , un événement impliqué dans la voie de la mort apoptotique à médiation mitochondriale. Ainsi, la capacité de la Mv3glc à interférer avec la cascade de signalisation intracellulaire apoptotique peut être étroitement liée à la protection des cellules de la perturbation mitochondriale.

Taverniti et al. (2014) ont prouvé qu'une fraction riche en anthocyanes préparée pour leur étude provenant du bleuet sauvage (*Vaccinium angustifolium*), dont les composés dominants étaient les Mv-glycosides (35% de la quantité totale d'anthocyanes), les Dp-glycosides (31%) et les Cy-glycosides (19 %), révèle avoir un potentiel immunomodulateur sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome épithélial colorectal humain :Caco-2; par ailleurs, Karlsen et al. (2007), ont trouvé qu'une supplémentation en extrait riche en anthocyanes (100µg mL⁻¹) isolés de myrtilles et de cassis modulaient *in vitro* les LPS (lipopolysaccharide) impliqués dans l'activation de NF-κB dans les monocytes; Kim et al. (2006) ont montré aussi que l'administration d'un extrait d'enveloppe de graine de soja (fournissant de 1 à 100 µg / L d'anthocyanes) inhibe de manière significative l'activation de NF-κB dans les cellules endothéliales.

Une diminution significative des teneurs en MDA est notée au niveau des lymphocytes supplémentés en Cl-Mlv, Syn13 et Syn16 à 25 µM, comparativement au contrôle. La Syn13 et la Syn 15 ont donné des résultats plus ou moins surprenant par rapport à ceux obtenus avec les érythrocytes ; où une diminution significative des teneurs en MDA des lymphocytes traités au TBHP a été relevée. Cet effet peut être dépendant de la concentration utilisée et confirme l'hypothèse selon laquelle la concentration adéquate des anthocyanes induit une diminution du stress oxydant. Narayan et al. (1999) ont trouvé qu'une anthocyane obtenue à partir d'une culture de cellules de carotte inhibe la peroxydation lipidique enzymatique et non enzymatique ; l'effet inhibiteur est dépendant de la concentration, et l'ajout d'anthocyanes réduit le niveau de formation de diènes conjugués suite à une peroxydation lipidique enzymatique d'acide linoléique en présence de lipoxygénase de soja, et réduit la formation du MDA résultant d'une peroxydation lipidique non enzymatique suite à l'exposition des microsomes du foie au Fe²⁺ + et à l'ascorbate.

Nos résultats concordent également avec ceux de Ke et al. (2011) montrant que la cyanidine-3-glucoside réduit la formation du MDA induite par l'éthanol dans les neurones obtenus à partir d'un modèle murin, et ceux de Lazze et al. (2003) qui ont testé l'effet protecteur des anthocyanes :Delphinidin (DP), delphinidin-3-glycoside (D3G), delphinidin-3-rutinoside (D3R), cyanidin (CY), cyanidin-3-glycoside (C3G), cyanidin-3-rutinoside (C3R) sur des

cellules musculaires lisses de rat (SMC), où toutes les anthocyanes étaient capables de protéger contre la peroxydation des lipides et la toxicité cellulaire induites par le TBHP.

Concernant le GSH une augmentation des teneurs en GSH a été notée au niveau des lymphocytes supplémentés en Cl-Kcy à 25 et 50 μ M, et de ceux supplémentés en Syn13 à 50 μ M et en Syn 17 à 25 et 50 μ M soumis à un stress oxydant (TBHP), tandis qu'aucune différence des teneurs en GSH n'est observée au niveau des lymphocytes supplémentés en Cl-Mlv soumis ou pas à un stress oxydant. Par ailleurs, les teneurs en GSH ont diminué au niveau des lymphocytes traités avec la Syn 15 soumis au TBHP.

L'étude de Ologundudu et al.(2010) a montré qu'une administration d'un extrait d'anthocyane d'Hibiscus sabdariffa chez des lapins intoxiqués par le DNPH, augmentait de manière significative la concentration de glutathion réduit dans le foie et le cerveau, réduisant ainsi l'accumulation de radicaux libres et diminuant le taux de peroxydation lipidique .

Par ailleurs, Lazze et al. (2003) qui ont testé dans leur étude l'effet d'une série d'anthocyanes sur le statut redox *in vitro*, ont trouvé que ces anthocyanes n'ont pas empêché la modification de l'état thiol-redox induit par la TBHP. L'absence de protection contre l'altération de l'état redox peut être attribuée à la distribution intracellulaire des anthocyanes. En fait, il avait déjà été démontré que la quantité d'anthocyanes incorporée dans le cytosol était considérablement plus faible que celle dans la membrane plasmique (Youdim et al., 2000).

Des études plus récentes montrent que l'activité antioxydante des flavonoïdes pourrait inverser une diminution du GSH induite par le TBHP(Krukoski et al., 2009; Li et al., 2015; Panat et al., 2016).

Cet effet tantôt stimulateur tantôt inhibiteur des anthocyanes sur les teneurs en GSH des lymphocytes humains, peut être expliqué par leurs principales caractéristiques dose et temps-dépendante (Sulaiman et Hussain, 2012) .

Conclusion

De plus en plus d'études montrent que les composés phytochimiques, bioactifs représentent beaucoup de privilèges pour le maintien de la santé humaine.

En effet, les antioxydants naturels ont toujours été considérés comme des agents thérapeutiques fiables.

L'utilisation d'antioxydants peut être extrêmement utile en pratique clinique pour la régulation du statut oxydant/antioxydant des patients atteints de pathologies dont le stress oxydant est le facteur déclenchant ou résultant et donc aggravant tel que la β thalassémie.

Notre étude a été menée afin d'évaluer les effets directs des anthocyanes testées sur le stress oxydant en particulier celui affectant les érythrocytes β -thalassémiques.

Ce travail nous a permis de mettre l'accent sur le potentiel antioxydant d'une classe très importante de flavonoïdes à savoir les anthocyanes en testant leurs effets sur deux lignées cellulaires (GR normaux / thalassémiques, et lymphocytes) soumis ou pas à un stress oxydant généré par un pro-oxydant en l'occurrence le TBHP.

Deux protocoles ont été établis pour estimer l'effet direct et l'effet protecteur des anthocyanes vis à vis des dommages générés expérimentalement par le TBHP.

En ce qui concerne l'effet direct, les résultats ont montré que la majorité des molécules étudiées exercent des effets bénéfiques dépendants de la concentration et du type cellulaire utilisés.

Les lymphocytes ainsi que les érythrocytes (normaux et thalassémiques) ont montré une sensibilité importante face au TBHP qui s'exprime par une lyse importante et un déséquilibre du statut Redox (augmentation du MDA et diminution du GSH).

Cependant, ces anomalies sont corrigées par l'ajout des anthocyanes testées à des degrés variables et d'une manière dépendante de la concentration (dose-dépendantes)

En effet, les résultats montrent que la majorité des anthocyanes testées se sont révélés efficaces face à la lyse induite par le TBHP aussi bien pour les globules rouges normaux et thalassémiques que pour les lymphocytes, elles ont aussi contribué à restituer la prolifération lymphocytaire. Il a été noté également que certaines (comme la cyanine par exemple) ont pu restaurer voire même améliorer le statut redox en augmentant les concentrations en GSH et diminuant le niveau du MDA.

Tous ces résultats sont certes prometteurs, cependant il faut mentionner que l'utilisation des antioxydants à des doses inadéquates à long terme peut s'avérer dangereux et engendrer des effets délétères.

De ce fait, leur usage dans le domaine thérapeutique nécessite des recherches plus approfondies avant de pouvoir les introduire comme molécules thérapeutiques approuvées

Bien que les méthodes utilisées *in vitro* aient permis l'observation des effets dû à l'exposition aux anthocyanes, elles ne renseignent cependant pas de façon rigoureuse sur le mécanisme d'action de ces substances ni sur la nature de leurs effets, de ce fait d'autres études notamment *in vivo* sont nécessaires afin d'explorer les cibles affectées, les doses adéquates

Il serait néanmoins souhaitable de continuer ce travail en variant d'avantage les doses des anthocyanes, en augmentant la durée d'exposition des cellules, et diversifier les modèles cellulaires utilisés.

- Additives E P o F, Food N S a t (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. *EFSA Journal* *11*, 3496.
- Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA assisted reproduction* *22*, 61.
- Advani R, Sorenson S, Shinar E, Lande W, Rachmilewitz E, Schrier S (1992). Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha-and beta-thalassemia. *Blood* *79*, 1058-1063.
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 4474-4479.
- Akash M S H, Rehman K, Chen S (2013). Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of cellular biochemistry* *114*, 525-531.
- Akhtar S, Najafzadeh M, Isreb M, Newton L, Gopalan R C, Anderson D (2020). ROS-induced oxidative damage in lymphocytes ex vivo/in vitro from healthy individuals and MGUS patients: protection by myricetin bulk and nanoforms. *Archives of Toxicology*, 1-11.
- Albertini M, Chibelli L, Ricciotti R, Fumelli C, Canestrari F, Galli F, Rovidati S, Bonanno E, Fumelli P (1996). Morphological alterations and increased resistance to hemolysis in t-butyl hydroperoxide incubated rbc from elderly subjects. *Archives of Gerontology and Geriatrics* *22*, 423-428.
- Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafarian A, Sajjadi S E, Hourfar H, Moayedi B (2006). Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from β -thalassemia major patients. *International immunopharmacology* *6*, 1305-1310.
- Almar M, Otero L, Santos C, Gallego J G (1998). Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *Journal of Environmental Science & Health Part B* *33*, 769-783.
- Altman S A, Zastawny T H, Randers L, Lin Z, Lumpkin J A, Remacle J, Dizdaroglu M, Rao G (1994). tert.-butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *306*, 35-44.
- Amer J, Goldfarb A, Fibach E (2003). Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *European journal of haematology* *70*, 84-90.

- Amini A M (2017). Effects of anthocyanins on the immune and cardiovascular system (University of Reading).
- Arlet J-B, Ribeil J-A, Guillem F, Negre O, Hazoume A, Marcion G, Beuzard Y, Dussiot M, Moura I C, Demarest S (2014). HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia. *Nature* 514, 242.
- Baker M A, He S (1991). Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. *Free Radical Biology and Medicine* 11, 563-572.
- Bao T, Li Y, Xie J, Sun C, Li X, Pu Y, Chen W (2018). Systematic evaluation of bioactive components and antioxidant capacity of some new and common bayberry cultivars using an in vitro gastrointestinal digestion method. *Food Research International* 103, 326-334.
- Bell D R, Gochenaur K (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology* 100, 1164-1170.
- Bellocco E, Barreca D, Laganà G, Calderaro A, El Lekhlifi Z, Chebaibi S, Smeriglio A, Trombetta D (2016). Cyanidin-3-O-galactoside in ripe pistachio (*Pistachia vera* L. variety Bronte) hulls: Identification and evaluation of its antioxidant and cytoprotective activities. *Journal of Functional Foods* 27, 376-385.
- Benso B, Franchin M, Massarioli A P, Paschoal J A R, Alencar S M, Franco G C N, Rosalen P L (2016). Anti-Inflammatory, Anti-osteoclastogenic and antioxidant effects of *Malva sylvestris* extract and fractions: In vitro and in vivo studies. *PloS one* 11, e0162728.
- Biswas T, Mathur A (2017). Plant Anthocyanins: Biosynthesis, Bioactivity and in vitro Production from tissue cultures.
- Borgna C, Galanello R (2004). Thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis.
- Bouamama S, Merzouk H, Medjdoub A, Merzouk-Saidi A, Merzouk S A (2017). Effects of exogenous vitamins A, C, and E and NADH supplementation on proliferation, cytokines release, and cell redox status of lymphocytes from healthy aged subjects. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 42, 579-587.
- Bowen-Forbes C S, Zhang Y, Nair M G (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis* 23, 554-560.
- Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* 28, 25-30.

- Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J (2005). Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A* 66, 78-84.
- Brouillard R (1982). Chemical structure of anthocyanins, Vol 1 (Academic Press: New York).
- Brown E J, Khodr H, HIDER C R, RICE-EVANS C A (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* 330, 1173-1178.
- Bruno-Franco M, Mazzei C (2004). The red blood cell membrane: Structure and functions. *Blood Transf* 2, 160-180.
- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel B L, Rechkemmer G (2003). Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *The Journal of nutritional biochemistry* 14, 90-98.
- Cadenas E (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 6, 391-397.
- Cao G, Sofic E, Prior R L (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 749-760.
- Cappellini M D, Poggiali E, Taher A T, Musallam K M, Weatherall, Rund, Cao, Taher, Taher, Eldor (2012). Hypercoagulability in β -thalassemia: a status quo. *Expert review of hematology* 5, 505-512.
- Cappellini M D, Tavazzi D, Duca L, Graziadei G, Mannu F, Turrini F, Arese P, Fiorelli G (1999). Metabolic indicators of oxidative stress correlate with haemichrome attachment to membrane, band 3 aggregation and erythrophagocytosis in β -thalassaemia intermedia. *British journal of haematology* 104, 504-512.
- Cassidy A, Bertoia M, Chiuve S, Flint A, Forman J, Rimm E B (2016). Habitual intake of anthocyanins and flavanones and risk of cardiovascular disease in men. *The American journal of clinical nutrition* 104, 587-594.
- Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández M E, Rodríguez J A, Galán-Vidal C A (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry* 113, 859-871.
- Cawthon D, McNew R, Beers K, Bottje W (1999). Evidence of mitochondrial dysfunction in broilers with pulmonary hypertension syndrome (ascites): Effect of t-butyl hydroperoxide on hepatic mitochondrial function, glutathione, and related thiols. *Poultry science* 78, 114-124.
- Cemerski S, van Meerwijk J P, Romagnoli P (2003). Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *European journal of immunology* 33, 2178-2185.

- Chan A C, Chow C K, Chiu D (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222, 274-282.
- Chandrasekaran A, Idelchik M d P S, Melendez J A (2017). Redox control of senescence and age-related disease. *Redox biology* 11, 91-102.
- Charif N, Mokhtari-Soulimane N, Cherrak S, Merzouk H, Elhabiri.M (2020). Protective Effect of Natural and Synthetic Anthocyanins against Tert-butyl-hydroperoxide-induced Oxidative Damages in Normal and β -thalassemic Major Human Erythrocytes In Vitro. *Current Nutrition & Food Science*, 2020, 16, 1-10
- Chen H-W, Chiang M-T, Wang C-Y, Lii C-K (2000). Inhibition of tert-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by α -tocopherol and glutathione. *Food and chemical toxicology* 38, 1089-1096.
- Chen Q, Stevens J L (1991). Inhibition of iodoacetamide and t-butylhydroperoxide toxicity in LLC-PK1 cells by antioxidants: a role for lipid peroxidation in alkylation induced cytotoxicity. *Archives of biochemistry and biophysics* 284, 422-430.
- Chen W, Su H, Xu Y, Bao T, Zheng X (2016). Protective effect of wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb.) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 196, 943-952.
- Cherrak S A, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H, Elhabiri M (2016). In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLoS One* 11, e0165575.
- Chinese Nutrition Society (2013). Chinese DRIs handbook. Beijing (China): Standards Press of China.
- Çimen M B (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica chimica acta* 390, 1-11.
- Clemens M R, Remmer H, Waller H D (1984). Phenylhydrazine-induced lipid peroxidation of red blood cells in vitro and in vivo: monitoring by the production of volatile hydrocarbons. *Biochemical pharmacology* 33, 1715-1718.
- Clemens M R, Ruess M, Bursa Z, Waller H D (1987). The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation. *Free radical research communications* 3, 265-271.
- Colantuoni A, Bertuglia S, Magistretti M, Donato L (1991). Effects of *Vaccinium Myrtillus* anthocyanosides on arterial vasomotion. *Arzneimittel-Forschung* 41, 905-909.

- Coleman J B, Gilfor D, Farber J L (1989). Dissociation of the accumulation of single-strand breaks in DNA from the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Molecular pharmacology* 36, 193-200.
- Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L (2002). Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 568-576.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J P, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck A J, Berghe D V (1998). Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products* 61, 71-76.
- Crossley M, Orkin S H (1993). Regulation of the β -globin locus. *Current opinion in genetics & development* 3, 232-237.
- Cyboran-Mikołajczyk S, Solarska-Ściuk K, Mieszala K, Glatzel-Plucińska N, Matczak K, Kleszczyńska H (2019). The Impact of O-Glycosylation on Cyanidin Interaction with RBCs and HMEC-1 Cells—Structure–Activity Relationships. *International journal of molecular sciences* 20, 1928.
- De Franceschi L, Bertoldi M, Matte A, Santos Franco S, Pantaleo A, Ferru E, Turrini F (2013). Oxidative stress and-thalassemic erythroid cells behind the molecular defect. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013.
- 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.
- Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi M L, Vincenzini M T (2017). Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 14, 209.
- dos Santos N M, Batista P B, Batista Â G, Júnior M R M (2019). Current evidence on cognitive improvement and neuroprotection promoted by anthocyanins. *Current opinion in food science*.
- Draper, H. & Hadley, M. (1990) [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*, 186, 421-431.
- Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.
- Drummond N J, Davies N O, Lovett J E, Miller M R, Cook G, Becker T, Becker C G, McPhail D B, Kunath T (2017). A synthetic cell permeable antioxidant protects neurons against acute oxidative stress. *Scientific Reports* 7, 11857.

- Elhabiri M, Figueiredo P, Toki K, Brouillard R (1997). Anthocyanin–aluminium and–gallium complexes in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 355-362.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, 70-77.
- Eun-Sun Y, Hyun-Jung M, Hee-Yeon W, Jeong-Ho H (2008). Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN γ suppression by quercetin in T helper cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences Ewha Womans University 19*, 18-26.
- Farzaei M H, El-Senduny F F, Momtaz S, Parvizi F, Iranpanah A, Tewari D, Naseri R, Abdolghaffari A H, Rezaei N (2018). An update on dietary consideration in inflammatory bowel disease: anthocyanins and more. *Expert review of gastroenterology & hepatology 12*, 1007-1024.
- Feng R, Lu Y, Bowman L L, Qian Y, Castranova V, Ding M (2005). Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry 280*, 27888-27895.
- Fernández J, García L, Monte J, Villar C J, Lombó F (2018). Functional anthocyanin-rich sausages diminish colorectal cancer in an animal model and reduce pro-inflammatory bacteria in the intestinal microbiota. *Genes 9*, 133.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugerini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters 416*, 123-129.
- Ferru E, Giger K, Pantaleo A, Campanella E, Grey J, Ritchie K, Vono R, Turrini F, Low P S (2011). Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood 117*, 5998-6006.
- Fessas P, Loukopoulos D, Kaltsoya A (1966). Peptide analysis of the inclusions of erythroid cells in β -thalassemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 124*, 430-432.
- Fibach E, Rachmilewitz E (2008). The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current molecular medicine 8*, 609-619.
- Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L (2011). Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Current medicinal chemistry 18*, 3871-3888.
- Forman H J (2016). Redox signaling: an evolution from free radicals to aging. *Free Radical Biology and Medicine 97*, 398-407.

- Fraga C G, Tappel A L (1988). Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochemical Journal* 252, 893-896.
- Fukumoto L, Mazza G (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 3597-3604.
- Gabrielska J, Oszmiański J (2005). Antioxidant activity of anthocyanin glycoside derivatives evaluated by the inhibition of liposome oxidation. *Zeitschrift für Naturforschung C* 60, 399-407.
- Gajski G, Domijan A-M, Žegura B, Štern A, Gerić M, Jovanović I N, Vrhovac I, Madunić J, Breljak D, Filipič M (2016). Melittin induced cytogenetic damage, oxidative stress and changes in gene expression in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicon* 110, 56-67.
- Galanello R, Origa R (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases* 5, 11.
- Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Battistini N C, Tavazzi B, Galvano G (2004). Cyanidins: metabolism and biological properties. *The Journal of nutritional biochemistry* 15, 2-11.
- Garcia-Alonso M, Minihane A-M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo J C, de Pascual-Teresa S (2009). anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *The Journal of nutritional biochemistry* 20, 521-529.
- García-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo J C, de Pascual-Teresa S (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins a studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 3378-3384.
- Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M (2018). Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. *Antioxidants* 7, 62.
- González-Gallego J, García-Mediavilla M V, Sánchez-Campos S, Tuñón M J (2018). Anti-inflammatory, Immunomodulatory, and Prebiotic Properties of Dietary Flavonoids. In *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease* (Elsevier), pp. 327-345.
- Gowd V, Jia Z, Chen W (2017). Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes—A review of recent advances. *Trends in Food Science & Technology* 68, 1-13.
- Grinberg L N, Newmark H, Kitrossky N, Rahamim E, Chevion M, Rachmilewitz E A (1997). Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochemical Pharmacology* 54, 973-978.
- Grinberg L N, Rachmilewitz E A, Newmark H (1994). Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochemical pharmacology* 48, 643-649.

- Guidarelli A, Cattabeni F, Cantoni O (1997a). Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breakage. *Free radical research* 26, 537-547.
- Guidarelli A, Clementi E, Sciorati C, Cattabeni F, Cantoni O (1997b). Calcium-dependent mitochondrial formation of species mediating DNA single strand breakage in U937 cells exposed to sublethal concentrations of tert-butylhydroperoxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 66-74.
- Gutteridge J M, Halliwell B (2010). Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications* 393, 561-564.
- Haidar R, Mhaidli H, Taher A T (2010). Paraspinal extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia intermedia. *European Spine Journal* 19, 871-878.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège* 62, 628-638.
- Halliwell B (2007). Flavonoids: a re-run of the carotenoids story. Paper presented at: Novartis Found Symp (Wiley Online Library).
- Halliwell B (2011). Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends in pharmacological sciences* 32, 125-130.
- Halliwell B, Gutteridge J (1999). Free radicals, other reactive species and disease. *Free radicals in biology and medicine* 3, 617-783.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation* 2007.
- Han X, Shen T, Lou H (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 950-988.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 16, 845-850.
- 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.
- Hertog M G, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of internal medicine* 155, 381-386.

- 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.
- Hou D-X (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current molecular medicine* 3, 149-159.
- Hou D-X, Kai K, Li J-J, Lin S, Terahara N, Wakamatsu M, Fujii M, Young M R, Colburn N (2004). Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure–activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25, 29-36.
- Hou D-X, Tong X, Terahara N, Luo D, Fujii M (2005). Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Archives of biochemistry and biophysics* 440, 101-109.
- Hou M-H, Lu W-J, Huang C-Y, Fan R-J, Yuann J-M P (2009). Effects of polyamines on the DNA-reactive properties of dimeric mithramycin complexed with cobalt (II): implications for anticancer therapy. *Biochemistry* 48, 4691-4698.
- Huang W, Zhu Y, Li C, Sui Z, Min W (2016). Effect of blueberry anthocyanins malvidin and glycosides on the antioxidant properties in endothelial cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016.
- Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, Patton S, Malinski T (1998). Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia–reperfusion injury: an experimental study. *British Journal of Surgery* 85, 1080-1085.
- Hussain L, Ikram J, Rehman K, Tariq M, Ibrahim M, Akash M S H (2014). Hepatoprotective effects of *Malva sylvestris* L. against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Turkish Journal of Biology* 38, 396-402.
- Hwang J-M, Tseng T-H, Hsieh Y-S, Chou F-P, Wang C J, Chu C-Y (1996). Inhibitory effect of atracylon on tert-butyl hydroperoxide induced DNA damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes. *Archives of toxicology* 70, 640-644.
- Jin R, Bao H, Bai Y, Li X (2011). Theoretical study on the antioxidant activity of alizarin, purpurin, and pseudopurpurin. In *Interdisciplinary research and applications in bioinformatics, computational biology, and environmental sciences* (IGI Global), pp. 130-140.
- Jomova K, Valko M (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65-87.

- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H (2005). Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxidants & redox signaling* 7, 395-403.
- Kähkönen M P, Hopia A I, Vuorela H J, Rauha J-P, Pihlaja K, Kujala T S, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 3954-3962.
- Kalpravidh R W, Tangjaidee T, Hatairaktham S, Charoensakdi R, Panichkul N, Siritanaratkul N, Fucharoen S (2013). Glutathione redox system in β -Thalassemia/Hb E patients. *The Scientific World Journal* 2013.
- Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Paur I, Kjølrsrud-Bøhn S, Sandvik L, Blomhoff R (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *The Journal of nutrition* 137, 1951-1954.
- Kasic T, Colombo P, Soldani C, Wang C M, Miranda E, Roncalli M, Bronte V, Viola A (2011). Modulation of human T-cell functions by reactive nitrogen species. *European journal of immunology* 41, 1843-1849.
- Katsuzaki H, Hibasami H, Ohwaki S, Ishikawa K, Imai K, Kimura Y, Komiya T (2003). Cyanidin 3-O- β -D-glucoside isolated from skin of black Glycine max and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncology reports* 10, 297-300.
- Ke Z, Liu Y, Wang X, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower K A, Frank J A, Ou X, Shi X (2011). Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain. *Journal of neuroscience research* 89, 1676-1684.
- Kehrer J P (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.
- Kehrer J P, Klotz L-O (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical reviews in toxicology* 45, 765-798.
- Kesarwani P, Murali A K, Al-Khami A A, Mehrotra S (2013). Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 18, 1497-1534.
- Keshk W A, Hablas N M, Esheba N E S, Abd Elsalam S A (2019). Crosstalk between cytokine profile, redox, and iron status in β -Thalassemia: relation to frequency/duration of blood transfusion. *Pediatric hematology and oncology* 36, 151-160.

- Khoo H E, Lim S M, Azlan A (2019). Evidence-Based Therapeutic Effects of Anthocyanins from Foods. *Pak J Nutr* 18, 1-11.
- Kim B H, Cho S M, Reddy A M, Kim Y S, Min K R, Kim Y (2005). Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor- κ B-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Biochemical pharmacology* 69, 1577-1583.
- Kim H J, Tsoy I, Park J M, Chung J I, Shin S C, Chang K C (2006). Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. *FEBS letters* 580, 1391-1397.
- Kim H K, Cheon B S, Kim Y H, Kim S Y, Kim H P (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochemical pharmacology* 58, 759-765.
- Kim J-A, Kang Y S, Kim Y O, Lee S H, Lee Y S (1998). Role of Ca²⁺ influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cellse. *Experimental & molecular medicine* 30, 137.
- Kondo K, Kurihara M, Miyata N, Suzuki T, Toyoda M (1999). Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362, 79-86.
- Kong J-M, Chia L-S, Goh N-K, Chia T-F, Brouillard R (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923-933.
- Koonyosying P, Kongkarnka S, Uthaipibull C, Svasti S, Fucharoen S, Srichairatanakool S (2018). Green tea extract modulates oxidative tissue injury in beta-thalassemic mice by chelation of redox iron and inhibition of lipid peroxidation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108, 1694-1702.
- Koonyosying P, Tantiworawit A, Hantrakool S, Utama-Ang N, Cresswell M, Fucharoen S, Porter J B, Srichairatanakool S (2020). Consumption of a green tea extract–curcumin drink decreases blood urea nitrogen and redox iron in β -thalassemia patients. *Food & Function* 11, 932-943.
- Korkina L G, Afanas' Ev I B (1996). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. In *Advances in pharmacology* (Elsevier), pp. 151-163.
- Krukoski D W, Comar S R, Claro L M, Leonart M S S, do Nascimento A J (2009). Effect of vitamin C, deferoxamine, quercetin and rutin against tert-butyl hydroperoxide oxidative damage in human erythrocytes. *Hematology* 14, 168-172.

- Laguette M, Lecomte J, Villeneuve P (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research* 46, 244-282.
- Lazze M, Pizzala R, Savio M, Stivala L, Prosperi E, Bianchi L (2003). Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 535, 103-115.
- Lazzè M C, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi A I, Stivala L A, Bianchi L (2004). Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 25, 1427-1433.
- Lee Y-M, Yoon Y, Yoon H, Park H-M, Song S, Yeum K-J (2017). Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients* 9, 1089.
- Leecharoenkiat A, Wannatung T, Litanatudom P, Svasti S, Fucharoen S, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Smith D R (2011). Increased oxidative metabolism is associated with erythroid precursor expansion in β 0-thalassaemia/Hb E disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 47, 143-157.
- Lehoux S (2006). Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovascular research* 71, 269-279.
- Leroy-Viard K, Rouyer-Fessard P, Sauvage C, Scott M, Beuzard Y (1992). Modèles expérimentaux de β -Thalassémie.
- Li Y, Zhang H, Lu G (2015). The protective effect of procyanidin on tert-butyl hydroperoxide induced human hepatocyte HL7702 cell injury. *Animal Cells and Systems* 19, 425-431.
- Lila M A (2004). Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *BioMed Research International* 2004, 306-313.
- Livrea M, Tesoriere L, Pintauro A, Calabrese A, Maggio A, Freisleben H, D'arpa D, D'anna R, Bongiorno A (1996). Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood* 88, 3608-3614.
- Lopez-Lazaro M (2002). Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 2, 691-714.
- Loréal O, Island M-L, Holmström P, Fatih N, Deugnier Y, Brissot P (2008). Hepcidine et son impact en pathologie. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive* 15, 275-283.
- Lotito S B, Frei B (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine* 41, 1727-1746.

- Lv H, Liu Q, Zhou J, Tan G, Deng X, Ci X (2017). Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Free Radical Biology and Medicine* 106, 38-52.
- Ma Y, Ding S, Fei Y, Liu G, Jang H, Fang J (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control* 106, 106712.
- Mannu F, Arese P, Cappellini M D, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, Turrini F (1995). Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood* 86, 2014-2020.
- Marengo-Rowe A J (2006). Structure-function relations of human hemoglobins. Paper presented at: Baylor University Medical Center Proceedings (Taylor & Francis).
- Marouane W, Soussi A, Murat J-C, Bezzine S, El Feki A (2011). The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. *Lipids in health and disease* 10, 65.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry* 16, 577-586.
- Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M (2003). Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry* 11, 1995-2000.
- Mazewski C, Liang K, de Mejia E G (2017). Inhibitory potential of anthocyanin-rich purple and red corn extracts on human colorectal cancer cell proliferation in vitro. *Journal of Functional Foods* 34, 254-265.
- Mazza G, Miniati E (1993). *Small fruits* (CRC Press: Boca Raton, FL), pp. 85-129.
- Mazzoni L, Giampieri F, Suarez J M A, Gasparrini M, Mezzetti B, Hernandez T Y F, Battino M A (2019). Isolation of strawberry anthocyanin-rich fractions and their mechanisms of action against murine breast cancer cell lines. *Food & Function* 10, 7103-7120.
- Melo D, Rocha S, Coimbra S, Silva A S (2019). Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane. In *Erythrocyte* (IntechOpen).
- MERAOU A (2017). Effets des vitamines (C, E), du NADH et des acides gras sur la prolifération lymphocytaire, la sécrétion des cytokines et le statut redox chez les patients atteints de maladies métaboliques.
- Meraou A, Merzouk H, Saidi A, Medjdoub A, Merzouk S A, Belbraouet S (2016). Vitamins C, E, and NADH on in vitro lymphocyte proliferation and Redox Status among obese patients. *Food and Nutrition Sciences* 7, 1082-1098.

- Mirzaei A, Abbasi M, Sepehri S, Mirzaei M (2013). The Effects of *Allium porrum* and *Medicago sativa* on Iron Concentration in Thalassemia Serums. *Life Sci J* 10, 27-31.
- Molyneux P (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26, 211-219.
- Mpiana P T, Lombe B K, Ombeni A M, Tshibangu D S, Wimba L K, Tshilanda D D, Mushagalusa F K, Muyisa S K (2013). In vitro Sickling Inhibitory Effects and Anti-sickle Erythrocytes Hemolysis of *Dicliptera colorata* CB Clarke, *Euphorbia hirta* L. and *Sorghum bicolor* (L.) Moench.
- Nakaishi H, Matsumoto H, Tominaga S, Hirayama M (2000). Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Alternative Medicine Review* 5, 553-562.
- Narayan M, Naidu K A, Ravishankar G, Srinivas L, Venkataraman L (1999). Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 60, 1-4.
- Nasseri E, Mohammadi E, Tamaddoni A, Qujeq D, Zayeri F, Zand H (2017). Benefits of curcumin supplementation on antioxidant status in β -Thalassemia major patients: A double-blind randomized controlled clinical trial. *Annals of Nutrition and Metabolism* 71, 136-144.
- Ndiaye A, Chouani B, Sidibé M, Kabbali N, Sqalli T (2015). Spectre étiologique des hyperferritinémies en hémodialyse chronique. *Néphrologie & Thérapeutique* 11, 309-310.
- Nerland D E (2007). The antioxidant/electrophile response element motif. *Drug metabolism reviews* 39, 235-248.
- Neto P F T, Gonçalves R P, Elias D B D, Araújo C P d, Magalhães H I F (2011). Analysis of oxidative status and biochemical parameters in adult patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea, Ceará, Brazil. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 33, 207-210.
- Nienhuis A W, Nathan D G (2012). Pathophysiology and clinical manifestations of the β -thalassemias. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a011726.
- 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.
- Nogueira C W, Zeni G, Rocha J B (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical reviews* 104, 6255-6286.
- Obermüller-Jevic U C, Francz P I, Frank J, Flaccus A, Biesalski H K (1999). Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by β -carotene in human skin fibroblasts. *FEBS letters* 460, 212-216.

- Offord E A, Gautier J-C, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Krämer K, Applegate L A (2002). Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosisic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1293-1303.
- Oikonomidou P R, Rivella S (2017). What can we learn from ineffective erythropoiesis in thalassemia? *Blood reviews*.
- Okawa M, Kinjo J, Nohara T, ONO M (2001). DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 24, 1202-1205.
- Ologundudu A, Ologundudu A, Oluba O, Omotuyi I, Obi F (2010). Effect of Hibiscus sabdariffa anthocyanins on 2, 4-dinitrophenylhydrazine-induced tissue damage in rabbits. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 2, 1-6.
- Olszanecki R, Gebaska A, Kozlovski V, Gryglewski R (2002). Key words: flavonoids, nitric oxide synthase, macrophages. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53, 571-584.
- Ozturk L, Mansour B, Yuksel M, Yalcin A S, Celikogbrevelu F, Gokhan N (2003). Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clinica Chimica Acta* 332, 83-88.
- Pagano M, Faggio C (2015). The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell biochemistry and function* 33, 351-355.
- Panat N A, Maurya D K, Ghaskadbi S S, Sandur S K (2016). Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. *Food chemistry* 194, 32-45.
- Pandey K B, Rizvi S I (2011). Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 155.
- Pantaleo A, Giribaldi G, Mannu F, Arese P, Turrini F (2008). Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmunity reviews* 7, 457-462.
- Papakotsi V (2018). The Effect of Wild Blueberry Anthocyanins and Phenolic Acids on Innate Immunity: The Compliment System.
- Paredes-López O, Cervantes-Ceja M L, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plant foods for human nutrition* 65, 299-308.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta* 333, 19-39.

- Pavlova L, Savov V, Petkov H, Charova I (2007). Oxidative stress in patients with beta-thalassemia major. *Prilozi* 28, 145-154.
- Pecorini S, Gibellini L, De Biasi S, Bianchini E, Nasi M, Cossarizza A, Pinti M (2020). Mitochondria, Oxidative Stress, Cancer, and Aging. *Geriatric Oncology*, 183-204.
- Peiffer D S, Wang L-S, Zimmerman N P, Ransom B W, Carmella S G, Kuo C-T, Chen J-H, Oshima K, Huang Y-W, Hecht S S (2016). Dietary consumption of black raspberries or their anthocyanin constituents alters innate immune cell trafficking in esophageal cancer. *Cancer immunology research* 4, 72-82.
- Peluso I, Palmery M (2015). Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 71, 102-107.
- 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.
- Petruk G, Illiano A, Del Giudice R, Raiola A, Amoresano A, Rigano M M, Piccoli R, Monti D M (2017). Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 172, 42-51.
- Pietta P-G (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 63, 1035-1042.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes C J, Valko M (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences* 38, 592-607.
- Prior R (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: potential health effects (CRC Press: Boca Raton, FL), pp. 1-19.
- Prior R L, Cao G (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *HortScience* 35, 588-592.
- Prior R L, Wu X (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free radical research* 40, 1014-1028.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513-523.
- Prudente A S, Sponchiado G, Mendes D A, Soley B S, Cabrini D A, Otuki M F (2017). Pre-clinical efficacy assessment of *Malva sylvestris* on chronic skin inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93, 852-860.
- Quintana-Cabrera R, Bolaños J P (2013). Glutathione and γ -glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria (Portland Press Limited).

- Rachmilewitz E A, WEIZER-STERN O, Adamsky K, Amariglio N, Rechavi G, Breda L, Rivella S, Cabantchik Z I (2005). Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1054, 118-123.
- Rechner A R, Kroner C (2005). Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis research* 116, 327-334.
- Reglinski J, Hoey S, Smith W E, Sturrock R (1988). Cellular response to oxidative stress at sulfhydryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry* 263, 12360-12366.
- Ribeil J-A, Arlet J-B, Dussiot M, Cruz Moura I, Courtois G, Hermine O (2013). Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *The Scientific World Journal* 2013.
- Rice-Evans C, Baysal E, Pashby D P, Hochstein P (1985). t-Butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 815, 426-432.
- Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* 20, 933-956.
- Rivella S (2012). The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood reviews* 26, S12-S15.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by ...polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta* 412, 410-424.
- Rohn T T, Hinds T R, Vincenzi F F (1993). Inhibition of the Ca pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: importance of glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1153, 67-76.
- Romanello K S, Teixeira K K, Silva J P M, Nagamatsu S T, Bezerra M A C, Domingos I F, Martins D A, Araujo A S, Lanaro C, Breyer C A (2018). Global analysis of erythroid cells redox status reveals the involvement of Prdx1 and Prdx2 in the severity of beta thalassemia. *PloS one* 13.
- Ross J A, Kasum C M (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of Nutrition* 22, 19-34.
- Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovese T, Morabito D, Dugo G, Sautebin L, Caputi A P (2003). Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free radical research* 37, 891-900.
- Roy A, Sil P C (2012). Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: Protection by taurine. *Pathophysiology* 19, 137-148.

- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman B A (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26066-26075.
- Sadrzadeh S, Graf E, Panter S S, Hallaway P, Eaton J (1984). Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *Journal of Biological Chemistry* 259, 14354-14356.
- Saithong T, Thilavech T, Adisakwattana S (2018). Cyanidin-3-rutinoside reduces insulin fibrillation and attenuates insulin fibrils-induced oxidative hemolysis of human erythrocytes. *International journal of biological macromolecules* 113, 259-268.
- Salisbury D, Bronas U (2015). Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nursing research* 64, 53-66.
- Sandström B E (1991). Induction and rejoining of DNA single-strand breaks in relation to cellular growth in human cells exposed to three hydroperoxides at 0 C and 37 C. *Free radical research communications* 15, 79-89.
- Sangkitikomol W, Tencomnao T, Rocejanasaroj A (2010). Antioxidant effects of anthocyanins-rich extract from black sticky rice on human erythrocytes and mononuclear leukocytes. *African journal of biotechnology* 9, 8222-8229.
- Santangelo F (2003). [General Articles] Intracellular Thiol Concentration Modulating Inflammatory Response: Influence on the Regulation of Cell Functions Through Cysteine Prodrug Approach. *Current medicinal chemistry* 10, 2599-2610.
- Sarkar M K, Sil P C (2010). Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, *Phyllanthus niruri*. *Toxicology in Vitro* 24, 1711-1719.
- Sarma A D, Sreelakshmi Y, Sharma R (1997). Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry* 45, 671-674.
- Scarabelli T M, Mariotto S, Abdel-Azeim S, Shoji K, Darra E, Stephanou A, Chen-Scarabelli C, Marechal J D, Knight R, Ciampa A (2009). Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury. *FEBS letters* 583, 531-541.
- Scarano A, Butelli E, De Santis S, Cavalcanti E, Hill L, De Angelis M, Giovinazzo G, Chieppa M, Martin C, Santino A (2018). Combined dietary anthocyanins, flavonols, and stilbenoids alleviate inflammatory bowel disease symptoms in mice. *Frontiers in nutrition* 4, 75.

- Senchenkova E Y, Skvertchinskaya E, Dobrylko I, Sudnitsyna J, Gambaryan S, Mindukshev I, Gavins F (2017). Experimental oxidative stress-induced death of erythrocytes. *The FASEB Journal* 31, 1b761-1b761.
- Shen D, Dalton T P, Nebert D W, Shertzer H G (2005). Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25305-25312.
- Shinar E, Rachmilewitz E, Lux S (1989). Differing erythrocyte membrane skeletal protein defects in alpha and beta thalassemia. *The Journal of clinical investigation* 83, 404-410.
- Sigurdson G, Atnip A, Bomser J, Giusti M (2018). Aglycone structures and glycosylations affect anthocyanin transport and uptake in human gastric epithelial (NCI-N87) cells. *Journal of Food Composition and Analysis* 65, 33-39.
- Sivamaruthi B S, Kesika P, Subasankari K, Chaiyasut C (2018). Beneficial effects of anthocyanins against diabetes mellitus associated consequences-A mini review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 8, 471.
- Sleiman N, Daher C (2009). *Malva sylvestris* water extract: a potential anti-inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. *Planta Medica* 75, PH10.
- Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytotherapy Research* 30, 1265-1286.
- Spector A, Ma W, Sun F, Li D, Kleiman N J (2002). The effect of H₂O₂ and tertiary butyl hydroperoxide upon a murine immortal lens epithelial cell line, α TN4-1. *Experimental eye research* 75, 573-582.
- Sterling M (2001). Got anthocyanins? *Nutrition Science News*, 1-6.
- Sulaiman A A, Hussain S A (2012). Concentration and time dependent cytoprotective effects of anthocyanins against oxidative hemolysis induced by water and lipid soluble free radical initiators: an in vitro study. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* 1, 133-140.
- Surh Y-J (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 3, 768.
- Taher A T, Musallam K M, Saliba A N, Graziadei G, Cappellini M D (2015). Hemoglobin level and morbidity in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood cells, molecules & diseases* 55, 108.
- Taher A T, Weatherall D J, Cappellini M D (2018). Thalassaemia. *The Lancet* 391, 155-167.
- Tanno T, Bhanu N V, Oneal P A, Goh S-H, Staker P, Lee Y T, Moroney J W, Reed C H, Luban N L, Wang R-H (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nature medicine* 13, 1096.

- Tarín J, Perez-Albala S, García-Pérez M, Cano A (2002). Effect of dietary supplementation with a mixture of Vitamins C and E on fertilization of tertiary butyl hydroperoxide-treated oocytes and parthenogenetic activation in the mouse. *Theriogenology* 57, 869-881.
- Taverniti V, Fracassetti D, Del Bo' C, Lanti C, Minuzzo M, Klimis-Zacas D, Riso P, Guglielmetti S (2014). Immunomodulatory effect of a wild blueberry anthocyanin-rich extract in human Caco-2 intestinal cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 8346-8351.
- Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Gentile C, Livrea M (2006). Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in β -thalassemia red blood cells. *Free radical research* 40, 753-761.
- Thein S L (1999). Is it Dominantly inherited β thalassaemia or just a β -chain variant that is highly unstable? *British journal of haematology* 107, 12-21.
- Toptas B, Baykal A, Yesilipek A, Isbir M, Kupesiz A, Yalcin O, Baskurt O (2006). L-carnitine deficiency and red blood cell mechanical impairment in β -thalassemia major. *Clinical hemorheology and microcirculation* 35, 349-357.
- Toufektsian M-C, De Lorgeril M, Nagy N, Salen P, Donati M B, Giordano L, Mock H-P, Peterek S, Matros A, Petroni K (2008). Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *The Journal of nutrition* 138, 747-752.
- Tripathi M, Singh B K, Kakkar P (2009). Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Food and chemical toxicology* 47, 339-347.
- Trotta R J, Sullivan S G, Stern A (1982). Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Effects of the hexose monophosphate shunt as mediated by glutathione and ascorbate. *Biochemical Journal* 204, 405.
- Tsai T C, Huang H P, Chang K T, Wang C J, Chang Y C (2017). Anthocyanins from roselle extract arrest cell cycle G2/M phase transition via ATM/Chk pathway in p53-deficient leukemia HL-60 cells. *Environmental toxicology* 32, 1290-1304.
- Ullah M F, Shamim U, Hanif S, Azmi A S, Hadi S M (2009). Cellular DNA breakage by soy isoflavone genistein and its methylated structural analogue biochanin A. *Molecular nutrition & food research* 53, 1376-1385.
- Umeki S (1994). Mechanisms for the activation/electron transfer of neutrophil NADPH-oxidase complex and molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Annals of hematology* 68, 267-277.

- 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.
- Valenza A, Bonfanti C, Pasini M E, Bellosta P (2018). Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Drosophila Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. *BioMed research international* 2018.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.
- Vanacker S A, Tromp M N, Haenen G R, Vandervijgh W, Bast A (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and biophysical research communications* 214, 755-759.
- Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M (2015). Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox biology* 6, 226-239.
- Wallace T C, Slavin M, Frankenfeld C L (2016). Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients* 8, 32.
- Wang C-J, Wang J-M, Lin W-L, Chu C-Y, Chou F-P, Tseng T-H (2000). Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 38, 411-416.
- Wang H, Cao G, Prior R L (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry* 45, 304-309.
- Wang L-S, Stoner G D (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters* 269, 281-290.
- Wang S Y, Feng R, Bowman L, Penhallegon R, Ding M, Lu Y (2005). Antioxidant activity in lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.) and its inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor- κ B, and mitogen-activated protein kinases activation. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 3156-3166.
- Weatherall D, Clegg J B (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization* 79, 704-712.
- Weatherall D, Williams T, Allen S, O'Donnell A (2010). The population genetics and dynamics of the thalasseмии. *Hematology/Oncology Clinics* 24, 1021-1031.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel M D, Daniel H (2000). Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer research* 60, 3823-3831.

- Whipple G H, Bradford W L (1936). Mediterranean disease-thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley): associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *The Journal of Pediatrics* 9, 279-311.
- Williamson G (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition bulletin* 42, 226-235.
- Wu P, Nielsen T E, Clausen M H (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences* 36, 422-439.
- Wu T, Yang L, Guo X, Zhang M, Liu R, Sui W (2018). Raspberry anthocyanin consumption prevents diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and modulating hepatic lipid metabolism. *Food & function* 9, 2112-2120.
- Xie L, Su H, Sun C, Zheng X, Chen W (2018). Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science & Technology* 72, 13-24.
- Yeh S-L, Wang W-Y, Huang C-H, Hu M-L (2005). Pro-oxidative effect of β -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 16, 729-735.
- Youdim K A, Martin A, Joseph J A (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress¹. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 51-60.
- Zheng Y, Wang C Y, Wang S Y, Zheng W (2003). Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7162-7169.
- Zhu W, Jia Q, Wang Y, Zhang Y, Xia M (2012). The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 2, 314-327.
- Zohra S F, Meriem B, Samira S, Muneer M A (2012). Phytochemical screening and identification of some compounds from mallow. *J Nat Prod Plant Resour* 2, 512-516.

Résumé : Bien que la β thalassémie majeure soit une hémoglobinoopathie génétique caractérisée par un défaut de production de la chaîne de la β -globine, le stress oxydant joue un rôle majeur dans sa physiopathologie. Cela soulève la possibilité d'utiliser des antioxydants pour prévenir les altérations oxydatives au cours de cette pathologie. Les anthocyanes semblent jouer un rôle important dans la prévention de nombreuses pathologies humaines grâce à leurs propriétés antioxydantes.

La vulnérabilité de deux lignés cellulaires (GR normaux / thalassémiques, et lymphocytes) humains au stress oxydatif induit par le tert-butyl-hydroperoxyde (TBHP) et leur protection par deux séries d'anthocyanes (naturelles et synthétiques) font l'objet de ce travail. Des érythrocytes de sujets normaux et de patient β -thalassémiques et des lymphocytes de sujets normaux et ont été prélevés et traités *in vitro* avec du TBHP dans des conditions standardisées. Deux protocoles ont été utilisés afin d'apprécier l'effet direct et l'effet protecteur des anthocyanes vis à vis des dommages générés expérimentalement par le TBHP. La viabilité cellulaire, la formation de MDA et les niveaux de GSH ont été mesurés avant et après le traitement avec les anthocyanes. L'activité antiradicalaire DPPH des anthocyanes a également été mesurée.

Nos résultats révèlent que la majorité des anthocyanes testées exercent des effets bénéfiques dépendants de la concentration et du type cellulaire utilisés. En effet, les lymphocytes ainsi que les GR (normaux/thalassémiques) ont montré une sensibilité importante face au TBHP. Par ailleurs, il a été noté que ces anomalies ont été corrigées par les anthocyanes testées à des degrés variables et d'une manière dépendante de la concentration (dose-dépendante)

La supplémentation en anthocyanes peut constituer une approche supplémentaire pour réduire la gravité des troubles dans lesquels les radicaux libres et le stress oxydant sont des facteurs importants

Mots clés : anthocyane, *in vitro*, β -thalassémie , statut redox, GSH, MDA.

Abstract: Although β thalassemia major is a genetic hemoglobinopathy characterized by a defect in the production of the β -globin chain, oxidative stress plays a major role in its pathophysiology. This raises the possibility of using antioxidants to prevent oxidative damage during this pathology. Anthocyanins seem to play an important role in the prevention of many human pathologies due to their antioxidant properties.

The vulnerability of two human cell lines (normal/thalassemic RBCs and lymphocytes) to oxidative stress induced by tert-butyl-hydroperoxide (TBHP) and their protection by two series of anthocyanins (natural and synthetic) are the subject of this work. Red blood cells from normal subjects and patient β -thalassemics and lymphocytes from normal subjects were collected and treated *in vitro* with TBHP under standardised conditions. Two protocols were used in order to assess the direct effect and the protective effect of anthocyanins against the experimentally generated damage of TBHP. Cell viability, MDA formation and GSH levels were measured before and after treatment with anthocyanins. The DPPH antiradical activity of anthocyanins was also measured.

Our results show that the majority of the tested anthocyanins exert beneficial effects depending on the concentration and cell type used. Indeed, lymphocytes as well as RBCs (normal/thalassemic) showed a significant sensitivity to TBHP. Furthermore, it was noted that these abnormalities were corrected by tested anthocyanins with Varying degrees and in a concentration-dependent (dose-dependent) manner.

Anthocyanin supplementation may be an additional approach to reduce the severity of disorders in which free radicals and oxidative stress are important factors

Key words: anthocyanin, *in vitro*, β -thalassemia, redox status, GSH, MDA.

ملخص على الرغم من أن β التلاسيميا الكبرى هي اعتلال هيموغلوبيني وراثي ناتج عن خلل في إنتاج سلسلة β غلوبين إلا أن الاجهاد التأكسدي يلعب دورا كبيرا في الفيزيولوجيا المرضية له. هذا يثير إمكانية استخدام مضادات الأكسدة لمنع التغيرات التأكسدية خلال هذا المرض. يبدو أن الأنثوسيانين تلعب دوراً مهماً في الوقاية من العديد من الأمراض البشرية بفضل خصائصها المضادة للأكسدة

ضعف خطين من الخلايا البشرية (كريات الدم الحمراء العادية / التلاسيميا، والخلايا الليمفاوية) أمام للإجهاد التأكسدي الناتج عن TBHP وحمايتهم بسلسلتين من الأنثوسيانين (الطبيعية والأصطناعية) هي موضوع هذا البحث. تم أخذ كريات الدم الحمراء من اشخاص اصحاء و مصابين ب- β التلاسيميا والخلايا الليمفاوية من الأشخاص اصحاء ومعالجتها بواسطة TBHP في ظل ظروف موحدة. تم استخدام بروتوكولين لتقييم التأثير المباشر والتأثير الوقائي للأنثوسيانين مقابل الأضرار الناتجة تجريبيا عن طريق TBHP معدل قابلية الحياة الخلوي، وتشكيل MDA ومستويات GSH تم قياسها قبل وبعد العلاج بالأنثوسيانين. كما تم قياس النشاط المضاد للجذور الحرة DPPH للأنثوسيانين تظهر نتائجنا أن غالبية الأنثوسيانين التي تم اختبارها لها آثار مفيدة اعتماداً على التركيز ونوع الخلية المستخدمة. في الواقع، أظهرت الخلايا الليمفاوية وكذلك كريات الدم الحمراء (طبيعية / β التلاسيميا) حساسية كبيرة لـ TBHP كما لوحظ أن هذه الحساسية تم تصحيحها بواسطة الأنثوسيانين التي تم اختبارها بدرجات متفاوتة وبطريقة تعتمد على تركيز الأنثوسيانين قد تشكل مكملات الأنثوسيانين نهجاً إضافياً لتقليل شدة الاضطرابات المرضية التي تشكل فيها الجذور الحرة والإجهاد التأكسدي عوامل مهمة

كلمات مفتاحية : GSH، MDA، حالة الأكسدة، أنثوسيانين، β التلاسيميا