



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة عمّار ثليجي بالأغواط

Université Amar Telidji Laghouat

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم علوم المادة

Département des Sciences de la Matière



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique appliquée

Par :

DEMANA Khadidja

THEME

**Etude de la relation structure-activité antioxydante
des flavonoïdes par l'inhibition
de la xanthine oxydase**

Soutenu publiquement le devant le jury composé de :

M ^r . Mohamed YOUSFI	Professeur	Président
M ^{me} . Hadjer BOUSSOUSSA	MAA	Examinatrice
M ^{elle} . Aicha HAMDI	MAA	Examinatrice
M ^r . Amar DJERIDANE	MCA	Rapporteur

Année Universitaire 2015/2016

Dédicaces

*EN GUISE DE RECONNAISSANCE, JE
Dédie CE TRAVAIL*

*À MES CHÈRES PARENTS, à MA
FAMILLE*

AINSI Qu'à TOUS MES AMIS.

*A TOUS LES PERSONNES QUI ONT
PARTICIPE A L'ELABORATION DE CE
TRAVAIL*

DEMANA KHADIDJA

Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier mon Dieu qui m'a donné le courage pour terminer ce modeste travail.

Ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat sous la direction, du professeur YOUSFI Mohamed, que m'a beaucoup aidé dans mes études. Son écoute et ses conseils m'ont permis de cibler mes candidatures et de trouver ce mémoire me correspondait totalement. Mes sincères remerciements s'adressent à monsieur Emile M.Gaydou (équipe phytochimie, marseille France) pour leurs aides et pour donner les flavonoïdes synthétiques utilisés dans ce travail.

Je tiens à remercier vivement mon directeur de mémoire, le docteur DJERIDANE Amar pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail. Il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de ce mémoire. Grâce aussi à sa confiance, j'ai pu m'accomplir totalement dans mes recherches avec son aide précieuse dans les moments les plus délicats.

Je tiens à remercier mademoiselle MAHFOUDI Reguia pour les conseils qu'ils ont sus me prodiguer au cours de ce mémoire.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci aussi pour mes enseignements, qu'ils ont travaillé avec nous pendant les années du cursus universitaire.

Liste Des Notations

μM	:	Micromolaire
A_C	:	Absorbance en absence de l'inhibiteur
A_E	:	Absorbance en présence de l'inhibiteur
COX	:	Cyclooxygénase
Da	:	Dalton
DMSO	:	Diméthyle sulfoxyde
DPPH	:	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
EC_{50}	:	Concentration d'efficacité nécessaire pour inhiber 50% de l'oxydation
ERO	:	Espèce réactives de l'oxygène
FAD	:	Flavine adénine dinucléotide
[I]	:	Concentration de l'inhibiteur
K_m	:	Constante de Michaëlis-Menten
K_i	:	Constante d'inhibition
LOX	:	Lipooxygénase
Mo	:	Molybdène
nm	:	Nanomètre
$\text{OH}\cdot$:	Radical d'hydroxyle
$\text{O}_2\cdot$:	Radical superoxyde
PAR	:	Pourcentage antiradicalaire
[S]	:	Concentration du substrat
UV-Vis	:	Ultraviolet-Visible
V_{max}	:	La vitesse maximale
X	:	Xanthine
XO	:	Xanthine oxydase

Liste Des Figures

Figure 1	: Structure de base des flavonoïdes et squelette flavonoïdique le plus fréquent.	01
Figure 2	: La transformation de l'hypoxanthine et la xanthine par la XO en acide urique.	03
Figure 3	: La structure cristalline de la xanthine oxydase du lait de bovin.	03
Figure 4	: Structure chimique du radical libre DPPH•	06
Figure 5	: Pourcentage antiradicalaire en fonction de différentes concentrations croissantes de la vitamine C dans le test du DPPH.	08
Figure 6	: Pourcentage antiradicalaire en fonction des concentrations croissantes de chaque flavonoïde dans le test du DPPH.	09
Figure 7	: Courbe d'étalonnage de l'acide urique.	13
Figure 8	: Courbe de la cinétique enzymatique de XO.	13
Figure 9	: Représentation de Lineweaver-Burk de XO (sans inhibiteur).	14
Figure 10	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Quercétine.	15
Figure 11	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de l'Apigénine.	15
Figure 12	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de Kaempférol.	16
Figure 13	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Chrysin.	16
Figure 14	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Tectochrysin.	17
Figure 15	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Fisétine.	17
Figure 16	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Tricétine.	18
Figure 17	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de Dihydroxy5,7-triméthoxy 3',4',5' flavone.	18
Figure 18	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de Patrole.	19
Figure 19	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de l'Ermanine.	19
Figure 20	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Trihydroxy3',4',5' flavone.	20
Figure 21	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Lutéoline.	20
Figure 22	: Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la 2'-Méthoxyflavone.	20
Figure 23	: Corrélation entre K_i et EC_{50} des flavonoïdes étudiés.	23

Liste Des Tableaux

Tableau 1	: Les flavonoïdes synthétiques étudiés.	04
Tableau 2	: Réactifs chimiques utilisés.	05
Tableau 3	: Les valeurs d'EC ₅₀ des différents flavonoïdes et la vitamine C mesurés par le test du DPPH	10
Tableau 4	: Constante et type d'inhibition des différents flavonoïdes sur la XO.	21

ملخص

تعتبر المركبات المضادة للأكسدة موضوع دراسات عديدة، لأنها بالإضافة إلى استخدامها كمواد حافظة في الأغذية عن طريق استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية، فإنها تستعمل في علاج العديد من الأمراض.

قمنا في هذا العمل بدراسة العلاقة بين البنية و الفعالية المضادة للأكسدة لثلاثة عشر فلافونويدا، و ذلك بتقدير نشاطها التثبيطي لانزيم كزونتين اوكسيداز (xanthine oxydase) و فاعليتها المضادة لجذور DPPH.

بينت قيم EC_{50} (0.0076 الى 10.47 غ/ل) المتحصل عليها في اختبار DPPH ان الفلافونويدات المدروسة عبارة عن مضادات اكسدة جيدة. كذلك تبين ان الفعالية المضادة للجذور مرتبطة بعدد و موضع و طبيعة المستبدلات الموجودة في الحلقتين B و C . لذا، مكننا هذا الاختبار من معرفة المعايير البنوية الاساسية للفلافونويدات من اجل الحصول على فعالية جيدة مضادة للجذور و هي : وجود وظيفة هيدروكسيلية (OH) في المواضع (3،5،7،3'،4'،5') و غياب وظيفة ميثوكسي ($O-CH_3$) .

اظهرت نتائج اختبار التثبيط الانزيمي ان جميع الفلافونويدات المدروسة تمثل مثبطات جيدة لـ XO. بين كذلك هذا الاختبار ان الفعالية المضادة للجذور هي عامل مهم بالنسبة لعملية التثبيط الانزيمي و ذلك بالنسبة للفلافونات. اما بالنسبة للفلافونولات فهناك علاقة عكسية بين النشاط التثبيطي و الفعالية المضادة للجذور.

اثبتت هذه الدراسة العلاقة بين البنية و الفعالية المضادة للأكسدة للفلافونويدات المدروسة، و لكن يستحسن دراسة هذه العلاقة بأدوات النمذجة الجزيئية من اجل فهمها اكثر.

الكلمات المفتاح: كزونتين اوكسيداز، DPPH، النشاط المضاد للأكسدة، الفلافونويدات.

Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de la relation structure-activité antioxydante de treize flavonoïdes synthétisés par la mesure de leur pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase et leurs capacités de piéger le radical libre DPPH.

Dans le test du DPPH, les valeurs des EC_{50} obtenues (0,0076 à 10,47 g/l) dévoilent que ces flavonoïdes sont de bons agents antioxydants. De plus, l'activité antiradicalaire est dépendant du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C des flavonoïdes. De ce fait, nous avons constaté que critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire de ces flavonoïdes sont : La présence du groupe OH en position 3, 5, 7, 3',4'et 5' et l'absence du groupe O-CH₃.

Les résultats du test d'inhibition enzymatique ont montré que tous les flavonoïdes étudiés sont de bons inhibiteurs de XO avec des constantes d'inhibition de l'ordre micromolaire. Egalement, nous avons constaté que l'activité antiradicalaire est un facteur important pour le bon processus d'inhibition de XO pour les flavones. Mais, inversement pour les flavonols.

Cette étude confirme la relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes étudiés, mais il serait également nécessaire de pouvoir mieux comprendre cette relation par l'utilisation des approches de modélisation moléculaire.

Mots clés : Xanthine oxydase, DPPH., Activité antioxydante, Flavonoïdes.

Abstract

The antioxidants are the subject of many studies, because in addition to their use as preservatives in food products by replacing the synthetic antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases.

We have studied in this work the relationship structure- antioxidant activity of thirteen flavonoids by measuring their ability to inhibit xanthine oxidase enzyme and reduce DPPH free radical.

In the DPPH assay, the obtained values of EC_{50} (0.0076 to 10.47 g/l) reveal that these flavonoids are good antioxidants. In addition, the anti-radical activity is dependent of the number, position and nature of substituents on B and C rings of flavonoids. Thus, we have established that essential structural requirements for good scavenging activity of these flavonoids are: the presence of the OH group in position 3, 5, 7, 3', 4' and 5' and the absence of the O-CH₃.

The results of the enzyme inhibition assay, showed that all studied flavonoids are good inhibitors of XO with inhibition constants in the micromolar range. Also, we have found that the anti-radical activity is a significant factor for the good XO inhibition process of flavones.

This study confirms the structure-antioxidant activity relationship of the studied flavonoids, but it would also be necessary to better understand this relationship by using molecular modeling approaches.

Keywords: Xanthine oxidase, DPPH. Antioxidant activity, Flavonoids.

Sommaire

Liste des notations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction générale	01
II. Matériel et méthodes	03
II.1. Matériel et produits chimiques	03
II.1.1. La xanthine oxydase	03
II.1.2. Les flavonoides étudiés	04
II.1.3. Réactifs chimiques	05
II.2. Méthodes	05
II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante	05
II.2.2.a. Test du piégeage du radical libre DPPH	06
II.2.3.b. Test de l'inhibition de xanthine oxydase	07
III. Résultats et discussion	08
III.1. Test du piégeage du radical libre DPPH	08
III.2. Test d'inhibition de xanthine oxydase	12
IV. Conclusion générale	24
V. Références Bibliographiques	25

I. Introduction générale

Les antioxydants synthétiques comme les flavonoïdes sont généralement préparés au laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques. Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle. Depuis 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de toxicité. Les antioxydants Synthétiques ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes, mais de nombreux constituants naturels des aliments n'ont pas encore été testés (Pelli, 2003).

Les flavonoïdes constituent un groupe de produits naturels appartenant à la famille des polyphénols. Structuralement, les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B (Figure 1). Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols (Oka, 1972).



Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes et squelette flavonoïdique le plus fréquent.

Les flavonoïdes se sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002).

Ces dernières années plusieurs recherches ont mis en évidence l'activité antioxydante des flavonoïdes. Ce sont des composés avec une activité antioxydante prononcée. Les flavonoïdes

expriment les propriétés antioxydantes par : le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux hydroxyles (OH[•]), et superoxydes (O₂^{•-}), la suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production et la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme. En revanche, les flavonoïdes jouent parfois un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène (**Laughton, 1989**).

De multiples systèmes enzymatiques sont responsables de la production d'ERO. Ces enzymes incluent la xanthine oxydase (notées XO), les cyclooxygénases (notées COX), les Lipooxygénases (notées LOX). Or, les flavonoïdes ont été décrits comme des inhibiteurs efficaces de ces enzymes. Ainsi, ils permettent de combattre le stress oxydant en régulant la quantité d'ERO. Certains flavonoïdes jouent un rôle très important dans l'inhibition de l'enzyme xanthine oxydase (**Freddy, 2013**).

La xanthine oxydase (XO) est une molybdoflavoenzyme qui a été identifiée par Schardinger en 1902 (**Schardinger, 1902**). Sa structure cristalline représentée dans la figure 3 a été déterminée en 2000 par Enroth et coll. (**Enroth, 2000**). Elle est obtenue par une transformation protéolytique de la xanthine déshydrogénase. En effet, on distingue deux types de xanthine oxydase dans les cellules, l'une la xanthine déshydrogénase (XD) et l'autre, la xanthine oxydase (XO), les deux enzymes étant interconvertibles. La xanthine oxydase peut avoir plusieurs origines (**Bray, 1975; Waud, 1976**) dont la plus simple est celle obtenue par la purification du lait des bovins (**Massey, 1997**).

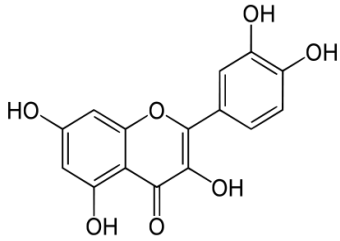
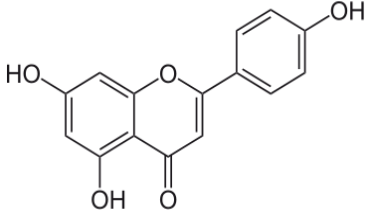
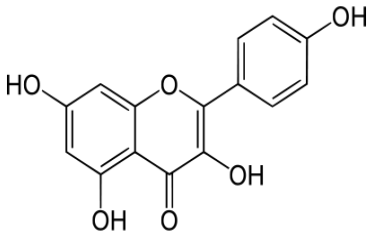
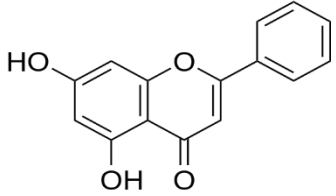
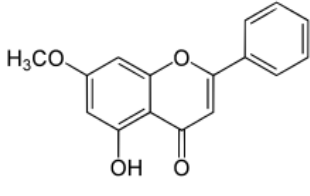
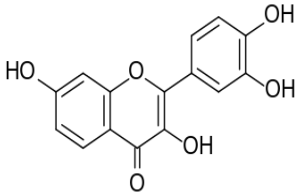
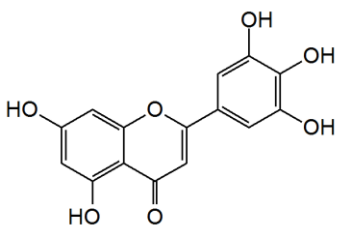
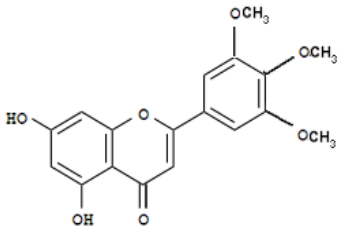
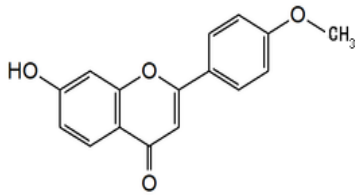
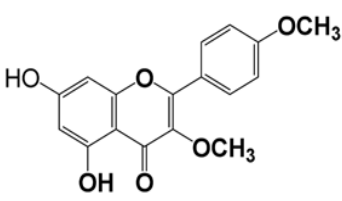
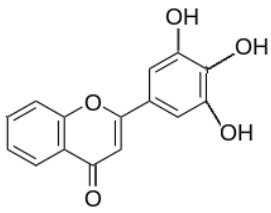
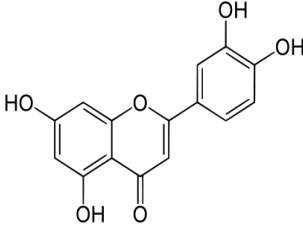
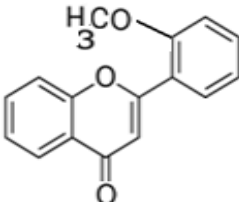
Depuis que **McCord et Fridovich (1968)** ont montré que la XO est une source de génération des radicaux libres, de nombreuses études ont été réalisées et montré son implication dans plusieurs pathologies telles que l'infection virale (**Akaike, 1990**), l'inflammation (**Blake, 1997**), les tumeurs de cerveau (**Kokoglu, 1990**), les problèmes cardiovasculaires (**Griendling, 2000**) et dans le processus de l'ischémie-reperfusion (**Granger, 1986**).

C'est dans ce contexte que nous avons souhaité d'étudier la relation structure-activité antioxydante de treize flavonoïdes synthétisés, par la mesure de leur pouvoir d'inhibition de la xanthine oxydase et leurs capacités de piéger le radical libre DPPH.

II.1.2. Les Flavonoïdes étudiés

Les flavonoïdes synthétiques étudiés proviennent de deux familles différentes : Flavonol et Flavone (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Les flavonoïdes synthétiques étudiés.

 <p>1) Quercétine (Flavonol)</p>	 <p>2) Apigénine (Flavone)</p>	 <p>3) Kaempférol (Flavonol)</p>
 <p>4) Chrysine (Flavone)</p>	 <p>5) Tectochrysine (Flavone)</p>	 <p>6) Fisétine (Flavonol)</p>
 <p>7) Tricétine (Flavone)</p>	 <p>8) Dihydroxy 5,7 triméthoxy 3',4',5' flavone (flavone)</p>	 <p>9) Pratol (Flavone)</p>
 <p>10) Ermanine (Flavonol)</p>	 <p>11) Trihydroxy 3',4',5' flavone (Flavone)</p>	 <p>12) Lutéoline (Flavone)</p>
 <p>13) 2'Méthoxyflavone (Flavone)</p>		

II.1.3. Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Réactifs chimiques utilisés.

Produits	Marque
Acide chlorhydrique (37%), Hydroxyde de sodium, Phosphate de sodium ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$). Acide Urique ($C_5H_4N_4O_3$). Xanthine (X) ($C_5H_4N_4O_2$). DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).	SIGMA-ALDRICH
Diméthyle sulfoxide (C_2H_6OS) (99%). Dihydrogénophosphate de sodium ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$).	BIOCHEM
Hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) (31%).	CHEMINOVA
Vitamine C.	Prolabo

II.2. Méthodes

II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : l'inhibition de la Xanthine oxydase et le piégeage du radical libre DPPH (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (**Georgieva, 2010**). Dans ce travail nous avons utilisé deux méthodes chimiques *in vitro* : le test DPPH et l'inhibition de l'enzyme XO.

II.2.1.a. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres (**Figure 4**) utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand, 1995**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Popovici, 2009**).

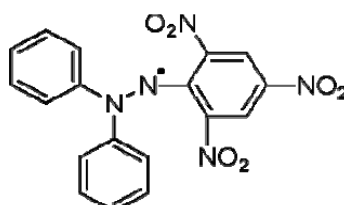


Figure 4 : Structure chimique du radical libre DPPH• (**Popovici, 2009**).

En présence de capteurs de radicaux libres, le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette vire au jaune (**Cuendet, 1997 ; Burits, 2000**). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration de ce radical à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des flavonoïdes ont été incubés avec 1450 µl d'une solution méthanolique de DPPH (60µM). Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu 1800), où le contrôle négatif est constitué par la solution DPPH sans flavonoïdes. Les résultats obtenus pour chaque flavonoïde testé ainsi la vitamine C ont été exprimés par le paramètre EC₅₀. Ce paramètre, qui détermine la concentration efficace pour réduire 50% de la concentration totale du DPPH initialement introduite, a été calculée à partir de l'équation qui donne le pourcentage d'efficacité (antiradicalaire) en fonction de la concentration de l'inhibiteur (**Cuendet, 1997; Burits, 2000**).

Le pourcentage antiradicalaire (PAR %) du radical DPPH par les flavonoïdes a été calculé à l'aide de la relation suivante:

$$\text{PAR \%} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

A_E : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon).

II.2.2.b. Test de l'inhibition de la xanthine oxydase

L'activité totale de la XO a été estimée en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 294 nm, en présence de la xanthine comme substrat de l'enzyme.

➤ Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide urique

En vue d'étudier l'activité enzymatique de XO sur la xanthine comme substrat, nous avons dosé l'acide urique lors de la transformation de ce substrat. Pour se faire, une courbe d'étalonnage de l'acide urique doit être préalablement établie.

À partir d'une solution mère de l'acide urique de concentration massique 0,05g/l préparée dans le NaOH à 0,05M., une gamme de dilution a été préparée (0,001-0,008g/l). Les solutions ont été incubés dans un bain marie pendant 40 minutes à 37°C, puis la densité optique a été mesurée immédiatement à 294 nm contre un blanc. Les valeurs de densité optique ainsi obtenues, nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide urique.

➤ Etude de la cinétique enzymatique de XO avec et sans inhibiteurs

L'effet inhibiteur des flavonoïdes sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de l'acide urique produit par oxydation de la xanthine (Robak, 1988 ; Boumerfeg, 2009).

Les mesures d'inhibition ont été réalisées pour 5 concentrations différentes de xanthine dissous dans un tampon phosphaté de sodium saturé on air ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,2M, pH 7,8), en présence de plusieurs concentrations de chaque flavonoïde (préparées dans le DMSO) (Robak, 1988 ; Boumerfeg, 2009). Après ajout de la XO (0,15g/l), le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 40 minutes, puis les mesures de densité optique ont été effectuées immédiatement à 294 nm dans un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu 1800).

L'activité enzymatique de XO est exprimée en μM de produit formé par minute. La vitesse initiale (v_0) de la réaction enzymatique déterminée pour des concentrations variables en flavonoïde, nous a permis de tracer les représentations graphiques de Lineweaver-Burk ($1/v_0 = f(1/[S]_0)$). A partir de ces tracés, on a pu déterminer alors le type d'inhibition et la constante d'inhibition (k_i) en présence de chaque flavonoïde.

III. Résultats et discussion

L'activité antioxydante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. En pratique, plusieurs essais *in vitro* procédures sont menés pour évaluer les activités antioxydantes avec les échantillons d'intérêt. Un autre aspect est qu'antioxydant des modèles de test varient dans les différents points de vue. Par conséquent, il est difficile pour comparer une méthode entièrement à autre. Dans une certaine mesure, la comparaison entre différentes méthodes *in vitro* a été effectuée par plusieurs auteurs (**Badarinath, 2010 ; Nur alam, 2013**). Or, dans notre travail, l'activité antioxydante des flavonoïdes a été évaluée *in vitro* par deux méthodes différentes : la méthode de réduction du radical libre DPPH et l'inhibition de la xanthine oxydase.

III.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

Les potentiels antioxydants des différents flavonoïdes sont exprimés par un paramètre appelée EC_{50} . Plus la valeur de l' EC_{50} est faible, plus le potentiel antioxydant des flavonoïdes est fort. Cette valeur est déterminée graphiquement à partir d'une courbe linéaire représentant le pourcentage antiradicalaire en fonction des concentrations croissantes de la vitamine C (**Figure 5**) et des flavonoïdes (**Figures 6**).

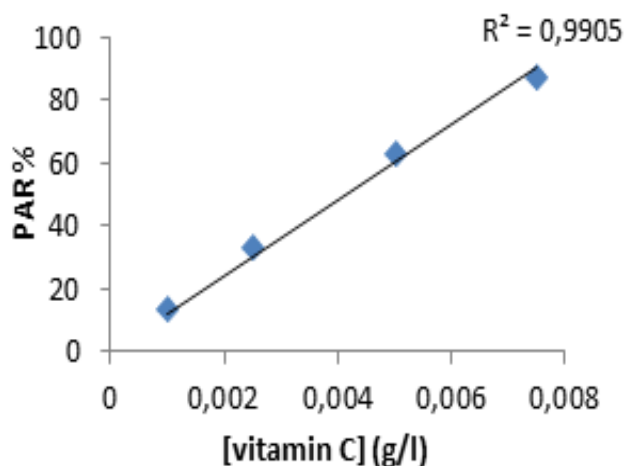


Figure 5 : Pourcentage antiradicalaire en fonction de différentes concentrations croissantes de la vitamine C dans le test du DPPH.

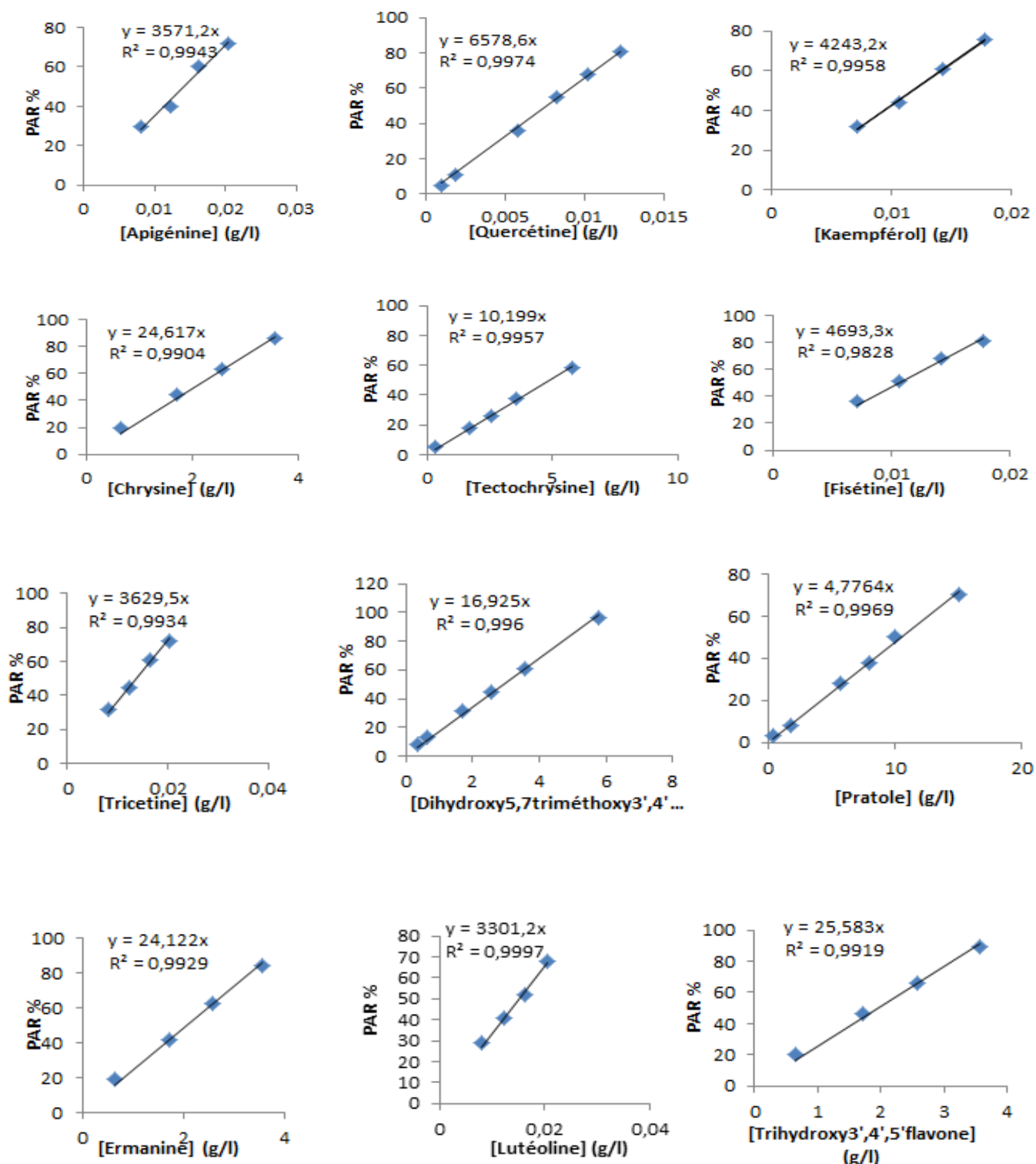


Figure 6 : Pourcentage antiradicalaire en fonction des concentrations croissantes de chaque flavonoïde dans le test du DPPH.

Nous avons pris une moyenne d'EC₅₀ calculée à partir de deux tests séparés pour chaque flavonoïde. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 3**. La valeur d'EC₅₀ obtenue pour chaque flavonoïde a été comparée à celle de la vitamine C.

Tableau 3 : Les valeurs d'EC₅₀ des différents flavonoïdes et la vitamine C mesurés par le test du DPPH.

Flavonoïde	EC ₅₀ (g/l)
2'Methoxyflavone	/
Quercétine	0,0076 ±...
Kaempférol	0,0110 ±...
Fisétine	0,0109 ±0,0010
Apigénine	0,0145 ±...
Lutéoline	0,0143 ±0,0003
Tricetine	0,0139 ±0,0009
Trihydroxy3',4',5' flavone	1,9546 ±0,0002
Chrysine	2,0316 ±...
Ermanine	2,0792 ±...
Dihydroxy5,7triméthoxy3',4',5' flavone	2,9550 ±...
Tectochrysine	4,5871 ±...
Pratol	10,4690 ±...
Vitamine C	0,0041±00

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes : (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ; (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (**Nanjo, 1996**). Dans le cas des composés phénoliques (Φ-OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH.

La capacité antiradicalaire ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (**Molyneux, 2004**).

D'après les résultats mentionnés dans le **Tableau 3** tous les flavonoïdes présentent des valeurs d'EC₅₀ supérieures à la valeur de substance de référence qui a montré une activité antioxydante puissante avec une EC₅₀ de l'ordre de 4,1 mg/l.

Parmi les flavonoïdes étudiés (Quercétine, Fisétine, Kaempférol, Tricétine, Lutéoline, Apigénine, Trihydroxy3',4',5' flavone) représentent les flavonoïdes les plus actifs avec des valeurs d'EC₅₀ de l'ordre de (0,0076g/l, 0,0109g/l, 0,0110g/l, 0,0139g/l, 0,0143g/l, 0,0145g/l, 1,9546g/l) respectivement. Alors que le Patrole possède une très faible activité (EC₅₀ = 10,4690g/l) (**Tableau 3**). De plus, les flavonols investigués montrent des capacités antioxydantes plus importantes que celle observées pour les flavones.

Notre étude confirme également une certaine corrélation entre le nombre des groupes hydroxyle sur le squelette flavonoïdique et l'activité antiradicalaire. Des études sur la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur des radicaux libres ont montré que l'activité antiradicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, métoxylés, glycosylés) et le degré de polymérisation (**Nanjo, 1996**). Ces mêmes paramètres sont liés également à la polarité des composés. Il y a une information contradictoire à propos du degré jusqu'au quel la polymérisation a un effet positif sur l'activité antiradicalaire. Des résultats comparatifs montrent que l'activité antioxydante croît à un degré de polymérisation faible, inférieur à 3 (**Iacopini, 2008**).

Ces résultats sont en accord avec les études établies entre la structure des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux DPPH (**Heim, 2002**). En effet, de nombreuses études convergent pour proposer que l'activité dépende essentiellement de trois critères à savoir, la présence d'un groupe catéchol sur le cycle B (3', 4' -OH), la double liaison C₂-C₃ conjuguée avec la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3-OH (**Heim, 2002**).

Les groupes 2' -OH, 3' -OH, 4' -OH, 5-OH et 7-OH caractérisent les flavonols. Alors, la capacité de ces groupes hydroxyles à donner un atome d'hydrogène peut expliquer l'activité

antioxydante des flavonol étudiés dans notre travail. La délocalisation des électrons pouvant exister d'une part entre le cycle A et le groupe 8-oxo, et d'autre part entre le cycle B et le groupe 7'-oxo, peut également participer à la capacité des flavonols à piéger les radicaux DPPH.

Les résultats obtenus à travers ce screening antioxydant ont révélé que les critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes sont :

- ✓ La présence du groupe OH en position 3, 5 et 7 ;
- ✓ La présence du groupe OH dans le cycle B en position 3',4'et 5' ;
- ✓ L'absence du groupe O-CH₃.

III.2. Test d'inhibition de la xanthine oxydase

Pour mesurer la capacité antioxydante des flavonoïdes (à piéger les radicaux superoxydes), nous avons utilisé le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase comme générateur de ces radicaux. Donc, soit les molécules étudiées piègent directement le radical O₂^{•-} formé, soit elles inhibent la xanthine oxydase (XO), réduisant ainsi sa capacité à produire les radicaux superoxydes. Un autre produit de cette réaction enzymatique est l'acide urique caractérisé par une longueur d'onde d'absorption à 294 nm, cet acide nous a permis d'évaluer l'aptitude des flavonoïdes à inhiber la XO. Moins il s'en forme, plus l'inhibition est importante, indépendamment du piégeage direct.

La cinétique de XO est basée sur la courbe d'étalonnage de l'acide urique (**Figure 7**). Nous avons pu déterminer les concentrations de l'acide urique libéré dans le milieu réactionnel pour des différentes concentrations de xanthine. Les valeurs obtenues des concentrations, nous ont permis de tracer la courbe de la cinétique de l'enzyme (**Figure 8**).

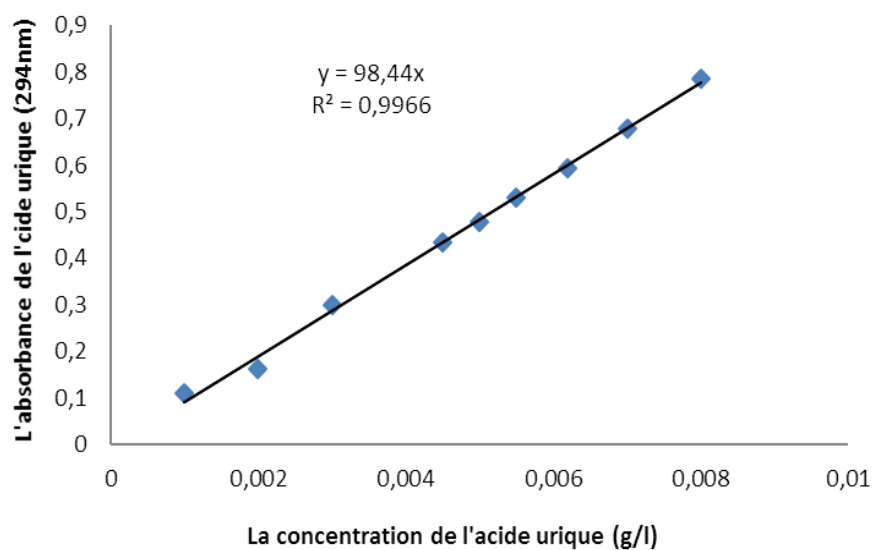


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de l'acide urique.

La représentation graphique $V = f([S_0])$ (**Figure 8**), montre que la xanthine oxydase suit une cinétique Michaëlienne. D'après ce graphe, on constate que la relation est proportionnelle entre la concentration et la vitesse enzymatique dans un domaine de linéarité qui s'arrête à une concentration de substrat de 0,005g/l où la courbe dévie montrant un plateau qui est expliqué par le fait que les sites actifs de la xanthine oxydase sont saturés.

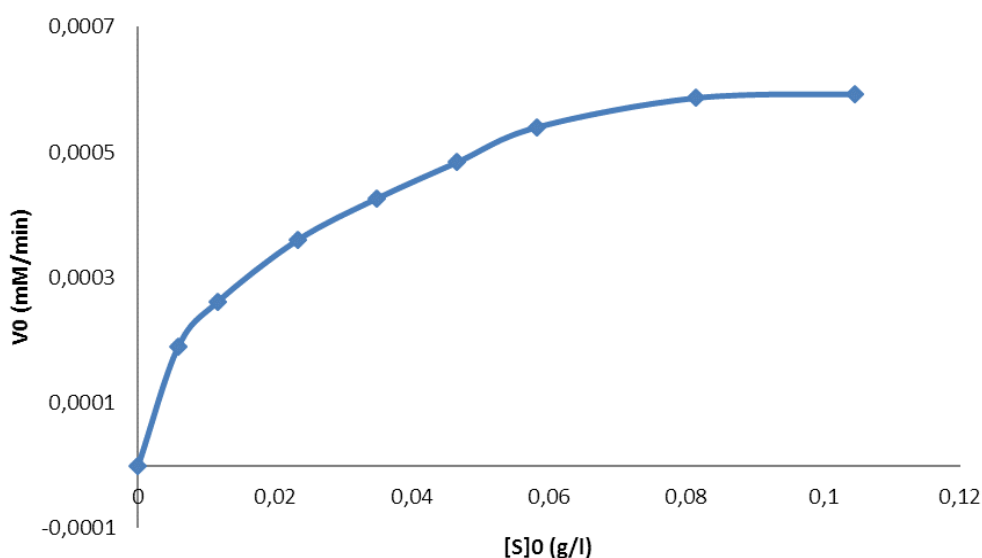


Figure 8 : Courbe de la cinétique enzymatique de XO.

La représentation de Lineweaver-Burk (**Figure 9**) nous a permis de déterminer les différents paramètres cinétiques de XO à savoir la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaëlis-Menten (K_m). La vitesse maximale est de $7,13 \cdot 10^{-4}$ mM/min et la constante de Michaëlis-Menten $K_m = 0,02$ g/l.

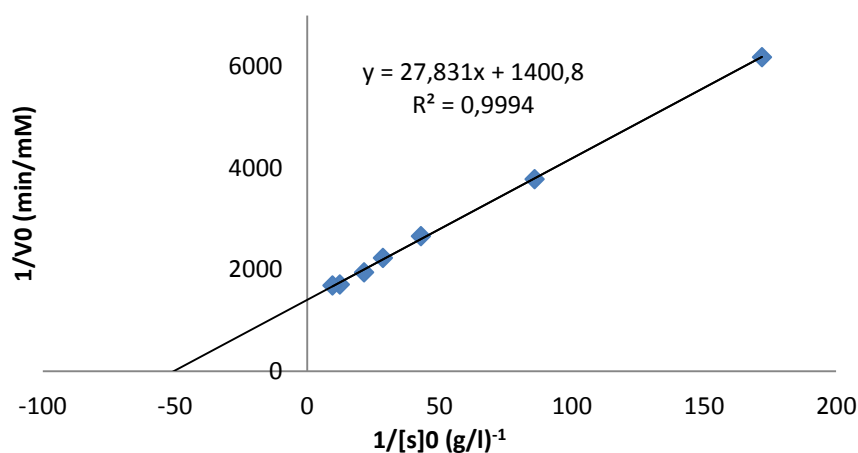


Figure 9 : Représentation de Lineweaver-Burk de XO (sans inhibiteur).

Dans le but de trouver un inhibiteur de XO, nous avons donc étudié l'effet des flavonoïdes sur l'activité de XO à des concentrations variables. Les mesures ont été effectuées avec la xanthine comme substrat de l'enzyme. L'influence du temps d'incubation sur l'inhibition de l'activité enzymatique par les flavonoïdes a été examinée jusqu'à 40min.

D'après les tracés de la variation de l'inverse des vitesses réactionnelles en fonction des concentrations des substrats exprimés en g/l pour différentes concentrations d'inhibiteurs (**Figures 10-22**), nous avons déterminé les types et la constante d'inhibition (K_i) de chaque flavonoïde. De-ce-fait, les type d'inhibition ont été déduit à partir du point d'intersection des droites de la représentation de Lineweaver-Burk, tandis que les constantes d'inhibition, sont calculée alors en utilisant les équations de régression linéaire de ces des droites.

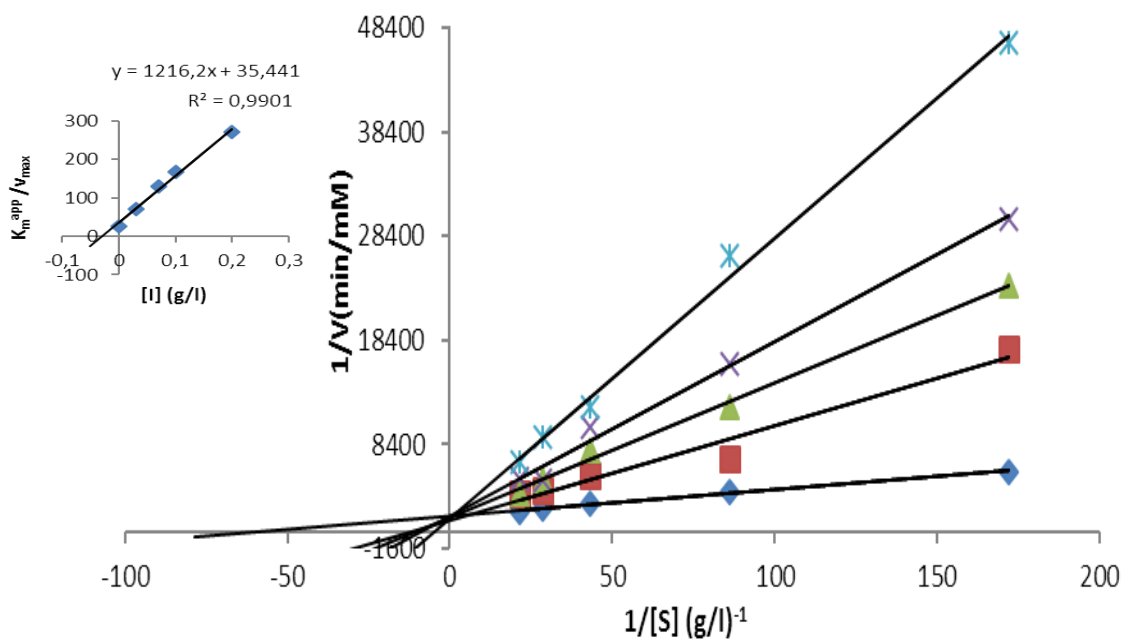


Figure 10 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Quercétine.

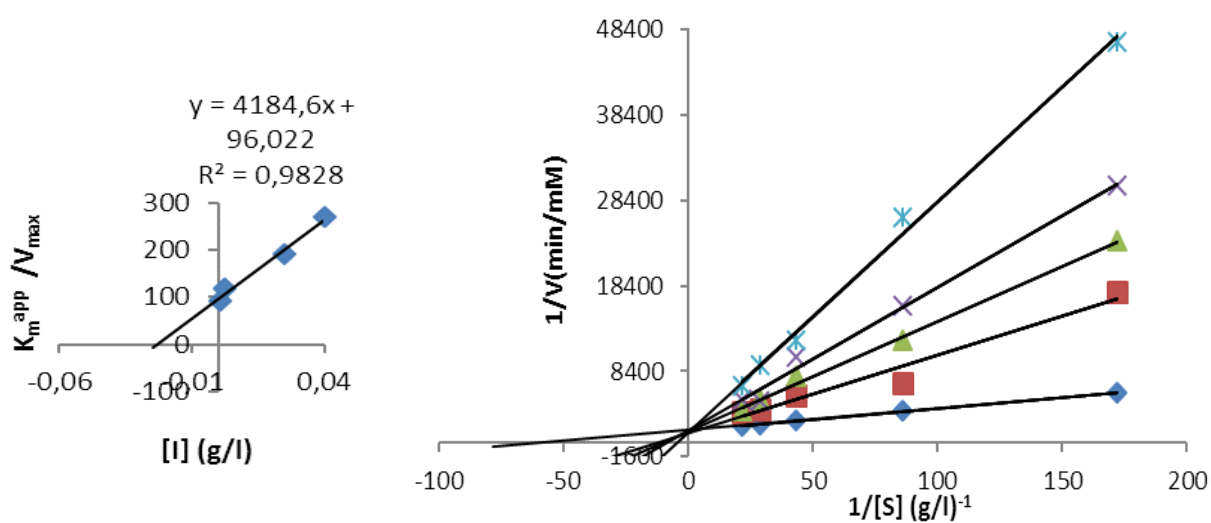


Figure 11 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de l'Apigénine.

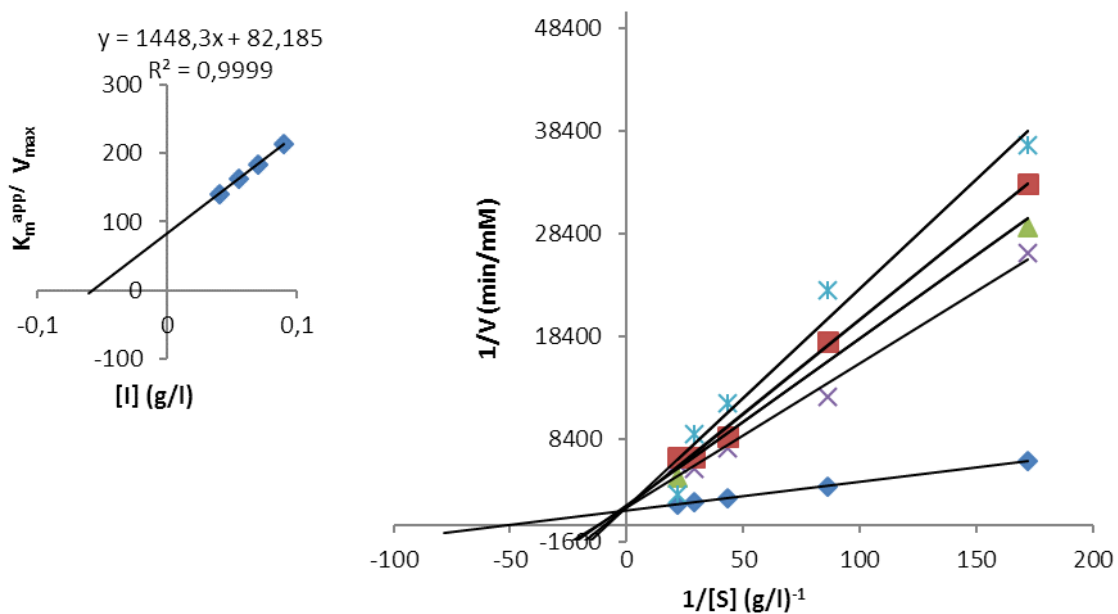


Figure 12 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de Kaempférol.

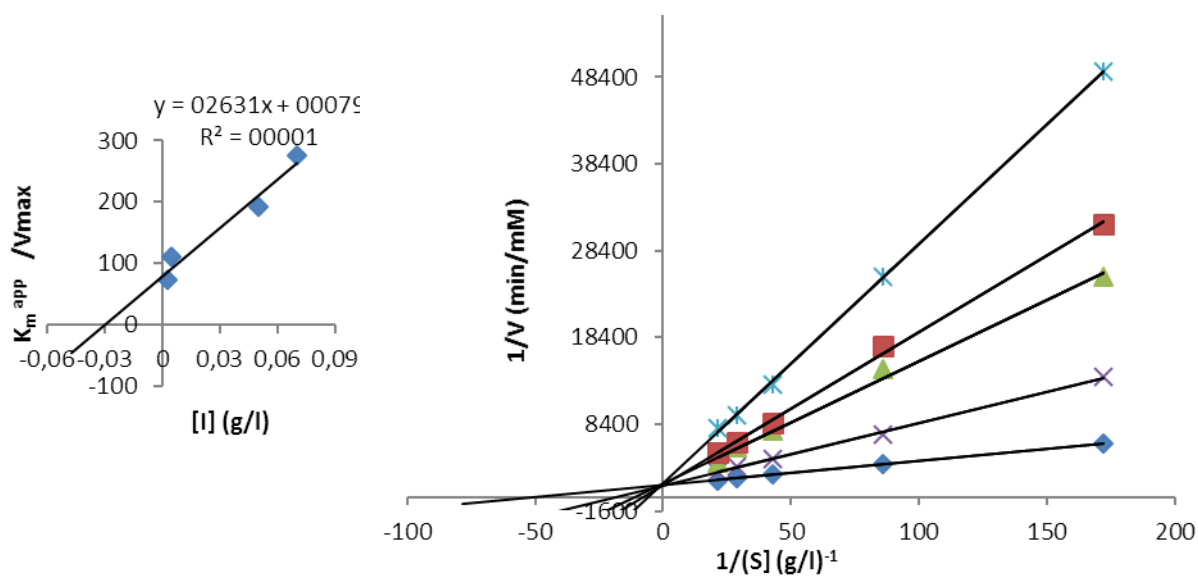


Figure 13 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Chrysin.

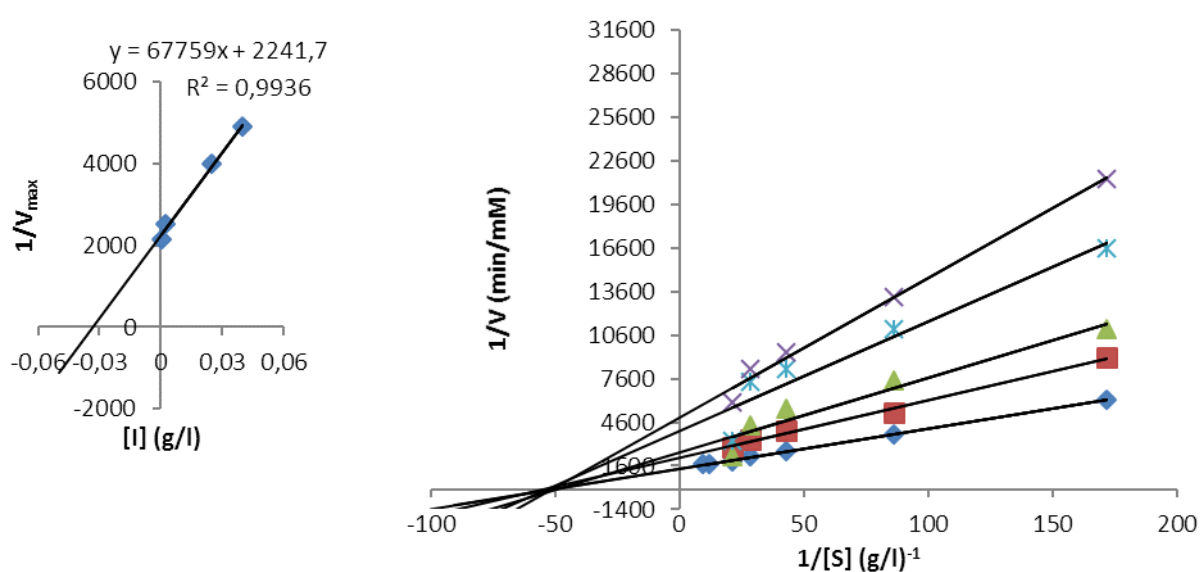


Figure 14 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Tectochrysin.

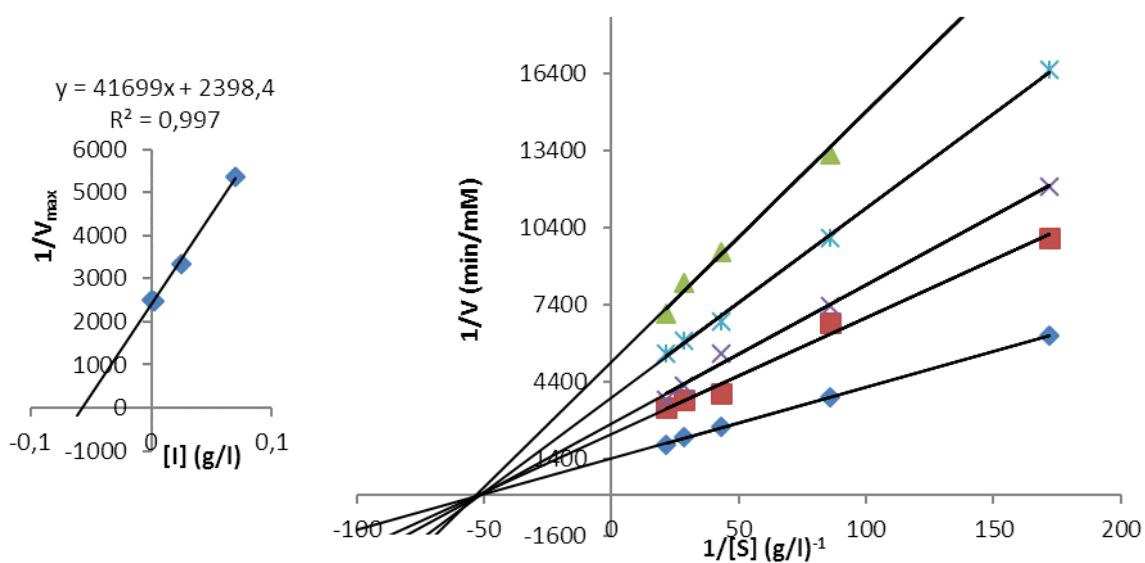


Figure 15 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Fisetine.

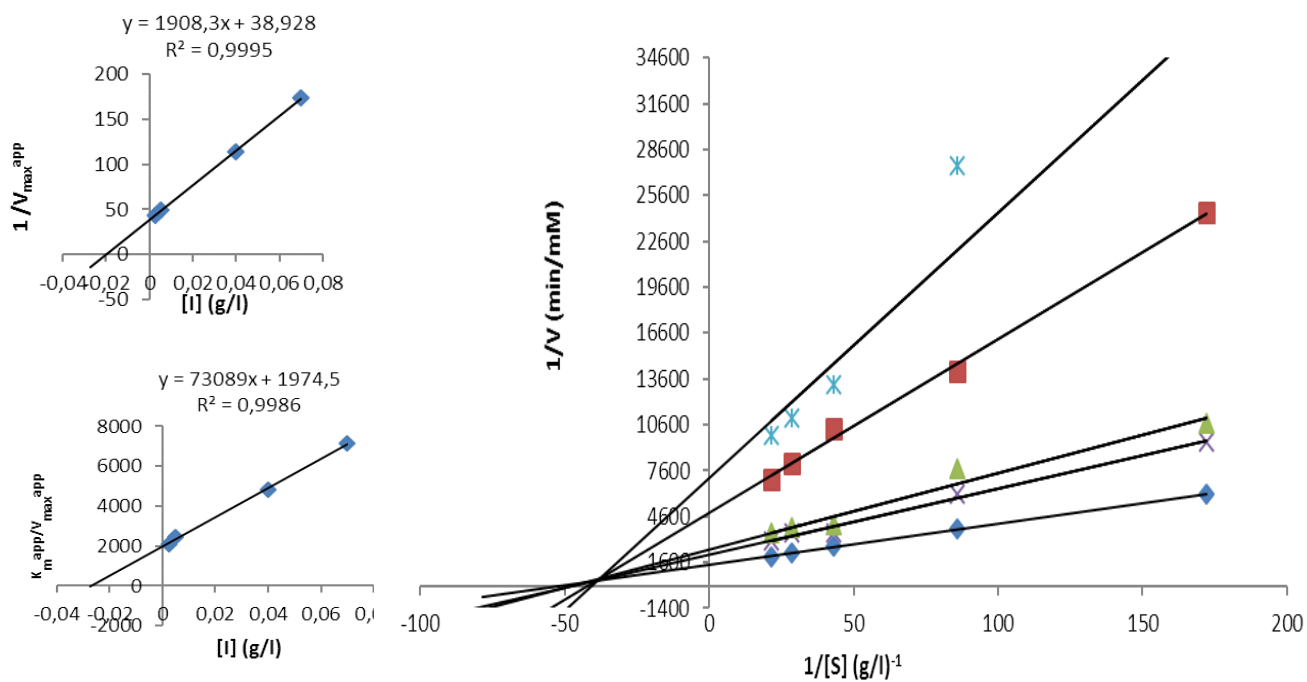


Figure 16 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Tricétine.

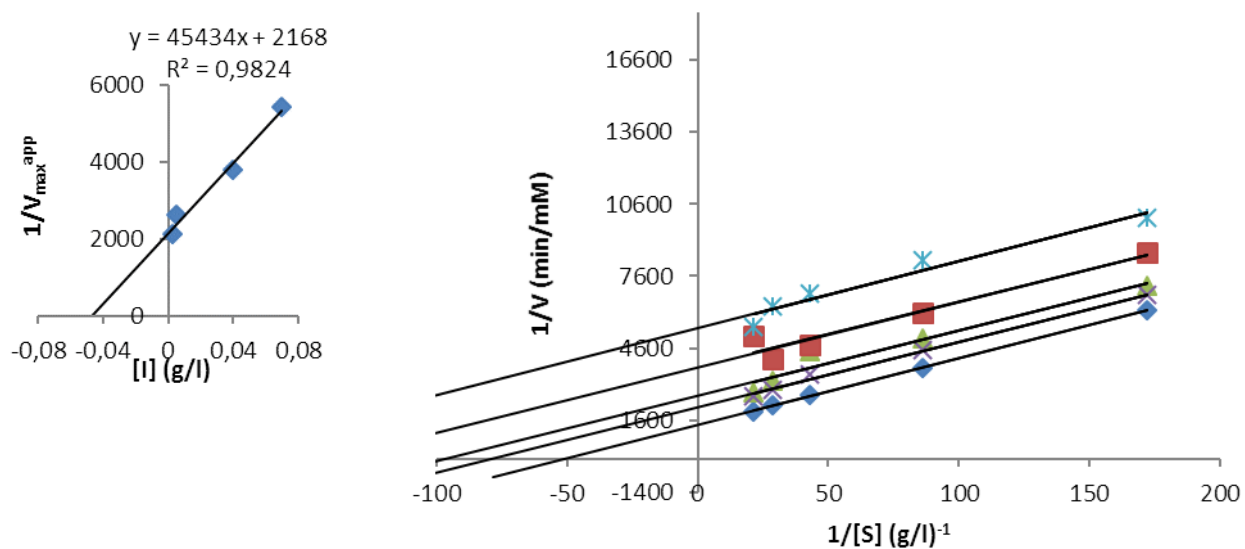


Figure 17 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de Dihydroxy5,7triméthoxy 3',4',5' flavone.

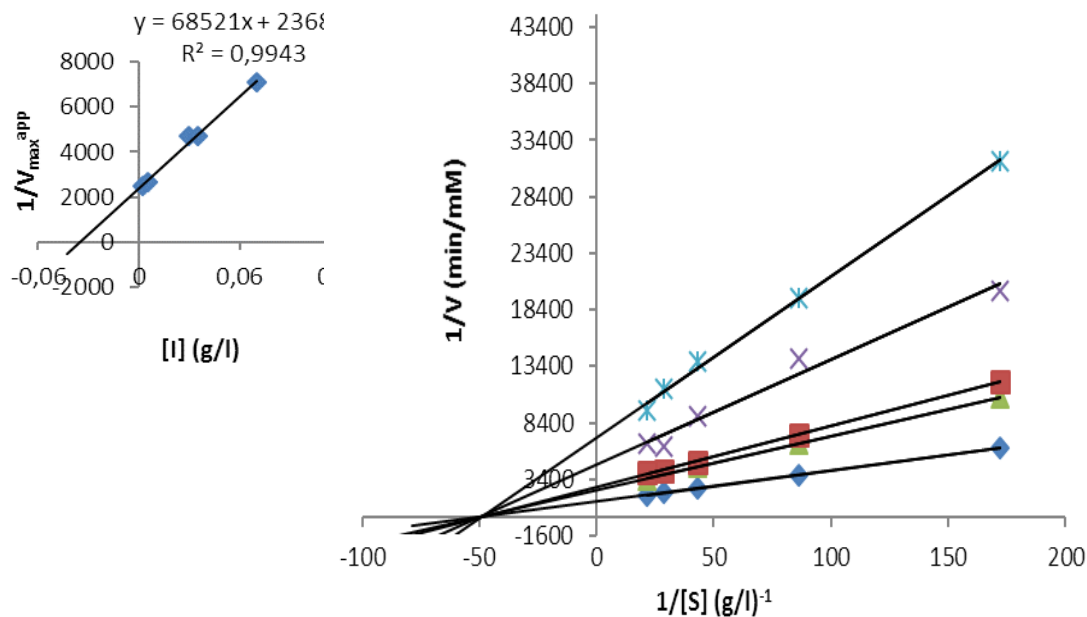


Figure 18 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de Patrole.

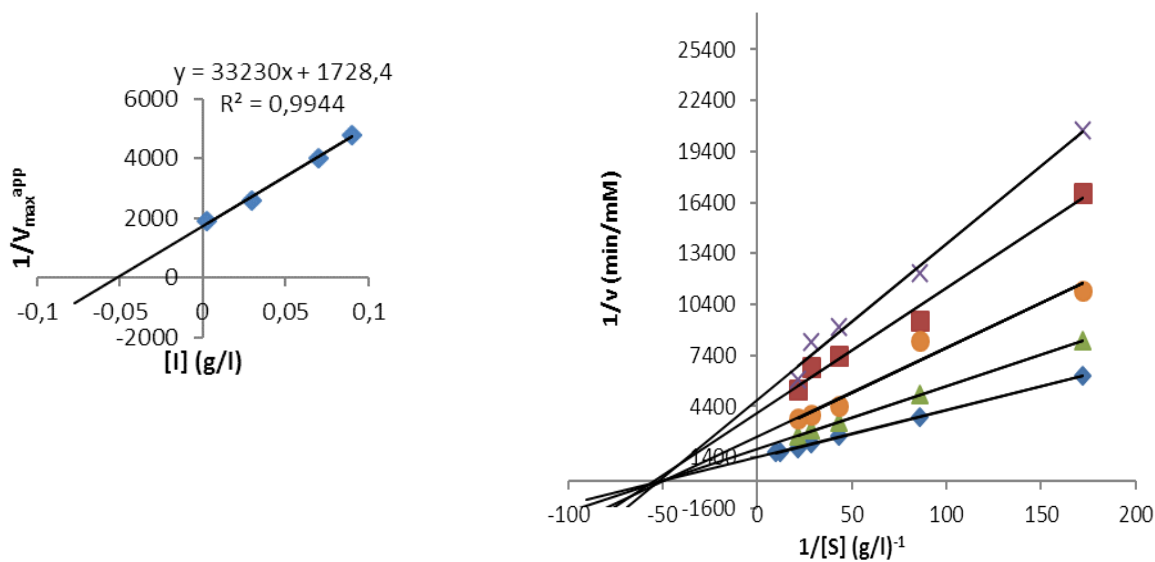


Figure 19 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de l'Ermanine.

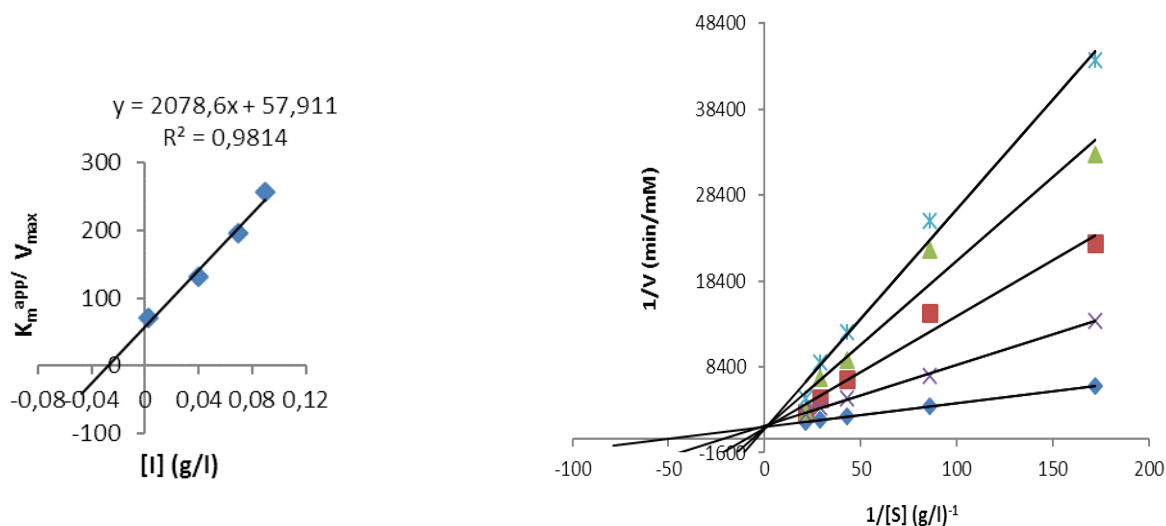


Figure 20 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Trihydroxy3',4',5' flavone.

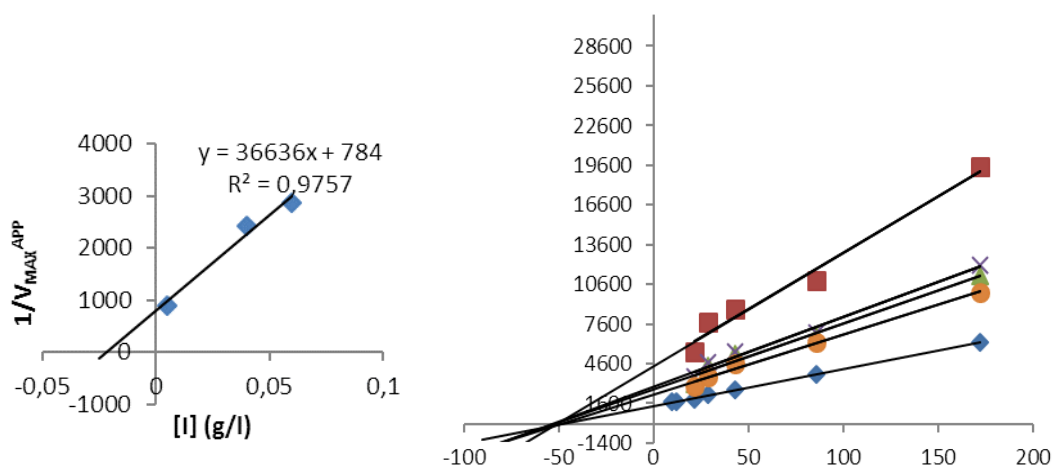


Figure 21 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la Lutéoline.

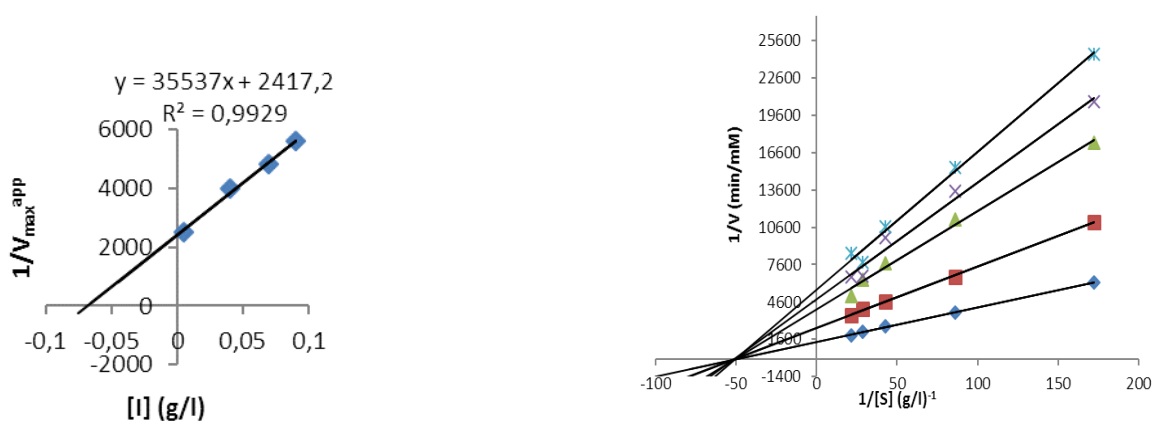


Figure 22 : Représentation de Lineweaver-Burk de la XO en présence de la 2'-Methoxyflavone.

Les résultats de l'effet inhibiteur des treize flavonoïdes sur l'activité de la XO du lait bovin sont mentionnés dans le **Tableau 4**. Nous avons pris une moyenne de K_i calculée à partir de trois tests séparés pour chaque flavonoïde. Les résultats obtenus montrent que tous les flavonoïdes inhibent l'activité de la XO très significativement d'une manière dose-dépendante.

Tableau 4 : Constante et type d'inhibition des différents flavonoïdes sur la XO.

Flavonoïde	Type d'inhibition	K_i (g/l)
Tricetine	Noncompétitive mixte	0,02/0,027
Lutéoline	Noncompétitive simple	0,021
Apigénine	Compétitive	0,022
Trihydroxy-3',4',5'-flavone	Compétitive	0,027
Chrysine	Compétitive	0,030
Pratol	Noncompétitive simple	0,033
Tectochrysine	Noncompétitive simple	0,033
Dihydroxy 5,7-triméthoxy 3',4',5'-Flavone	Incompétitive	0,047
Ermanine	Noncompétitive simple	0,052
Quercétine	Compétitive	0,055
Kaempférol	Compétitive	0,056
Fiséline	Noncompétitive simple	0,057
2'-Méthoxyflavone	Noncompétitive simple	0,068

L'ensemble des résultats obtenus montrent que la Tricetine, la Lutéoline, l'Apigénine et la Trihydroxy3',4',5' flavone présentent des K_i faibles (0,02g/l, 0,021g/l, 0,022g/l, 0,027g/l respectivement) ce qui prouve que se sont de bons inhibiteurs. Par contre, la Quercétine, l'Ermanine, le Kaempférol, la Fisétine et la 2'-Méthoxy-flavone dévoilent des valeurs de K_i relativement grand de l'ordre (0,055g/l-0,068g/l). Les flavonoïdes étudiés montrent des inhibitions réversibles de type compétitive, incompétitive et noncompétitive.

Il existe des substances qui inhibent la XO en bloquant la fixation du substrat aux sites actifs de l'enzyme (Skibo, 1986; Sanders, 1997) donc l'inhibition de l'activité de la XO par les

flavonoïdes est traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant sur les sites actifs, Mo et FAD, de l'enzyme. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différent flavonoïde sur l'activité de la XO (Owen, 1999; Kong, 2000; Sweeney, 2001; Zhu, 2004; Ferraz, 2006; Umamaheswari, 2007).

Cos et ses collaborateurs (1998) ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs activités inhibitrices de la XO. Ils ont montré que la présence de la double liaison entre les carbones C₂ et C₃ et l'absence du groupe hydroxyle en C₃ des flavonoïdes augmentent leur activité inhibitrice.

D'autres coumarines telles que la 4-méthylcoumarine, 6-hydroxy-4-méthylcoumarine ont été décrites comme étant d'efficaces inhibiteurs (Lin, 2008). Ces auteurs indiquent que les groupements hydroxyles en position 6 et 7 au niveau de la structure générale d'une coumarine, sont responsables de ce pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase. Or, la structure de l'esculine comporte un sucre en position 6 et un seul groupement hydroxyle en position 7, celui-ci participerait à la capacité inhibitrice de l'esculine.

De ce fait, les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- ✓ L'absence du groupe hydroxyle en position C₃.
- ✓ La présence du groupe hydroxyle en position (C₅ et C₇).
- ✓ La présence du groupe hydroxyle en position (C_{3'}, C_{4'}, C_{5'}).
- ✓ Les flavonoïdes possédant O-CH₃ ont des activités inférieures à celles des autres flavonoïdes.

Afin de dévoiler la relation entre l'activité antiradicalaire et l'activité inhibitrice de XO des flavonoïdes étudiés, nous avons tracé la courbe représentant la variation des constantes d'inhibition *K_i* en fonction des valeurs d'EC₅₀ (Figure 23). A partir de ce tracé, on distingue deux séries, dont chacune reflète un ensemble de flavonoïdes possédant deux tendances différentes en pouvoir antioxydant versus l'inhibition de XO. Dans la première série (Orange), on voit que l'activité antiradicalaire est un facteur important pour le bon processus d'inhibition de XO, ainsi les flavonoïdes qui ont donné des capacités antioxydante importantes se sont également de bons inhibiteurs de cette enzyme et renferment une structure de flavone qui se diffère à la substitution sur le cycle B.

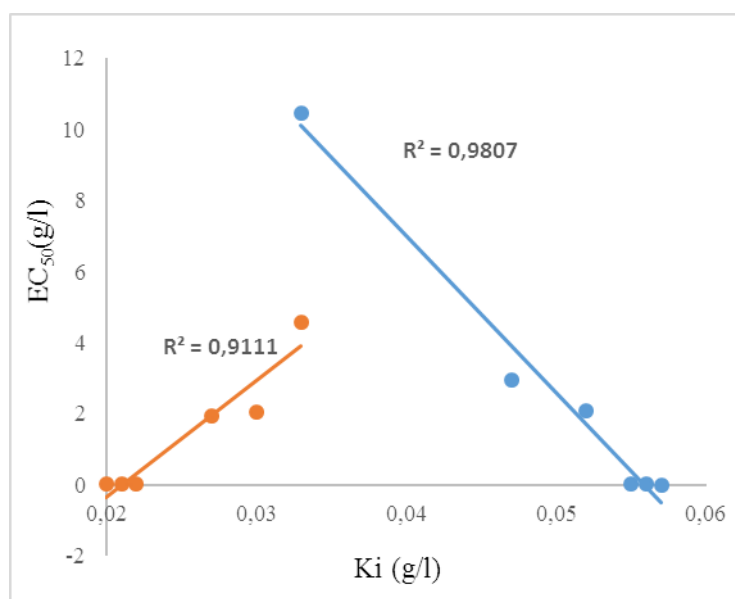


Figure 23 : Corrélation entre K_i et EC_{50} des flavonoïdes étudiés.

Par contre, dans la deuxième série (Bleu), on constate que les flavonoïdes qui ont présenté des activités importantes dans le test de DPPH, adressent un pouvoir inhibiteur de XO faible. Ces flavonoïdes présentent une structure de Flavonol. Alors, on peut conclure que les flavone se sont de bons antioxydants et bons inhibiteurs de XO. Ceci montre l'importance de la double liaison C_2-C_3 dans l'inhibition de la XO et la neutralisation du radical DPPH. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Egalement, les substitutions sur le cycle A et B modifient l'activité antiradicalaire et l'activité enzymatique, notamment les groupes hydroxyle.

En fin, le degré d'hydroxylation, la méthylation, la présence d'une ou de deux molécules de glucides ou leur mode de liaison influent sur les propriétés effectrices des flavonoïdes vis-à-vis la xanthine oxydase. Ces résultats laissent présumer que la configuration stérique des sommets substitués n'interfère pas directement avec les sites actifs des enzymes. L'examen des courbes d'inhibition nous incite à formuler l'hypothèse que les effecteurs (flavonoïdes) agissent sur la XO soit d'une altération de structure moléculaire de l'enzyme soit du masquage du site actif. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés dans la littérature (**Jacqueline, 2002 ; Danijela, 2015**).

IV. Conclusion générale

L'inventaire des flavonoïdes dans le règne végétal progresse activement depuis des décennies et s'enrichit sans cesse de substances nouvelles. Par ailleurs, différentes études ont révélé une corrélation entre la structure des flavonoïdes et l'activité antioxydante. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés d'évaluer les capacités antioxydantes de treize flavonoïdes synthétisés selon la méthode de piégeage du radical libre DPPH et celle de l'inhibition d'une enzyme oxydative ; la xanthine oxydase.

A travers les résultats obtenus dans ce travail, nous avons présenté quelques observations et proposé des interprétations concernant l'activité antioxydante des flavonoïdes étudiés. Tout d'abord, le test du DPPH a montré une réponse inhibitrice du radical variable d'un flavonoïde à un autre. Ainsi, les valeurs des EC_{50} obtenues (0,0076 à 10,47 g/l) dévoilent que ces flavonoïdes sont de bons agents antioxydants. De plus, cette étude a dévoilé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur pouvoir piégeur des radicaux libres DPPH. Or, l'activité antiradicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C, et subséquemment les critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire de ces flavonoïdes sont : La présence du groupe OH en position 3, 5, 7, 3', 4' et 5' et l'absence du groupe O-CH₃.

Comparativement au test du DPPH, le test d'inhibition enzymatique a montré son efficacité à l'étude relative au pouvoir antioxydant. Ce test a permis de confirmer que tous les flavonoïdes étudiés sont de bons inhibiteurs de XO. Egalement, nous avons constaté que l'activité antiradicalaire est un facteur important pour le bon processus d'inhibition de XO pour les flavones. Tandis que, nous avons observé une diminution de la capacité antiradicalaire des flavonols lors une augmentation du potentiel inhibiteur de XO. De ce fait, ces résultats indiquent que l'activité inhibitrice de XO des flavonoïdes n'est pas directement liée à leurs capacités antiradicalaires, mais à la présence des groupes hydroxyles en position C₅, C₇, C_{3'}, C_{4'} et C_{5'} et à l'absence du groupe métoxy (O-CH₃).

En perspective de cette étude, il est important de compléter ce travail par l'étude des autres activités antioxydante *in vitro* et *in vivo*. Il est également intéressant de pouvoir mieux comprendre la relation structure-activité des flavonoïdes investigués par l'utilisation des outils de modélisation moléculaire.

V. Références bibliographiques

Akaike T. Dependence on O₂- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice, J. Clin. Invest. 1990; 739-745.

BA K, Tine E, Destain J, Cisse C, Thonart P. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de *sorgho sénégalais* et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2010 ; Vol 14(1): 131-139.

Blake D R, Stevens C R, Sahinogla T M, Ellis G, Gaffney K, Edmonds S, Benboubetra M, Harrison R, Jawed S, Kanezler J, Miller T M, Winyord P G, Zhang Z. Xanthine oxidase: Four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. Biochem. Soc. Trans. 1997; 25: 812-816.

Blois M S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature. 1958 ; 181 :1199-1200.

Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Seddik K et Arrar L. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis L.* root extracts. Phytotherapy Research. 2009; 23: 283-288.

Brand-Williams W, Cuvelier M E et Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 1995 ; 28 : 25-30.

Bray R. Molybdenum iron-sulfur hydroxylases and related enzymes, New York. Academic. Press. 1975; 299-419.

Burits M et Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research. 2000 ; 14 : 323-328.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J P, Cimanga K, Van-Poel B, Pieters L, Vlietinck A J et Vanden Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. J. Nat. Prod. 1998 ; 61 :71-76.

Cuendet M, Hostettmann K et Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acta. 1997 ; 80 :1144-1152.

Danijela A. Kostić, Danica S, Dimitrijević, Gordana S, Stojanović, Ivan R. Palić, Aleksandra S. Yoržević, and Jovana D. Ickovski. Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. 2015 :1-9.

Enroth C, Eger B T, Okamoto K, Nishino T, Pai E F. Crystal Structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 ; 97: 10723-10728.

Freddy Pessel. Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels. thèse de doctorat en Chimie Organique. Université de PARIS-SUD. 2013 : 34-35

Ferraz Filha ,Z S, Vitolo I F, Fietto L G, Lombardi J A et Saúde-Guimarães D A. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica). Journal of Ethnopharmacology .2006 ; 107 : 79-82.

Georgieva S, Boyadzhiev L, Angelov G. Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. Revue de génie industriel.2010 ; 5:124-132.

Granger D N, McCord J M, Parks D A, Hollwarth M E. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. Gastroenterology. 1986; 90:80–84.

Griendling K K, Sorescu D, Ushio-Fukai M, NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease, Circ. Res. 2000; 86:494-501.

Hamlaoui Ikram. Etude théorique des réactions enzymatiques :Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. thèse de doctorat en Chimie Organique. Université de Constantine 1.2014 :P7

Havsteen B H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therapeut.2002 ; 96: 67– 202.

Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry.2002 ; 13 : 572-584.

Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. Journal of Food Composition and Analysis. 2008 ; 21 : 589-598.

Jacqueline E, Wood, Senti T, Senthilmohan, Alexander V. Peskin. Antioxidant activity of *procyanidin-containing* plant extracts at different pHs. Food Chemistry.2002 ; 77: 155–161.

Kokoglu E. Xanthine oxidase levels in human brain tumors, Cancer. Lett. 1990; 179-181.

Kong L D, Cai Y, Huang W W, Cheng C H et Tan R X. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. J. Ethnopharmacol.2000 ; 73 : 199-207.

Laughton M J, Halliwell B, Evans P J, Houlst J, Robin S. Antioxydant and Pro-oxydant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Biochem. Pharmacol.1989 ; 38 (17): 2859-2865.

Lin H C, Tsai S H, Chen C S, Chang Y C, Lee C M, Lai, Z Y, Lin C M. "Structure-activity relationship of *coumarin* derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities." Biochemical Pharmacology .2008 ; 75(6): 1416-1425.

Lin S, G Zhang, J Pan, D Gong. Deciphering the inhibitory mechanism of genistein on xanthine oxidase *in vitro*. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology .2015 ; 153 :463–472.

Massey V, Harris C M. Milk xanthine dehydrogenase: the first one hundred years. Biochem. Soc. Trans. 1997; 25: 750-755.

McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrom c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968; 243: 5753-5760.

Molyneux P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 2004; 26 (2): 211-219.

Mukohata Y, Nakabayashi S, Higashida M. Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett.* 1978 ; 85: 215– 218.

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md.* 1996; 21(6): 895- 902.

Nur Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. 2013 ; 21 :145-149.

Oka T, Simpson F J, Child J J, Mills C. Degradation og rutin by *Aspergillus flavus*. Purification of the dioxygenase quercetinase. *Can. J. Microbiol.* 1971 ; 17: 11 118.

Owen P L et Johns T. Xanthine oxidase inhibitory activity of *northeastern* North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology.* 1999 ; 64 : 149-160.

Pelli K, Lyly M. Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande. 2003 ; 3 :9p.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel.* 2009 ;(4) :8p.

Robak J et Gryglewski R J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 1988 ; 37 :837-841.

Sanders S, Eisenthal R S et Harrison R. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase – reneration of superoxyde anion. *Eur. J. Biochem.* 1997 ; 245 : 541-548.

Schardinger F. Uber das Verhalten der Kuhmilch genen Methylenblau und seine verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Untersuch Nahrungs Genussmittel.* 1902; 5: 1113-1121.

Skibo E B. Non competitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at functional flavin adenine dinucleotide cofactor. *Biochemistry.* 1986 ; 25 : 4189-4194.

Sweeney A P, Wyllie S G, Shalliker R A et Markhan J L. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 2001 ; 75 : 273-277.

Tsimogiannins, D I, Oreopoulou, V. The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* 2006 ; 7: 140-146.

Umamaheswari M, Asok-Kumar K, Somasundaram A, Sivashanmugam T, Subhadradevi V. et Ravi T K. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology*.2007 ; 109 : 547-551.

Waud W. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂- dependent forms of rat liver xanthine dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.* 1976 : 354-364.

Zhu J X, Wang Y, Kong L D, Yang C et Zhang X. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*.2004 ; 93 : 133-140.