Nancy-Université

INPL

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite entraîne une poursuite pénale.

Contact SCD INPL: mailto:scdinpl@inpl-nancy.fr

LIENS

Code de la propriété intellectuelle. Articles L 122.4
Code de la propriété intellectuelle. Articles L 335.2 – L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole **N**ationale **S**upérieure d'**A**gronomie et des **I**ndustries **A**limentaires

Ecole Doctorale **R**essources **P**rocédés **P**roduits **E**nvironnement

Laboratoire des **S**ciences du **G**énie **C**himique
Laboratoire de **B**iocatalyse et des **B**ioprocédés

THÈSE

Préparée par

Jamila HADJ SALEM

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

EXTRACTION, IDENTIFICATION, CARACTERISATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE FLAVONOIDES DE NITRARIA RETUSA ET SYNTHESE DE DERIVES ACYLES DE CES MOLECULES PAR VOIE ENZYMATIQUE

Soutenue publiquement le 09/10/2009 devant la commission d'examen

Rapporteur	Mme ***Fabienne GUERARD,***	Professeur, UFR des sciences, Brest
Rapporteur	M. ***Eric GONTIER***	Professeur, UFR des Sciences, Amiens
Examinateur	Mme ***Lucie COUTURIER***	Chef de projet R&D, Bioeurope, Anet
Co-directeurs de thèse	Mme ***Catherine HUMEAU***	Maître de Conférences, INPL, Nancy
	Mme ***IsabelleCHEVALOT***	Maître de Conférences HDR, INPL, Nancy
Invité	Mme ***Christelle HARSCOAT***	Chargé de recherche CNRS Nancy
Directeur de thèse	M. ***Michel FICK***	Professeur, INPL, Nancy

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au laboratoire des Sciences du Génie Chimique en collaboration avec le laboratoire de Biocatalyse et des Bioprocédés. Je tiens donc à remercier M. Michel Sardin, directeur du LSGC de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Michel FICK, mon directeur de thèse, et lui exprime toute mon amicale et immense reconnaissance de m'avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités pédagogiques et l'enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Je veux également remercier Madame Isabelle CHEVALOT (MDC, HDR) et Madame Catherine HUMEAU (MDC), les deux co-directeurs de ma thèse. Merci à Isabelle pour son enthousiaste débat avec moi des idées et théories, merci pour les encouragements et les conseils techniques. Catherine m'a tout d'abord initiée au monde de biosynthèse, merci de son professionnalisme, son encadrement scientifique avisé et sa disponibilité durant ces trois années de thèse.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Madame Christelle HARSCOAT, chargée de recherche CNRS, pour son soutien et pour le temps qu'elle a pu consacrer pour m'aider dans les analyses, l'identification et la purification des flavonoïdes qui ont fait l'objet de ce travail. Merci pour sa patience, sa collaboration et son aide à la réalisation de ce manuscrit.

J'exprime ma reconnaissance aux membres de la commission d'examen, professeur Fabienne GUERARD, professeur Eric GONTIER et madame Lucie COUTURIER

(Chef de projet), qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs nombreuses charges.

Je tiens à remercier, Fabrice BLANCHARD, Xavier FRAMBOISIER et Cédric PARIS, pour leur dynamisme et leurs compétences en techniques analytiques qu'ils m'eussent apportées et enseignées sans lesquelles ce projet n'aurait pu être mené à bien.

Je remercie tout le personnel des deux laboratoires LSGC et LBB pour leur sympathie, leur aide et leur soutien sur le plan scientifique et humain

Un grand merci pour mes collègues et amis au GPBA qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon à la progression de mon travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante.

Un merci spécial pour le professeur Mohamed GHOUL et madame Latifa CHEBIL (MDC) pour leurs conseils, leur précieux soutien moral pendant des périodes difficiles et leur encouragements à «passer par la fenêtre quand la porte est fermée » quand rien ne marche.

Je suis très reconnaissante à Madame et Mosieur GHEDIRA, Professeurs à l'univeristé de monastir, mes encadreurs en Master, de m'avoir initiée au monde pertinent de la recherche et m'avoir aidée dans le choix de la plante sur laquelle j'ai travaillé pendant le master et sur laquelle porte ce travail de thèse. Merci pour eux également de m'avoir aidée dans la recherche d'un laboratoire d'accueil en France et pour l'obtention de la bourse de coopération afin de pouvoir réaliser ma thèse à Nancy.

Toutes les expréssions de reconnaissance pour mes parents qui voulaient tout le temps que je pousse mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable, Merci pour tout, je vous admire…

Un grand merci pour mes sœurs Amna et Nejia, mon frère Abdelfatteh, pour tout l'amour qu'ils n'hésitèrent jamais à me prouver, Merci pour tout.

Je remercie également les personnes qui me sont très chères et particulièrement mon amie Rim d'être toujours disponible, malgré la distance qui nous sépare, et de m'avoir accompagnée au cours de cette aventure avec toute l'attention et la fraternité, trouvant toujours les mots qu'il faut quand ça ne va pas.

Finalement, un merci du fond du coeur à mon fiancé Samir qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidée, m'a encouragée, m'a soutenue et surtout m'a supportée pendant les moments difficiles.

Je dédie ce travail à la mémoire de ma belle mère

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPH	2,2’ azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	acide 2,2’-azinobis (3-éthylbenzthiazoline) -6- sulfonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMVN	2,2’ azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile)
Aq-Ext	Extrait aqueux
Asp	aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
B. cereus	*Bacillus cereus*
BuOHF	Buthanol fraction
CALB	Lipase B de *Candida antarctica*
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDKs	Cyclin-Dependent Kinases
$CHCl_3F$	Chloroform fraction
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CVL	lipase de *Chromobacterium viscosum*
DA	donneur d’acyle
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
$ECHCl_3$	Extrait au chloroforme
E. coli	*Escherichia coli*
EHex	Extrait à l’hexane
ERO	Espèces réactives de l’oxygène
EtOAcF	Ethyl acetate fraction
Flavo	flavonoïdes
FPTase	Farnesyl protein transferase
GADD	growth arrest and DNA damage
Gln	Glutamine
GS	radical thiyl
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
His	histidine
H_2OF	Fraction aqueuse
Isrh-rut	Isorhamnetine-3-O-rutinoside
LDL	Low-density lipoprotein
LME	Leaves methanol extract

logP	coefficient de partage octanol/eau
M_2B_2	2-Méthyl-2-butanol
M. Flavus	*Micrococcus Flavus*
MMAE	Maceration methanol aqueous extract
MTT	(3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl) -2,5 diphényl tétrazolium bromide
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthétase
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PGL	lipase de *Pseudomonas glumae*
PIG	P53-Inducible Gene 3
PI 3-kinases	Phosphoinositide 3-kinases
P. mirabilis	*Pseudomonas mirabilis*
PPA	acide phénylpropionique
ppm	Partie par million
rpm	Rotation par minute
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSA	relation structure-activité
Ser	sérine
SM	Spectrométrie de masse
SM^n	Spectrométrie de masse par fragmentation (n : niveaux de fragmentation)
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SoxMAE	Soxhlet methanol aqueous extract
TEAC	Trolox equivalent antioxydant capacity
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
VEGF	Facteur Vasculaire Endothélial de Croissance
XO	xanthine oxydase

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ---- 1

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ---- 5

1. DESCRIPTION BOTANIQUE DE *NITRARIA RETUSA* ---- 5

1.1. TAXONOMIE ---- 5
1.2. MORPHOLOGIE DE *NITRARIA RETUSA* ---- 6
1.3. LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ---- 7
2. UTILISATION TRADITIONNELLE DE *NITRARIA RETUSA* ---- 8

3. ETUDES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DE *NITRARIA RETUSA* ---- 9

3.1. FLAVONOÏDES DE *NITRARIA RETUSA* ---- 9
3.2. ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE *NITRARIA RETUSA* ---- 10

4. ETUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE D'AUTRES ESPECES DU GENRE NITRARIA : EXEMPLE DE *N. TANGUTORUM* ---- 10

4.1. COMPOSITION CHIMIQUE DE *NITRARIA TANGUTORUM* ---- 10
4.2. ACTIVITE CYTOTOXIQUE D'UN FLAVONE DE *NITRARIA TANGUTORUM* ---- 11
4.3. ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DE L'ALCALOÏDE TANGUTORINE ---- 11

5. STRESS OXYDANT ---- 12

5.1. ORIGINE ET DANGERS DES RADICAUX LIBRES ---- 12
5.2. LES SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE L'OXYDATION ---- 14
5.2.1. Les antioxydants liposolubles ---- 15
5.2.2. Les antioxydants hydrosolubles ---- 17
5.2.3. Les antioxydants polyphénoliques ---- 18

6. LES POLYPHENOLS ---- 19

6.1. ROLE PHYSIOLOGIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES ---- 21
6.2. LES FLAVONOÏDES ---- 22
6.2.1. Définition ---- 22
6.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes ---- 23
6.2.3. Intérêt biologique des flavonoïdes ---- 26
6.2.4. Activité antioxydante des flavonoïdes ---- 28
6.2.5. Relations structure-activités de flavonoïdes ---- 39
6.2.6. Propriétés anticancéreuses (et/ou de prévention des cancers) de flavonoïdes ---- 42
6.2.7. Biodisponibilité des flavonoïdes ---- 52

7. ACYLATION DES FLAVONOÏDES ---- 58

7.1. ACYLATION CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES ---- 59
7.2. ACYLATION CHIMIO-ENZYMATIQUE ---- 62
7.3. ACYLATION ENZYMATIQUE ---- 63
7.3.1. Les enzymes utilisées dans la catalyse des réactions d'acylations enzymatiques ---- 63
7.3.2. Description de l'activité catalytique des lipases dans les réactions d'acylation. ---- 66
7.4. PARAMETRES AFFECTANT L'ACYLATION ENZYMATIQUE DES FLAVONOÏDES ---- 70
7.4.1. Effet de la nature du solvant ---- 70
7.4.2. Effet de la nature de la réaction ---- 72
7.4.3. Effet de la nature des flavonoïdes ---- 72
7.4.4. Effet de la nature du substrat donneur de groupement acyle ---- 76
7.4.5. Influence des conditions opératoires ---- 79
7.5. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ESTERS DE FLAVONOÏDES ---- 82

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES ---- 87

1. MATERIELS ---- 87

1.1. MATERIEL VEGETAL ---- 87
1.2. ENZYMES ---- 87
1.2.1. La lipase de Candida antarctica (CALB) ---- 87

1.2.2. La lipase de Pseudomonas cepacia (PCL) ---- *87*
1.3. LES LIGNEES CELLULAIRES ---- 88
1.3.1. La lignée Caco2 ---- *88*
1.3.2. La lignée HUVEC ---- *88*
1.4. SOLVANTS ---- 89
1.5. COMPOSES PHENOLIQUES ---- 90
1.6. ACIDES GRAS ---- 91
1.7. REACTIFS ---- 92

2. METHODES ---- 93

2.1. EXTRACTIONS/FRACTIONNEMENT ---- 93
2.1.1. Préparation d'extraits à partir des feuilles de Nitraria retusa par l'appareil de Soxhlet. ---- *93*
2.1.2. Fractionnement de l'extrait au méthanol ---- *94*
2.1.3. Préparation d'un extrait aqueux à partir des feuilles de Nitraria retusa ---- *94*
2.1.4. Préparation des extraits au méthanol à partir de l'extrait aqueux ---- *95*
2.2. ANALYSES ---- 95
2.2.1. Etude du contenu en flavonoïdes et en polyphénols totaux des divers extraits ---- *95*
2.2.2. Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince ---- *97*
2.2.3. Analyses par CLHP-SM ---- *99*
2.3. PURIFICATION DE FLAVONOÏDES A PARTIR DE LA FRACTION AU BUTANOL ---- 102
2.4. PURIFICATION DES PRODUITS DE SYNTHESE ---- 103
2.4.1. Purification des esters d'isoquercitrine ---- *103*
2.4.2. Purification des esters d'isorhamnetine-3-O-glucoside par chromatographie sur couche mince. - *105*
2.5. ANALYSE PAR RMN ---- 105
2.6. MISE EN OEUVRE DES REACTIONS ENZYMATIQUES D'ACYLATION ---- 105
2.6.1 Préparation des milieux de synthèse ---- *105*
2.6.2. Synthèses enzymatiques sous pression atmosphérique ---- *106*
2.6.3. Synthèses enzymatiques sous pression réduite ---- *107*
2.6.4. Réactions d'hydrolyse ---- *108*
2.7. EVALUATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES ---- 109
2.7.1. Inhibition du système xanthine / xanthine oxydase ---- *109*
2.7.2. Inhibition de l'ion superoxyde ---- *110*
2.7.3. Piégeage des radicaux DPPH$^{\bullet}$ ---- *111*
2.7.4. Piégeage des radicaux ABTS$^{\bullet+}$ ---- *113*
2.8. ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE ---- 114
2.8.1. Culture cellulaire ---- *114*
2.8.2. Conservation des cellules ---- *116*
2.8.3. Etude de l'activité antiprolifération ---- *117*

CHAPITRE III. ETUDE PRELIMINAIRE : CARACTERISATION DES FLAVONOÏDES DE *N. RETUSA* ET MISE EN ŒUVRE DE LEUR ACYLATION ---- 121

1. ETUDE CHIMIQUE DE *NITRARIA RETUSA* ---- 121

1.1. INTRODUCTION ---- 121
1.2. ETUDE CHIMIQUE PRÉLIMINAIRE ---- 122
1.2.1. Préparation des extraits à partir de feuilles sèches de N. retusa ---- *122*
1.2.2. Analyse des flavonoïdes présents dans les extraits de feuilles de N.retusa ---- *124*
1.2.3. Extraction des flavonoïdes présents dans la fraction aqueuse ---- *129*
1.2.4. Fractionnement de l'extrait au méthanol (EMeOH) ---- *130*

CES RESULTATS SERONT UTILES DANS LA SUITE AFIN D'EXPLIQUER LES DIFFERENCES DANS LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE DIFFERENTES FRACTIONS. ---- 134

2. SYNTHESE ENZYMATIQUE D'ESTERS D'ISOQUERCITRINE ET D'ACIDES AMINES/ETUDE PRELIMINAIRE ---- 134

2.1. INTRODUCTION ---- 134
2.2. CHOIX DU SOLVANT POUR LA SYNTHESE D'ESTERS D'ISOQUERCITRINE ET D'ACIDE GLUTAMIQUE ---- 135
2.3. EFFET DE L'ORIGINE DE LA LIPASE SUR LA SYNTHESE D'ESTERS D'ISOQUERCITRINE ET D'ACIDE GLUTAMIQUE ---- 138
2.4. ETUDE DE L'AFFINITE DE QUELQUES LIPASES POUR L'ACIDE GLUTAMIQUE ET SON ESTER ETHYLIQUE ---- 139
2.4.1. Estérification enzymatique du glutamate d'éthyle par le n-butanol ---- *139*

2.4.2. Hydrolyse du glutamate d'éthyle en présence de différentes enzymes ---- *139*
2.4.3. Etude de l'inhibition de la lipase B de Candida antarctica par le glutamate d'éthyle ---- *141*

3. CONCLUSION ---- **142**

CHAPITRE IV: EFFET DE LA LONGUEUR DE LA CHAINE DE CARBONE DU DONNEUR D'ACYLE SUR L'ACYLATION DE L'ISOQUERCITRINE ET SUR LES ACTIVITES DES ESTERS ---- **144**

1. INTRODUCTION ---- **144**

2. EFFECT OF ACYL DONOR CHAIN LENGTH ON ISOQUERCITRIN ACYLATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CORRESPONDING ESTERS ---- **146**

3. CONTRIBUTION DE L'ARTICLE ---- **170**

4. COMPLEMENT DE RESULTATS : ---- **173**

ACTIVITES ANTIPROLIFERATIVES DE L'ISOQUERCITRINE ET DE SES ESTERS VIS-A-VIS DE CELLULES NORMALES HUVEC ---- **173**

CHAPITRE V : VALORISATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOIDES DE *NITRARIA RETUSA* ET DE LEURS DERIVES ACYLES ---- **176**

1. INTRODUCTION ---- **176**

3. CONTRIBUTION DE L'ARTICLE ---- **201**

4. COMPLEMENT DE RESULTATS: ---- **203**

ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DES FLAVONOÏDES ET DES ESTERS D'ISORHAMNETINE-3-O-GLUCOSIDE VIS-A-VIS DES CELLULES HUVEC. ---- **203**

4.1. ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DES FLAVONOÏDES VIS-A-VIS DES CELLULES HUVEC ---- 203
4.2. ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DES ESTERS D'ISORHAMNETINE-3-O-GLUCOSIDE VIS-A-VIS DES CELLULES HUVEC ---- 206
4.3. PURIFICATION, ACYLATION ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'ISORHAMNETINE-3-O-RUTINOSIDE ---- 207
4.3.1. Purification de l'isorhamnetine-3-O-rutinoside à partir de la fraction au butanol ---- *207*
4.3.2. Acylation de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside purifiée à partir de la fraction au butanol. ---- *209*
4.3.3. Comparaison des activités biologiques de l'isorhamnétine-3-O- rutinoside purifiée à partir de la fraction au butanol et l'isorhamnétine-3-O- rutinoside commercialisée. ---- *209*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ---- **211**

REFERENCES ---- **218**

---FIGURES---

Figure 1: Fruits, feuilles et fleurs de *Nitraria retusa* ---- 6
Figure 2: Distribution de *Nitraria retusa* dans le monde (en rouge) ---- 7
Figure 3: Structure de l'isorhamnétine-3-O-4Rhm galactosyl robinobioside (Ahmed et al., 1995) ---- 9
Figure 4: Dommages causés par les ERO au niveau de l'ADN (Goetz et Luch, 2008) ---- 14
Figure 5: Structure des α, β, γ et δ-tocophérols et α, β, γ et δ-tocotriénols (Jiang et al., 2008) ---- 15
Figure 6: Régénération de la vitamine E ---- 16
Figure 7: Molécule isoprène ---- 16
Figure 8: Exemples de caroténoides (Liang et al., 2009) ---- 17
Figure 9: Motif flavan (a) et flavon(b) et numérotation systématique ---- 23
Figure 10: Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy, 1996) ---- 24
Figure 11: Différentes classes de flavonoïdes ---- 25
Figure 12: activité antiradicalaire de divers flavonoïdes vis-à-vis du radical ABTS.+, exprimée en indice TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) (Rice-Evans et al., 1996). ---- 30
Figure 13: Complexation de la quercétine avec le fer II au niveau du groupement catéchol (Bodini et al., 1999) 32
Figure 14:Coordination du Fe^{2+} avec un polyphénol et transfert d'électrons en présence d'oxygène générant le complexe Fe^{3+}-polyphénol. B : Coordination du Fe^{3+} avec un polyphénol, réduction de l'ion et formation de la semiquinone, et réduction du Fe^{3+} ,. R=H, OH ---- 32

Figure 15: Les fonctions dans la structure de la lutéoline lui attribuant une forte activité inhibitrice de la xanthine oxydase. 35
Figure 16: Représentation de l'activité prooxydante de la quercétine permettant la formation de 6- et 8-quercétine glutathionyl (Van Der Wood et al., 2005). 38
Figure 17: Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante 39
Figure 18: Relation entre la structure de flavanes et leur capacité à piéger des radicaux libres (Ma et al., 2007) 39
Figure 19: Rôle du groupement catéchol dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (Musialik et al., 2009) 40
Figure 20: Structures chimiques de la quercétine et de la taxifolin 41
Figure 21: Structures et valeurs TEAC du test ABTS de la catéchine et de la quercétine (Rice-Evans et al., 1996). 41
Figure 22: Description du cycle cellulaire (Pan et Ho, 2008) 48
Figure 23: Destination des nutriments après leur administration: (1) 1ibération, (2) absorption (bioaccessibilité) (3) distribution (4) métabolisme, (5) l'élimination (Holst et Williamson, 2008) 53
Figure 24: Métabolites de la quercétine (Rice-Evans et al., 1996) 54
Figure 25: Synthèse de catéchine 3- O-acylée en présence de lipozyme (Patti et al., 2000) 63
Figure 26: Structure chimique de la rutine et la naringine 65
Figure 27: Structure secondaire de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (Kim et al., 1997) 68
Figure 28: Forme des sites de liaison de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (Pleiss et al., 1998). 69
Figure 29: Forme des sites de liaison de la lipase B de *Candida antarctica* (Pleiss et al., 1998) 70
Figure 30: Régioselectivité de l'acylation de flavonoïdes biocatalysée par la subtilisine, la CALB et la PCL (Chebil et al., 2006). 75
Figure 31: Synthèse de dérivés 7-O-acylés de l'oroxyline (Babu et al., 2005) 83
Figure 32: Esterification enzymatique du chrysoériol-7-O- β -D -(3 ″-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (1), et du chrysoériol-7-[6″-O- -acetyl-β-D-dallosyl-(1-2) β-D-glucopyranoside] (2) (Melou et al., 2005). 84
Figure 33: Pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase (a) et de la β-glycosidase (b) du mesquitol et de ses esters-3-O-acylés (Madhusudana Rao et al., 2003). 85
Figure 34: Acylation enzymatique de la rutine en liquide ionique, catalysée par la CALB (Katsoura et al., 2006). 86
Figure 35: Appareil de soxhlet 94
Figure 36: Courbe étalon de l'acide gallique 96
Figure 37:Courbe étalon de la quercétine 97
Figure 38: Courbes de calibration pour le dosage CLHP de l'isoquercitrine (a), de la quercétine (b) par spectrophotométrie UV à 254 nm et du 2,6 diméthylphenol (c) par spectrophotométrie UV à 214 nm. 102
Figure 39: Dispositif expérimental utilisé pour la purification des esters d'isoquercitrine 104
Figure 40: Schéma du réacteur Wheaton® utilisé pour la mise en oeuvre des réactions sous pression atmosphérique 106
Figure 41: Evaporateur rotatif utilisé pour les synthèses sous pression réduite 107
Figure 42: Station de synthèse en parallèle: Syncore Reactor (Büchi) 108
Figure 43: Cycle de production de l'acide urique par le système xanthine/xanthine oxydase 109
Figure 44: Structure de l'allopurinol 110
Figure 45: 1,1 diphényl-2-picryl hydrazil (DPPH) 111
Figure 46: acide 6-hydroxyl-2,5,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, Trolox 112
Figure 47: acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique) ABTS 113
Figure 48: Système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire: Cellscreen® (Innovatis, Allemagne) 118
Figure 49: Réaction de transformation de MTT en formazan par la succinate déshydrogénase 119
Figure 50: Structure de base des flavonoïdes 121
Figure 51: Préparation des extraits de *N. retusa* avec l'appareil de soxhlet et fractionnement de l'extrait au méthanol 122
Figure 52: Structures des deux isomères, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et l'isorhamnétine-3-O-robinobioside 125
Figure 53: Chromatographie sur couche mince de silice des différents extraits issus de feuilles de *Nitraria retusa* développée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/25/10 v/v/v) et révélée sous UV à une longueur d'onde de 254 nm. 126
Figure 54: Chromatographie sur couche mince de silice des différents extraits issus de feuilles de *Nitraria retusa* développée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/25/10 v/v/v), révélée au réactif de NEU puis sous UV à une longueur d'onde de 254 nm.. 126
Figure 55: Préparation d'extraits au méthanol à partir de l'extrait aqueux 129
Figure 56: Chromatographie sur couche mince de silice de l'extrait aqueux et des extraits au méthanol, développée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100:25:10) et révélée sous UV à une longueur d'onde de 254 nm 130

Figure 57: Chromatographies sur couche mince de silice des fractions obtenues à partir d'EMeOH, développée avec le mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/25/10 v/v/v) et révélée sous UV à 254 nm ---------- 131
Figure 58: Chromatogramme des fractions au chloroforme (FCHCl3), à l'acétate d'éthyle (FAcOEt) et au butanol (FBuOH. ---------- 132
Figure 59: Spectre de masse des pics 18 mn (l'isorhamnétine-3-O-glucoside) et 26-28 min (l'isorhamnétine-3-O-rutinoside/ isorhamnétine-3-O-rutinoside) du chromatogramme de FBuOH ---------- 133
Figure 60: Structure chimique de l'acide glutamique---------- 135
Figure 61: Spectre de masse d'un milieu de synthèse du glutamate d'isoquercitrine, dans la pyridine, en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, à t=0 (a) et t=48h (b) ---------- 137
Figure 62: Spectres de masse du milieu d'hydrolyse du glutamate d'éthyle après 24h de réaction, en présence de différentes enzymes ---------- 140
Figure 63: Analyse CLHP (détection UV à 214 nm) après 16 h de réaction d'un milieu d'hydrolyse de l'oléate d'éthyle en présence de glutamate d'éthyle (1x) (a) et d'un milieu d'hydrolyse de l'oléate d'éthyle en présence de glutamate d'éthyle (2x) (b).---------- 141
Figure 64: Pourcentage de mortalité de cellules HUVEC déterminé par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isoquercitrine et de ses esters ---------- 174
Figure 65: Pourcentage de mortalité de cellules Caco2 déterminé par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isoquercitrine et de ses esters ---------- 174
Figure 66: Mortalité de cellules HUVEC déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations de flavonoïdes---------- 203
Figure 67: Mortalité des cellules Caco2 (%) déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations de flavonoïdes---------- 204
Figure 68: Mortalité des cellules HUVEC (%) déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isorhamnétine-3-O-glucoside et de ses esters---------- 206
Figure 69: Mortalité des cellules Caco2 (%) déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isorhamnétine-3-O-glucoside et de ses esters ---------- 206
Figure 70: Chromatogramme de la FBuOH après analyse CLHP à 254 nm en utilisant une colonne C18 AltimaAmide 4,6 x 150 Altech.---------- 207
Figure 71: Spectre de masse d'isorhamnétine-rutinoside purifiée à partir de la FBuOH ---------- 208
Figure 72: Structure de la quercétine---------- 213

---TABLEAUX---

Tableau 1: Taxonomie de *Nitraria retusa* ---------- 5
Tableau 2: Principales classes de composés phénoliques---------- 20
Tableau 3: Prévention de certaines maladies par les flavonoïdes---------- 26
Tableau 4: Propriétés anticancéreuses, in vitro et in vivo de certains flavonoïdes ---------- 43
Tableau 5: Quelques études épidémiologiques mettant en évidence la relation entre la consommation de flavonoïdes et le cancer ---------- 45
Tableau 6: Acylation chimique de flavonoïdes ---------- 59
Tableau 7: Liste des solvants utilisés---------- 89
Tableau 8: Descriptif et structure de composés phénoliques utilisés dans cette étude ---------- 90
Tableau 9: Descriptif des esters éthyliques d'acides gras utilisés---------- 91
Tableau 10: Descriptif des réactifs utilisés pour cette étude ---------- 92
Tableau 11: rendements d'extraction des différents procédés appliqués aux feuilles sèches de *Nitraria retusa* : obtention des extraits EMeOH, EAcOEt, ECHCl3, EHex et Aq-Ext ---------- 123
Tableau 12: Mise en évidence de la présence de flavonoïdes dans les différents extraits de *N. Retusa* par la méthode à la cyanidine---------- 124
Tableau 13: Rf des flavonoïdes présents dans les extraits de feuilles de *Nitraria retusa*---------- 127
Tableau 14: Fractionnement de EMeOH par extractions liquide / liquide successives avec différents solvants. 131
Tableau 15: Comparaison des activités biologiques d'isrohamnétine-3-rutinoside commercialisée et de d'isrohamnétine-3-rutinoside purifiée---------- 210
Tableau 16: Influence de la structure des flavonoïdes sur leurs activités biologiques. ---------- 213

INTRODUCTION GENERALE

Pour se soigner, l'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres, décoctions), administrés par frictions, inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale. Le nombre d'espèces de plantes à fleurs connues est évalué à plus de 400 000. On estime à environ 34 000 le nombre d'espèces encore inconnues à ce jour.

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme central. Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes d'insectes, sécheresse, lumière UV…). D'un point de vue applicatif, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales. L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites (taxanes de l'if, alcaloïdes de la pervenche de Madagascar...) fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires végétaux pour le développement de nouveaux médicaments.

Les polyphénols constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires qui se localisent généralement au niveau des différentes parties de la plante. Ces composés suscitent un grand intérêt de par leurs nombreux effets bénéfiques pour la santé : prévention et traitement de certains cancers, traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (Terra et al., 2007; Yang et al., 2008 ; Cazarolli et al. 2008; Perez-Vezcaino et al., 2006. Li-Weber, 2009 ; Bonfili et al., 2008; Pierini et al., 2008; Teillet et al., 2008 ; Burta et al., 2008). Certains d'entre eux sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Les polyphénols sont communément subdivisés en tanins, lignines, flavonoïdes et anthocyanes qui dérivent tous de l'assemblement d'unités phénoliques. En particulier, les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antiinflammatoires, antiprolifératives, régulatrices de systèmes enzymatiques … Ces activités ont très souvent un lien avec leur activité antioxydante et notamment leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation de radicaux.

En condition physiologique, l'oxygène donne lieu à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont font partie les radicaux libres, particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces ERO sont susceptibles d'interagir avec toute une série de composés biologiques (lipides, protéines, ADN,..) et de conduire à leur dégradation partielle (Mario et Andreas, 2008). Au niveau moléculaire, les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer des facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (Ushio-Fukai et Nakamura, 2008; Galanis et al., 2008). Pour diminuer ces effets, l'apport d'antioxydants dans des quantités adéquates par le biais de l'alimentation ou de compléments enrichis constitue une voie dont l'efficacité est aujourd'hui reconnue. Parmi eux, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes. Cependant, la formulation de ces molécules dans diverses préparations se heurte encore à un certain nombre de difficultés liées à leur mise en solution dans différentes phases lipophiles et hydrophiles à cause de leur polarité intermédiaire qui est modulée par la présence dans leur structure, de groupes substituants non phénoliques plus ou moins polaires. Ils sont donc souvent peu solubles en phases aqueuses et encore plus faiblement dans les phases lipidiques, ce qui peut restreindre leur efficacité ou leur biodisponibilité.

Plusieurs réactions ont été décrites dans la littérature pour améliorer l'utilisation de flavonoïdes dans des formulations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires sans altération de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Ainsi, des essais de glycosylation, de polymérisation et d'acylation ont été mis en œuvre dans le but d'augmenter la stabilité, la solubilité et la biodisponibilité de ces métabolites. Ces synthèses permettent ainsi la fonctionnalisation des flavonoïdes. En particulier, l'acylation des flavonoïdes est une des voies intéressantes et prometteuses pour remédier à ces limitations. En effet, elle confère aux flavonoïdes une meilleure solubilité dans les milieux lipidiques et améliore leur capacité à être transferé au niveau des membranes biologiques en augmentant leur hydrophobie. Cette

réaction a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de déterminer les conditions adéquates de réaction afin d'optimiser les rendements et de mettre en évidence l'influence de ces conditions sur la régiosélectivité. Différents facteurs ont été étudiés tels que la nature du flavonoïde, la nature du donneur de groupement acyle, la nature de catalyseur, le solvant, la température, la pression, la teneur en eau du milieu réactionnel …

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'étudier les activités biologiques d'extraits riches en flavonoïdes de *Nitraria retusa*, des flavonoïdes identifiés et purifiés à partir de ces extraits et étudier l'influence de l'acylation enzymatique sur les propriétés antioxydantes et antiprolifératives de ces flavonoïdes.

La première partie de ce travail consistera à déterminer les conditions d'extraction des flavonoïdes à partir de feuilles séches d'une plante subsaharienne : *Nitraria retusa*. Les rendements d'extraction seront déterminés, les polyphénols totaux quantifiés et les principaux flavonoïdes identifiés.

Les activités antioxydantes des extraits bruts, des fractions enrichies en flavonoïdes et de molécules témoins seront évaluées : aptitude à inhiber la xanthine oxydase, à piéger les radicaux DPPH, ABTS et le radical anion superoxyde. L'activité antiproliférative de ces fractions/extraits vis-à-vis de deux lignées cellulaires humaines: les cellules cancéreuses Caco2 et les cellules normales HUVEC sera également étudiée.

Dans une deuxième partie, une étude concernant la synthèse de dérivés acylés d'un flavonoïde modèle, l'isoquercitrine, ayant une structure proche de celle de flavonoïdes présents dans *Nitraria retusa* sera entreprise. Des donneurs de groupement acyle de différentes longueurs de chaîne seront utilisés afin d'étudier leur influence sur les performances et la régiosélectivité de la réaction.

Les activités biologiques des esters synthétisés seront évaluées par différentes mesures d'activité antioxydante et d'activité antiproliférative et comparées à celles de la molécule d'origine, l'isoquercitrine. Des éléments de relations structure-activités seront proposés.

Enfin, les conditions mises au point pour l'acylation de l'isoquercitrine, molécule modèle, seront appliquées par la suite à un flavonoïde de *Nitraria retusa* : l'isorhamnétine-3-O-glucoside, un analogue structurale de l'isoquercitrine.

Les activités biologiques d'esters d'isorhamnetine-3-O-glucoside seront déterminées et comparées à celles de la molécule d'origine.

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Description botanique de *Nitraria retusa*

1.1. Taxonomie

Le genre *Nitraria* comporte plusieurs espèces : *N. billardierei, N. caspica N. komarovii, N. oliverii , N. pamirica, N. praevisa, N. retusa, N. roborowskii, N. schoberi, N. senegalensis, N. sericea, N. sibirica, N. sinensis, N. sphaerocarpa, N. tangutorum.* En se basant sur des données concernant le développement de l'anthère, la structure du pollen et l'embryologie, Sheahan et Chase (1996) ont recommandé de séparer ces espèces de la famille des *Zygophyllaceae* et de les considérer comme une famille indépendante (Täkholm, 1974 ; Boulos, 2000; Watson et Dallwitz, 1992) (tableau 1).

Tableau 1: Taxonomie de *Nitraria retusa*

Règne	*Plantae*
Sous- Règne	*Tracheobionta*
Super -Division	*Sepermatophyta*
Division	*Magnoliophyta*
Classe	*Magnoliopsida*
Ordre	*Sapindales*
Famille	*Nitrariaceae*
Tribu	*Nitrarioideae*
Genre	*Nitraria*
Espèce	*Nitraria retusa*

1.2. Morphologie de Nitraria retusa

Le genre *Nitraria* est constitué d'arbrisseaux parfois épineux. Ces plantes sont xérophiles, hermaphrodites et poussent dans les déserts salins. Elles présentent un feuillage le plus souvent caduc.

Nitraria retusa est un arbrisseau, très rameux de couleur gris-vert, épineux par ses rameaux pointus aux extrémités. Il mesure de 0,5 à 1,5 m de hauteur, mais peut atteindre parfois 4 à 5 m. Il croît souvent en buttes en accumulant du sable. (Chaïeb et Boukhris, 1998).

Ses feuilles sont en forme de spatule et charnues. Elles sont alternées sur les jeunes rameaux et en touffes sur les rameaux anciens. La floraison a lieu au début du printemps. Les fleurs constituent des petites panicules blanchâtres terminant les rameaux. Le fruit est une drupe pyramidale à trois loges donnant une seule graine. (Chaïeb et Boukhris, 1998 ; Pottier-Alapetite, 1979).



Figure 1: Fruits, feuilles et fleurs de *Nitraria retusa*

1.3. Localisation géographique

Les plantes du genre *Nitraria* sont particulièrement holarctiques, paléotropicales, et australiennes. On les trouve également dans le Sahara et dans la région qui s'étend du sud de la Russie à l'Afghanistan. *Nitraria retusa* pousse principalement dans les régions à climat modéré et subtropical. C'est l'un des arbrisseaux les plus communs dans la végétation halophile des déserts salins (Tackholm, 1974 ; Daoud, 1985). Il est également très présent dans les steppes. Les sols occupés par cette plante saharo-arabienne, présentés dans la figure 2, s'étendent du nord de l'Arabie saoudite au sud de la Somalie, et de l'est de la Palestine jusqu'à l'ouest de la Sénégambie (Zohary, 1973). Des études menées en Egypte ont montré que cette espèce occupe trois territoires principaux:

- Les marais salins.
- Les barres de sables moins salines.
- Les canaux de certains oueds situés près des côtes (Kassas et Girgis, 1965; Kassas et Zahran, 1967).



Figure 2: Distribution de *Nitraria retusa* dans le monde (en rouge)

Nitraria retusa est rare dans le nord de la Tunisie mais elle est très fréquente dans les bioclimats de l'aride supérieur au saharien. Les sols sont typiquement gypseux ou gypseux salés. C'est une espèce gypso halophile qui occupe les plaines et les dépressions des basses steppes dans le centre et le sud (Chaïeb et Boukhris, 1998). *Nitraria retusa* est également répandue dans les régions côtières (Bou Ficha, Hammam Sousse, Sfax, Kerkennah) (Pottier-Alapetite, 1979). Elle est nommée localement « ghardaq ».

Moussa et al. (2000) indiquent que cette espèce se trouve dans la région de Mareth (oasis de Mareth) du coté continent et dans les zones d'alluvionnement à texture moyenne et assez riches en gypse ; elle domine l'Oued el Ferd et Zarat, dans la région de Nefzaoua (oasis de Fatnassa). Elle compte parmi les espèces particulièrement adaptées à la salinité et à l'hydromorphie.

2. Utilisation traditionnelle de *Nitraria retusa*

Nitraria retusa est un bon stabilisateur des sols; elle permet notamment de fixer les dunes (Abd El-Ghani et Amer, 2003). A l'état jeune, les feuilles et les petites branches sont appréciées par les chèvres, les moutons et les dromadaires (Le Houérou, 1980; Heneidy, 1996). Le bois est utilisé comme combustible par les habitants locaux (Kassas et Girgis, 1965). Les drupes de *Nitraria retusa* sont comestibles. Elles sont consommées par l'homme et les oiseaux (Larribaud, 1952). Ces fruits rouges sont savoureux et servent à préparer un jus rafraîchissant (Keith, 1965 ; Sudhersan, 2003). Les feuilles charnues et amères de *Nitraria retusa*, additionnées d'eau, servent à fabriquer des cataplasmes qui sont appliqués pour résorber des enflures. (Trotter, 1915; Keith, 1965). Les feuilles sèches servent, en décoction, de succédané au thé (Täckholm, 1978; Le Floc'h, 1983). Les cendres de cette espèce ont la propriété de retirer les humeurs des plaies infectées (Passager et Barbançon, 1956). Hmamouchi (1997) indique que la partie aérienne de *Nitraria retusa* est utilisée au Maroc à des fins médicinales, alimentaires et vétérinaires. Bellakhdar (1997) a décrit l'utilisation des feuilles de *Nitraria retusa* dans plusieurs recettes traditionnelles au Maroc pour guérir différents maux et maladies: dans la région de Tissint, les indigènes utilisent les feuilles fraîches de *Nitraria retusa* en décoction en cas d'empoisonnement, maux d'estomac, ulcère, gastralgie, gastrite, entérite, pyrosis, colite, colique, douleurs abdominales et maux de ventre.

Dans cette même région, les feuilles de *Nitraria retusa* additionnées à des feuilles de *Zygophyllum gaetulum* sont utilisées en suppositoires pour guérir les hémorroïdes. Dans la région de Figuig et dans le Tafilalet, ces mêmes feuilles sont utilisées en cataplasme en cas d'entorse, d'enflure, d'hématome, de foulure, de contusion ou de luxation. L'arbuste constitue également un bon pâturage, conseillé dans la maladie du chameau. Rivera et al. (2006), citent *Nitraria retusa* parmi les exemples de plantes endémiques méditerranéennes utilisées en alimentation.

3. Etudes chimiques et biologiques de *Nitraria retusa*

3.1. Flavonoïdes de Nitraria retusa

Au cours d'investigations chimiosystématiques, les feuilles de *Nitraria retusa* ont été étudiées et 6 hétérosides de l'isorhamnétine ont été identifiés expérimentalement par Halim et al. (1995). Cette étude a permis d'isoler, à partir des feuilles et des jeunes tiges de *Nitraria retusa*, un nouveau flavonol trioside, l'isorhamnétine 3-O-4^{Rhm} galactosyl robinobioside en plus d'autres flavonols déjà identifiés: l'isorhamnétine (Harborne et al., 1975), l'isorhamnétine 3-robinobioside (Buschi et Pomilio, 1982 ; Saleh et al., 1990), l'isorhamnétine 3-rutinoside (Harborne et Mabry, 1982; Kamel et al., 1991), l'isorhamnétine 3-galactoside et l'isorhamnétine 3-xylosyl robinobioside (Markham et al., 1978 ; Kamel et al., 1991) et l'isorhamnétine 3-glucoside (Markham, 1978).

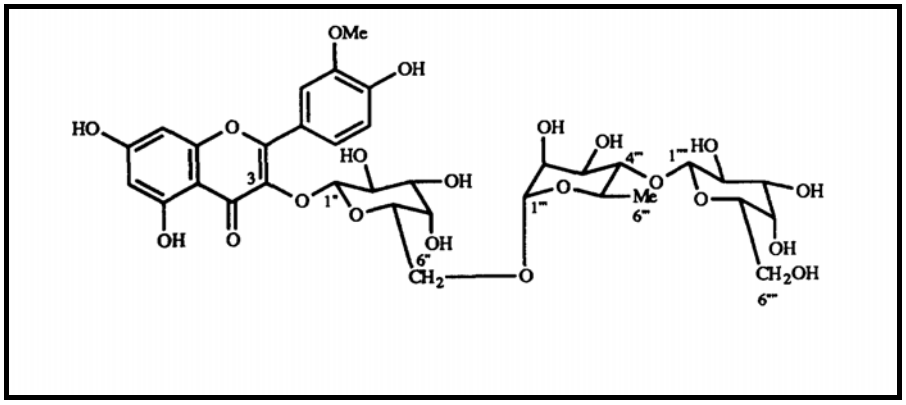


Figure 3: Structure de l'isorhamnétine-3-O-4Rhm galactosyl robinobioside (Ahmed et al., 1995)

L'isorhamnétine 3-O-4^{Rhm} galactosyl robinobioside a été isolé par extraction des feuilles de *Nitraria retusa* à l'acétate d'éthyle et au n-butanol.

Le spectre UV de ce flavonoïde a révélé que celui-ci est substitué en position 3 et présente des groupements hydroxyles libres au niveau des carbones 7, 5 et 4'.

Nitraria retusa est une espèce qui possède un profil de flavonoïdes différent des autres *Zygophyllaceae*. En effet, le flavonol glycoside majeur de *Nitraria retusa* est l'isorhamnétine 3-O-robinobioside (Halim et al., 1995), alors que pour d'autres *Zygophyllaceae* le flavonol glycoside majeur est le rutinoside pour le *Zygophylum* et les balinites (Saleh et El-Hadidi, 1977; Kamel et al., 1991; Maksoud et El-Hadidi, 1988) et le gentiobioside pour le *Tribulus* (Saleh et al., 1982). Cela confirme que la glycosylation joue un rôle important dans la taxonomie des *Zygophyllaceae* et prouve la séparation taxonomique de tribu de *Nitrarioideae* et son traitement comme une famille séparée, les *Nitrariaceae* (Tackholm, 1974; Takholm et Boulos, 1972).

3.2. Activité antidiabétique de Nitraria retusa

L'évaluation des activités biologiques potentielles de *Nitraria retusa* a fait l'objet de très peu d'études scientifiques. On peut citer les travaux de Shabana et al. (1990) qui ont étudié l'activité antidiabétique de plantes désertiques recueillies dans différentes localités égyptiennes. Des extraits ont été administrés à des rats normaux et à des rats alloxanisés à jeun. Après comparaison des résultats obtenus en présence de ces extraits avec ceux obtenus avec des hypoglycémiants standards administrés par voie orale, ces auteurs ont montré que *Nitraria retusa* possède une activité hypoglycémiante (Shabana et al., 1990).

4. Etude chimique et biologique d'autres espèces du genre Nitraria : exemple de *N. tangutorum*

4.1. Composition chimique de Nitraria tangutorum

Cette espèce pousse en Chine. Ses feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle comme agent antispasmodique et anti-arythmique (Xing, 1991).

Huit composés chimiques ont été isolés à partir des feuilles de *Nitraria tangutorum :* l'acide 3-méthoxy-4-hydroxy-(trans)-cinnamique, l'acide α-hydroxy-trans-cinnamique,

l'acide 3-hydroxy-4-méthoxy-benzène carboxylique, l'acide α-hydroxy-benzène carboxylique, le 3,5-diméthylether-kaempférol-7-O-β-D-glucoside, le 3-méthylether-kaempférol-7-O-β-D-glucoside, l'isorhamnétine-7-O-β-D-glucoside et l'isorhamnétine-3-O-β-D-rutinoside. Ces composés ont été utilisés pour établir la chimiotaxonomie du genre *Nitraria* (Duan et al., 1998, Jeffrey, 2001).

Dans les graines de *Nitraria tangutorum*, Zhong-jian (1989) a isolé l'isorhamnétine-7-O-β-D-glucoside, l'isorhamnétine-7-O-α-L-rhamnoside, le kaempférol-7-O-α-L-rhamnoside et la quercétine-7-O-α-L-rhamnoside. La quercétine, quant à elle, a été identifiée dans l'extrait à l'éthanol de ces graines (Wang, 2007). Yourui et al. (2004) ont étudié la composition chimique de l'huile de graines de *Nitraria tangutorum.* 28 composés chimiques ont été séparés à partir de cette huile et les 12 composés majoritaires parmi lesquels l'acide linoléique, le γ-sitostérol, le gamma-tocophérol et le 2,4-méthyl-5-cholestène-3-ol ont été identifiés. Cette plante est riche en acide linoléique qui représente 66% de l'huile de ses graines.

Duan et al. (1999) ont identifié pour la première fois un alcaloïde indolique très intéressant: la tangutorine dans les feuilles de *Nitraria tangutorum* (Putkonen et al. 2001 ; Putkonen et al., 2003). Cet alcaloïde a montré une importante cytotoxicité vis-à-vis des cellules HT29, cellules cancéreuses de colon humain (Lui et al., 2005).

4.2. Activité cytotoxique d'un flavone de Nitraria tangutorum

Yu et al. (2008) ont montré que le flavone extrait de *Nitraria tangutorum* possède une forte activité cytotoxique *in vitro* vis-à-vis des cellules d'adénocarcinome de reins humains, A-704. Son mécanisme d'action est probablement lié à une inhibition de la division cellulaire, une destruction de la structure de la membrane cellulaire et un changement des teneurs en microéléments dans la cellule.

4.3. Activité antiproliférative de l'alcaloïde tangutorine

L'alcaloïde tangutorine a été isolé à partir des feuilles de *Nitraria tangutorum.* Liu et al. (2005) ont étudié l'activité antiproliférative de cette molécule vis-à-vis des cellules HT29.

Alors qu'à faible concentration la tangutorine stimule légèrement leur prolifération, à des concentrations supérieures à 6,25 µg/mL, elle fait diminuer le nombre de cellules vivantes de manière dose dépendante (IC50=15 µg/mL). Les études morphologiques des cellules n'ont pas permis la détection des caractéristiques spécifiques de l'apoptose mais seulement de grandes vacuoles, un gonflement de mitochondries et des filaments denses liant le cytosquelette dans le cytoplasme. L'analyse par immunoblotting a montré que la tangutorine a induit une suppression de toutes les cyclines et leurs kinases associées, comme la topoisomérase, par l'induction de p21 II, a empêché la réplication normale de l'ADN et a inhibé la mitose.

Ces différents travaux soulignent d'une part l'intérêt certain de *Nitraria retusa* et d'autres plantes appartenant au même genre pour la prévention et le traitement de diverses pathologies et d'autre part la/les activités particulières de métabolites polyphénoliques spécifiques. Aucune étude visant à établir un lien entre les activités biologiques associées à ces plantes et leur composition n'a été rapportée.

Depuis 10 ans, l'intérêt porté aux composés phénoliques extraits de végétaux ne cesse de croître. Dans le domaine de la nutrition, il s'agit de développer de nouvelles molécules pour la prévention voire le traitement de certaines maladies : maladies liées au vieillissement, maladies cardio-vasculaires, cancers, maladies inflammatoires … Il a été montré que celles-ci sont généralement liées au stress oxydant, processus générateur de radicaux libres.

5. Stress Oxydant

5.1. Origine et dangers des radicaux libres

La production de radicaux chez les organismes vivants est un phénomène normal, régulé par le biais de divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification. En effet, l'organisme possède ses propres moyens de défense lui permettant de lutter contre les radicaux libres. Quand ce système de protection perd de son efficacité (mutation, inactivation d'enzyme, carence en vitamines) ou quand le nombre de radicaux libres (pollution, alimentation …) augmente de manière importante, il survient un stress oxydant. Celui-ci peut déclencher une suite d'événements moléculaires et cellulaires dont les conséquences sont multiples: réponse inflammatoire, modulation de la prolifération et de la différenciation

cellulaire, et même mort cellulaire. Ainsi, il est à présent reconnu que le stress oxydant est un facteur d'inflammation, de mutagénèse et qu'il peut jouer un rôle dans le développement de nombreux cancers. Il est également impliqué dans d'autres maladies comme la maladie d'Alzheimer, les troubles cardio-vasculaires, les accidents cérébro-vasculaires. De nombreuses études ont été menées pour tenter de comprendre les mécanismes du stress oxydant. Les lipides, notamment les acides gras polyinsaturés, sont particulièrement sensibles aux radicaux, ce qui explique l'effet délétère de ces espèces chimiques hautement réactives sur la structure des membranes cellulaires (Scrive, 1990; Poli et al. 1987). Les radicaux qui dérivent de l'oxygène (ERO) ont un effet particulièrement destructeur au niveau cellulaire. Ceux-ci échappent aux défenses anti-oxydantes de la cellule et modifient les composants cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides). Le stress oxydant engendré conduit à un dysfonctionnement catalytique de l'ensemble de la cellule, pouvant provoquer la mort cellulaire (Wolfe et al., 1994). Les radicaux peuvent également agir au niveau de l'ADN du noyau (Goetz et Luch, 2008), notamment au niveau des bases azotées qui le constituent (figure 4). Ainsi, grâce aux ions métalliques (fer, cuivre) transportés dans le noyau par les lysosomes, le peroxyde d'hydrogène peut conduire à la production de radicaux provoquant l'oxydation et l'altération des molécules d'ADN et pouvant entraîner mutagénèse et cancer (Imlay et al. 1998; Lloyd et Phillips, 1999). Parmi les effets attribués aux radicaux, on peut citer également la dénaturation des acides aminés qui peut entraîner la diminution d'expression, le dysfonctionnement ou l'inactivation d'enzymes (Bousquet, 1992).

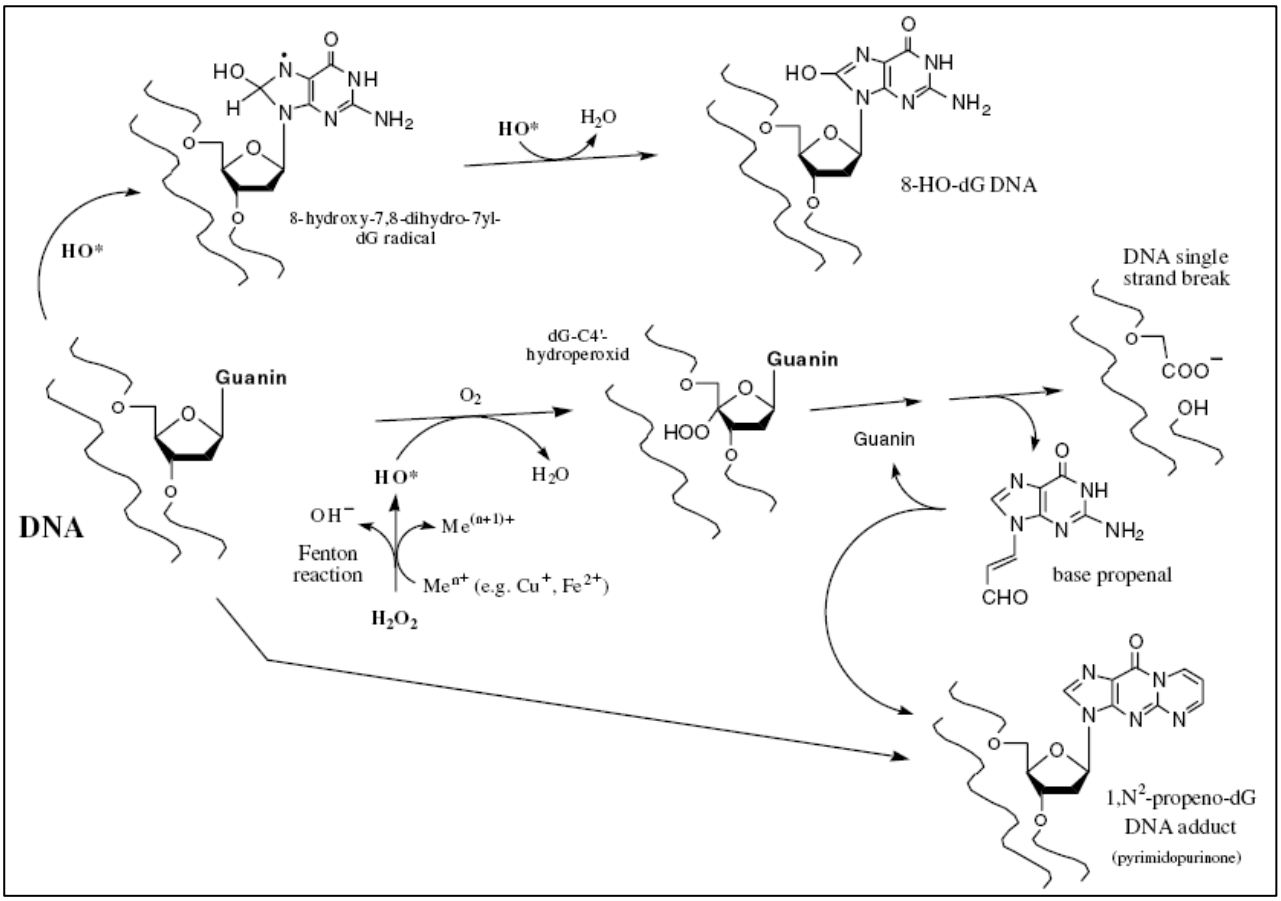


Figure 4: Dommages causés par les ERO au niveau de l'ADN (Goetz et Luch, 2008)

5.2. Les systèmes de défense contre l'oxydation

Le système de défense des organismes vivants repose principalement sur l'action d'enzymes cytosoliques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase) dont l'effet protecteur est complété par celui de différents réducteurs des structures lipoprotéiques (α-tocophérol, caroténoïdes, lycopène, ubiquinol) et du cytosol (acide ascorbique, glutathion réduit). Dans le cas d'un stress oxydant, ce système de défense est inapte à lutter contre les radicaux libres, lors de leur augmentation. Dans tous les cas, une solution consiste à renforcer le système antioxydant en fournissant à l'organisme des molécules antioxydantes par voie nutritionnelle. Très fréquemment, les antioxydants sont classés selon leur affinité pour les matrices hydrosolubles ou les matrices lipidiques.

5.2.1. Les antioxydants liposolubles

Ces molécules sont naturellement présentes au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques circulantes. Grâce à leur structure chimique, elles sont capables de réagir directement avec les radicaux libres et d'inhiber ainsi la peroxidation lipidique. Les principaux antioxydants liposolubles appartiennent à la famille des tocophérols et des caroténoïdes.

La vitamine E désigne sous un terme générique l'ensemble des différents tocophérols (la molécule de tocol constituant la structure de base) et des différents tocotriénols (figure 5). Elle est constituée d'un noyau 6-chromanol sur lequel est fixée une chaîne phytyle entièrement saturée. Les différents tocophérols (α, β, δ et γ) se distinguent par le nombre et la position des groupes méthyles fixés sur le cycle phénolique. La chaîne aliphatique confère à la vitamine E son caractère lipophile et permet son incorporation dans les membranes cellulaires. La vitamine E est le principal agent antioxydant des membranes cellulaires.

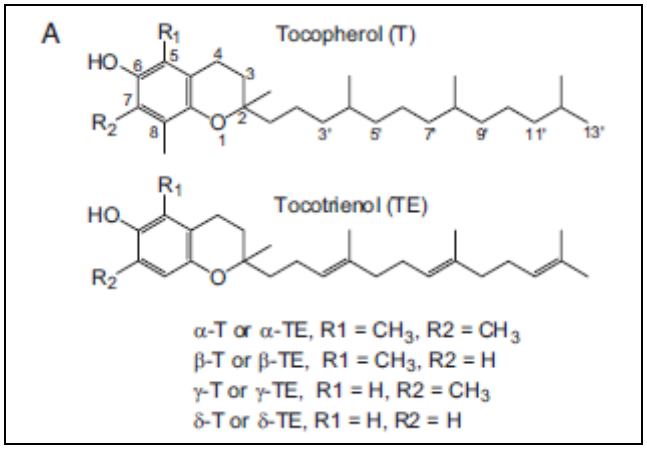


Figure 5: Structure des α, β, γ et δ-tocophérols et α, β, γ et δ-tocotriénols (Jiang et al., 2008)

Les tocophérols α, β, δ et γ détruisent les radicaux peroxyles ($ROO^{\cdot}$) et alkoxyles ($RO^{\cdot}$) grâce à leur hydroxyle phénolique, en formant des hydroperoxydes lipidiques et le radical tocophéryle. Les réactions peuvent être résumées de la façon suivante:

$$R\text{-}OO^{\cdot} + \alpha - TOH \longrightarrow R\text{-}OOH + \alpha - TO^{\cdot}$$

$$R\text{-}O^{\cdot} + \alpha - TOH \longrightarrow R\text{-}OH + \alpha - TO^{\cdot}$$

Le radical tocophéryle est peu réactif et n'induit pas de nouvelles réactions radicalaires. Le tocophérol peut être régénéré par la vitamine C (Stahl et Sies, 1997), le GSH (Chan et al. 1991) et l'ubiquinone (figure 6).

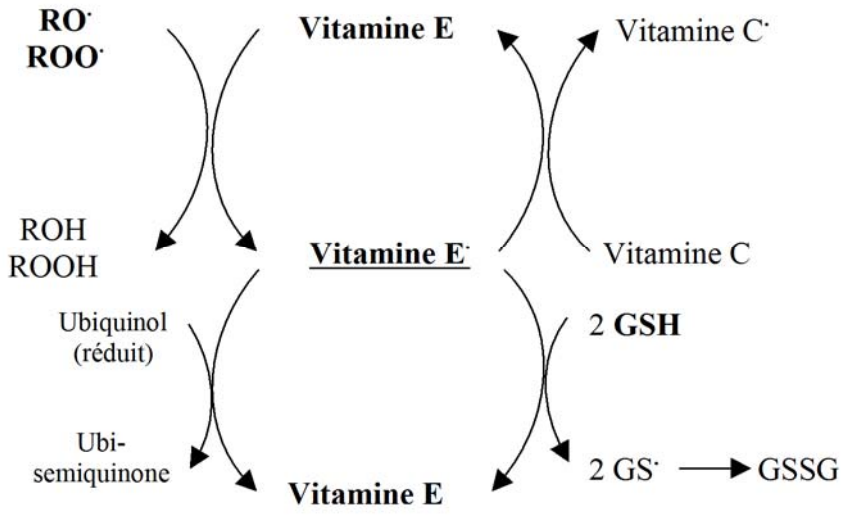


Figure 6: Régénération de la vitamine E

L'α-tocophérol est l'isomère le plus abondant et possède l'activité antioxydante la plus forte; d'après Burton et Ingold (1989), l'ordre d'efficacité des tocophérols est le suivant $\alpha > \beta, > \delta = \gamma$.

Les caroténoïdes, quant à eux, forment une grande famille de polyènes conjugués pigmentaires (famille du carotène). Ces molécules sont constituées de 40 atomes de carbones formés de 8 unités isoprènes à des extrémités pouvant être cycliques. Le précurseur des caroténoïdes est le phytoètre (molécule linéaire à 40 carbones) qui est synthétisé par condensation de 2 molécules de géranmyl-pyrophosphate (molécules à 20 C), elles-mêmes synthétisées par condensation de 4 molécules d'isoprène (figure 7). Le phytoètre subit ensuite des déssaturations, des cyclisations à ses extrémités pour former les carotènes.

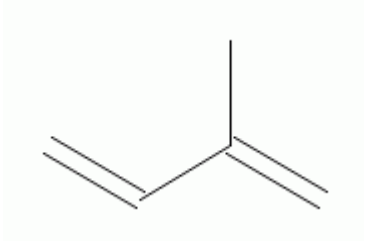


Figure 7: Molécule isoprène

Les caroténoïdes sont synthétisés uniquement par les végétaux et se transfèrent aux animaux à travers la chaîne alimentaire. Certains d'entre eux agissent alors comme provitamines, telle que le béta-carotène, précurseur de la vitamine A, et/ou interviennent à différents niveaux de l'organisme, (Liang et al., 2009).

Les caroténoïdes sont des molécules aux capacités antioxydantes similaires à celles des tocophérols. Grâce à leur longue chaîne carbonée riche en doubles liaisons, ils sont d'excellents piégeurs de radicaux peroxyles et d'oxygène singulet (figure 8). Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être finalement détruite (Stahl et Sies, 1997).

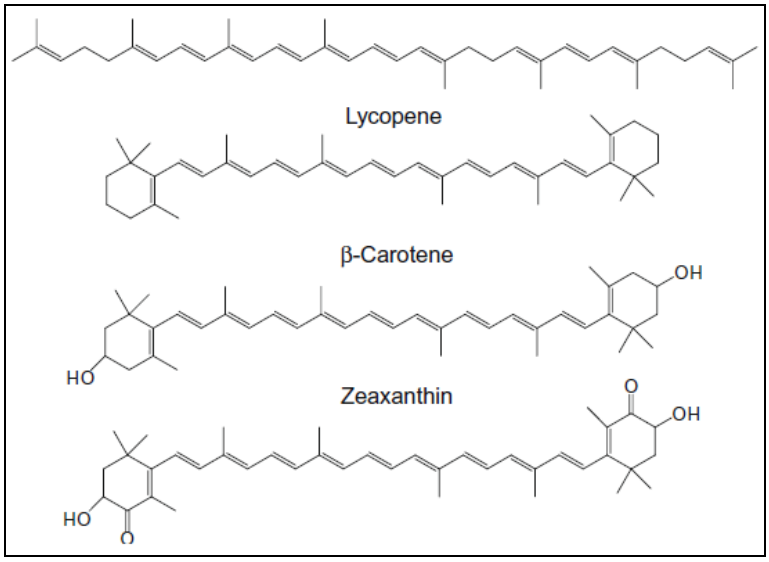


Figure 8: Exemples de caroténoides (Liang et al., 2009)

5.2.2. Les antioxydants hydrosolubles

Ce sont des petites molécules polaires qui peuvent, comme précédemment, piéger directement des espèces radicalaires ou limiter leur formation. La vitamine C et le glutathion (GSH) sont les principaux antioxydants hydrosolubles du compartiment intracellulaire.

La vitamine C, appelée aussi acide ascorbique, est apportée par l'alimentation chez l'homme. Elle est présente dans la cellule au niveau du cytoplasme et des lysosomes. Elle peut directement réagir avec des espèces oxygénées réactives comme $HO^{\cdot}$ ou $O^{\cdot}$ et former le radical semidéshydroascorbate. Peu réactif, ce dernier est rapidement oxydé en acide

déshydroascorbique. La vitamine C peut également contribuer à limiter la peroxydation lipidique en régénérant d'autres antioxydants comme la vitamine E. Il faut toutefois signaler qu'à forte dose et en présence de quantités importantes de fer, elle peut devenir prooxydante.

Certains groupements thiols (au sein des résidus cystéine des protéines ou des petits peptides) dans leur forme réduite peuvent également piéger des radicaux libres.

Les oligo-éléments (Cu, Zn, Se, Mn, Cr) peuvent aussi participer à la défense antioxydante en servant notamment de cofacteurs aux enzymes antioxydantes (le cuivre, le zinc et le manganèse de la superoxyde dismutase mitochondriale, le sélénium de la glutathion peroxydase). L'activité de ces enzymes est directement liée à l'apport en oligo-éléments par l'alimentation.

En plus des antioxydants présents dans l'organisme, il existe un intérêt croissant pour des composés d'origine naturelle, impliqués dans le système de défense de nombreux végétaux. Ces molécules suscitent l'intérêt de nombreux chercheurs qui focalisent leurs travaux sur leur extraction, leur caractérisation et l'évaluation de leurs propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel pour la prévention de certaines maladies associées aux radicaux libres. Largement distribués dans le monde végétal, les polyphénols font partie de ces composés prometteurs sur lesquels de nombreuses recherches sont menées.

Ainsi, les procyanidines du thé vert et du thé noir et les polyphénols du vin rouge ont été particulièrement étudiés (Weissburger, 1997; Tamura et Yamagami, 1994) de même que les polyphénols extraits de plantes médicinales comme l'ail (*Allium sativum L*; *Liliaceae*) (Bonjiorno et al., 2008) et le ginkgo (*Ginkgo biloba L*; *Gingkoaceae*), déjà connues pour leur richesse en flavonoïdes (Ding et al., 2009; Bozin et al., 2008) et leur intérêt dans le cadre de la prévention des maladies cardio-vasculaires et circulatoires (Bruta et al., 2008).

5.2.3. Les antioxydants polyphénoliques

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, notamment de nature polyphénolique ne cesse de croître. Dans le domaine de la nutrition, il s'agit d'étudier de nouvelles molécules pour la prévention ou le traitement de certaines maladies liées au vieillissement. Ces 10

dernières années, de nombreuses classes de substances naturelles ont été étudiées et le nombre de composés reconnus pour leurs propriétés antioxydantes intéressantes ne cesse d'augmenter.

On entend par composé phénolique, tout composé possédant un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles et incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides, etc.…). Ils sont très répandus dans les fruits et les légumes et sont donc régulièrement consommés par les personnes bénéficiant d'une alimentation "normale". Parmi ces composés, les flavonoïdes représentent la classe de substances la plus étudiée (Bors et al., 1990).

6. Les polyphénols

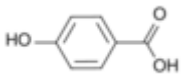
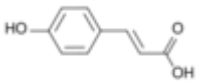
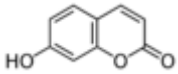
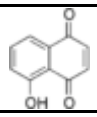
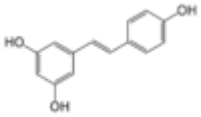
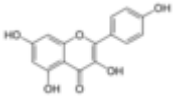
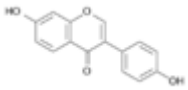
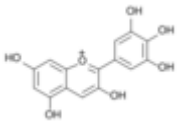
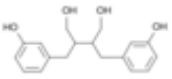
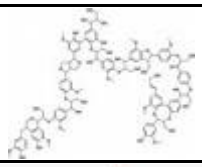
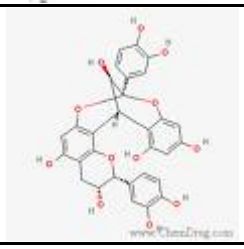
Avec plus de 8000 structures phénoliques connues, les polyphénols constituent l'une des plus grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires des végétaux présents dans toutes les parties de la plante (Beta et al., 2005).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques et possèdent d'autres fonctions (alcoolique, carboxylique…). Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Les polyphénols sont communément subdivisés en phénols simples, acides phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique) et coumarines, en naphtoquinones, en stilbénoïdes (deux cycles C6 liés par C2), en flavonoïdes, isoflavonoïdes et anthocyanes (structure C6-C3-C6) et en formes polymérisées: lignanes, lignines, tanins condensés. Ces squelettes carbonés de base sont issus du métabolisme secondaire des plantes, élaborés par la voie du shikimate.

En s'appuyant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes de composés phénoliques (Harborne, 1989) présentées dans le tableau 2:

Ce tableau s'inspire de Marcheix et al. dans Sarni-Manchado et Cheynier (2006), ainsi que de Bruneton (1999).

Tableau 2: Principales classes de composés phénoliques

COMPOSES PHENOLIQUES				
Squelette carboné	**Classe**	**Exemple**	**Formule**	**Origine**
C6	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	Acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide p-coumarique		Tomates, aïl
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoïdes	Trans-resvératrol		Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
	Anthocyanes	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
$(C6-C3)_2$	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
$(C6-C3)_n$	Lignines			Bois, fruits à noyaux
$(C6-C3-C6)_n$	Tanins condensés	Procyanidol		Raisins, kaki

Les acides phénoliques, tels que l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide gallique, sont contenus dans de nombreuses plantes agricoles et médicinales (Psotová et al., 2003; Hale, 2003). Ils ont des effets prébiotiques, antioxydants, de chélation et anti-inflammatoires. Ils sont considérés comme non toxiques. Certains d'entre eux suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (Psotová et al., 2003). Ainsi, l'acide caféique et l'acide férulique limiteraient la formation du cancer des poumons chez les souris tandis que l'acide gallique empêcherait la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale, 2003).

L'intérêt nutritionnel des flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, suite aux travaux de Szent-Gyorgyi en 1938. Contrairement à l'acide ascorbique, le jus d'agrumes permet, *in vitro*, de lutter contre le scorbut. En pratique, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active est de nature flavonoïque.

Les tanins sont des polyphénols polaires de haut poids moléculaire (> 3000 Da) d'origine végétale existant dans presque toutes les parties de la plante: écorce, bois, feuilles, fruits et racines. Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (Berthod et al, 1999). Ils sont divisés en 2 groupes : tanins hydrolysables (qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique) et tanins condensés ou catéchiques (constitués de la condensation des dérivés flavane). Des tanins peuvent également être constitués par condensation d'unités quinone (Cowan, 1999).

6.1. Rôle physiologique des composés phénoliques

Les composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des aliments et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (Lugasi et al., 2003).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des

feuilles et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (Marcheix et al., 2005). Les pigments responsables de la coloration des fleurs constituent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et des fruits (Brouillard et al. 1997).

Les phénols ont également été décrits dans plusieurs processus physiologiques: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation (Marcheix et al., 2005).

Les cellules végétales répondent aux stimuli environnementaux en synthétisant des métabolites secondaires tels que les polyphénols qui peuvent les protéger contre les agresseurs. Lorsque la plante est blessée, des composés phénoliques et phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation, au niveau de la blessure, d'un tissu cicatriciel résistant aux infections. De même, lors de l'attaque par des pathogènes, une cascade de réactions aboutissant à la résistance exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante se met en place. La première étape de ce mécanisme de défense comporterait une accumulation rapide des phénols, à l'emplacement de l'infection, qui agirait pour ralentir la croissance du pathogène. Ainsi, la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée à la teneur en composés phénoliques. Jusqu'ici mal connus, les principes actifs et leurs mécanismes d'action font maintenant l'objet d'un nombre croissant d'études (Sun et al., 2002).

6.2. Les flavonoïdes

6.2.1. Définition

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux (figure 9) : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylium, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines,

coumestanes, roténoïdes etc. Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3.

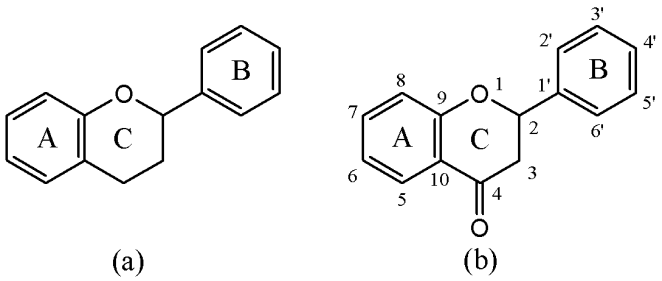


Figure 9: Motif flavan (a) et flavon(b) et numérotation systématique

Les flavonoïdes font partie d'une classe de composés naturels largement répandue chez les végétaux. Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plante, abondants dans les légumes feuilles et présents dans les aliments d'origine végétale (légumes, céréales, légumineuse, fruits, etc.) et les boissons (vin, thé, cidre bière, cacao, etc.). Cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génériques et des conditions environnementales (Lugasi et al., 2003).

6.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun : la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (figure 10). La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes.

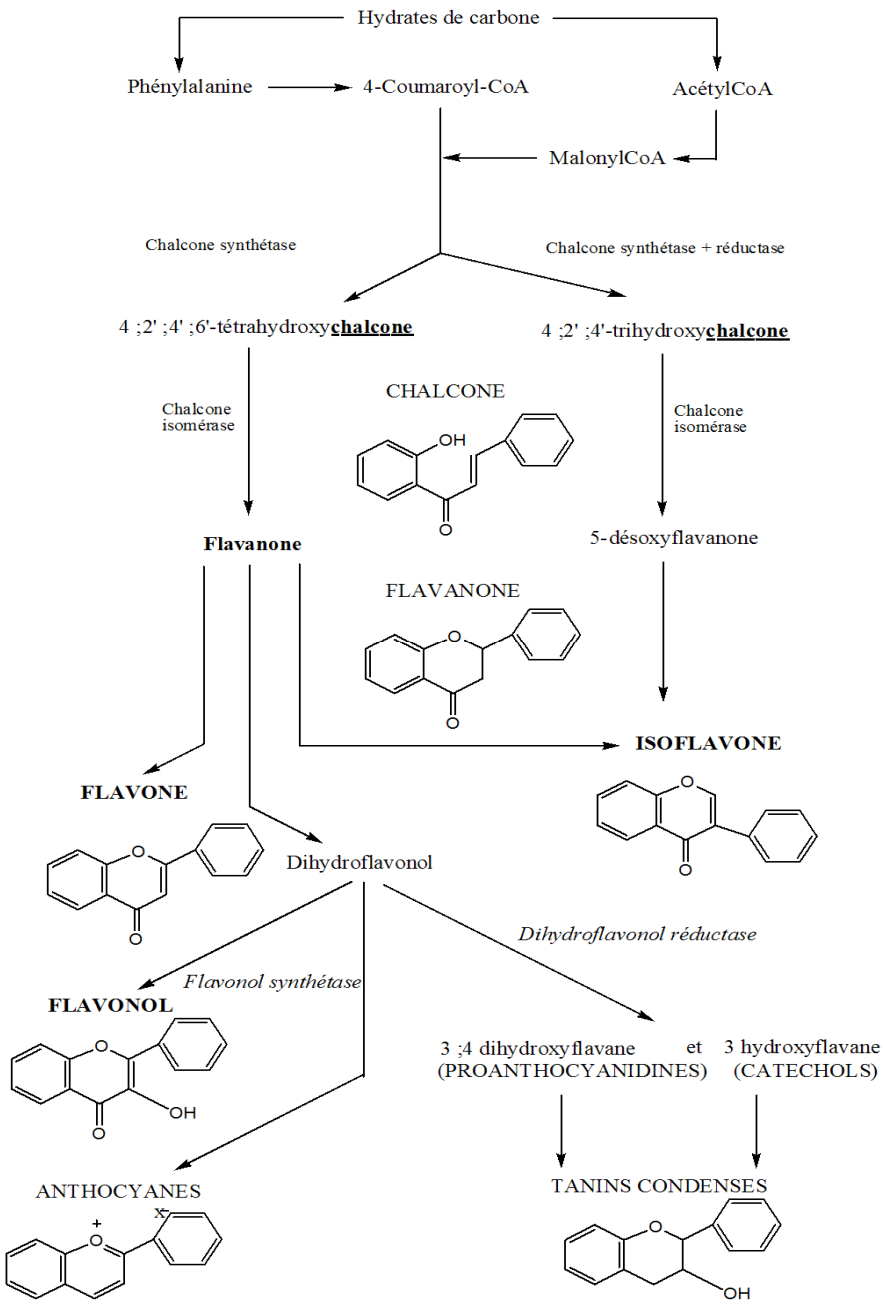
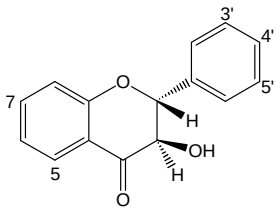


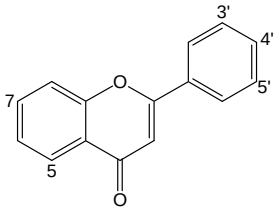
Figure 10: Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy, 1996)

Ainsi, les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C. Les différentes classes sont représentées dans la figure 11.



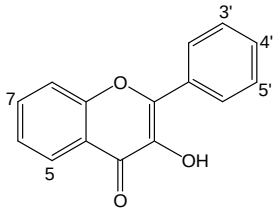
Dihydroflavonols

Flavonoide	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Taxifoline	OH		OH	OH	OH	
Fusetine			OH	OH	OH	



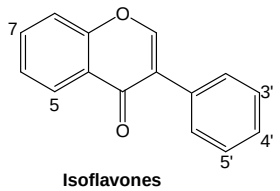
Flavones

Flavonoide	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Apigénine	OH		OH		OH	
Chrysine			OH			
Lutéoline	OH		OH	OH	OH	



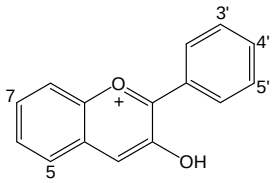
Flavonols

Flavonoide	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Kamphérole	OH		OH		OH	
Myricétine	OH		OH	OH	OH	OH
Quercétine	OH		OH	OH	OH	



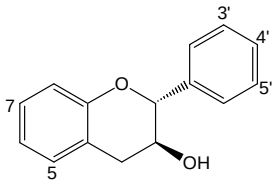
Isoflavones

Flavonoide	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Daidzeine			OH		OH	
Génisteine	OH		OH		OH	



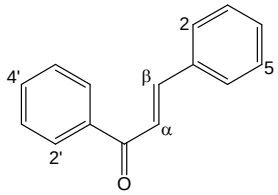
Anthocyanes

Flavonoide	Substitution					
	3	5	7	3'	4'	5'
Pelargonidine	OH	OH	OH		OH	
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH



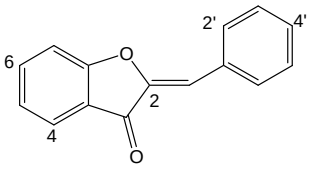
Flavanols

Flavonoide	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Catéchine	OH		OH	OH	OH	
Gallocatéchine	OH		OH	OH	OH	OH



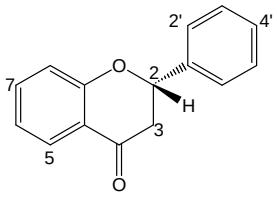
Chalcones

Flavonoide	Substitution					
	2'	3'	4'	5'	6'	4
Davidigénine	OH		OH			OH
Asebogénine	OH		OMe		OH	OH



Aurones

Flavonoide	Substitution					
	4	6	7	3'	4'	5'
Leptosidine		OH	OMe	OH	OH	
Maritimétine		OH	OH	OH	OH	



Flavanones

Flavonoide	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Eriodictyol	OH		OH	OH	OH	
Hesperitine	OH		OH	OH	OMe	
Naringénine	OH		OH		OH	

Figure 11: Différentes classes de flavonoïdes

Plusieurs enzymes (synthases, réductases, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydrolase, flavonoïde 3', hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoide glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation.

Les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyles (Rice-Evans et al., 1996), la présence de substituants sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont issues d'une hydroxylation, alkylation (méthylation ou prénylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose.

6.2.3. Intérêt biologique des flavonoïdes

La teneur en flavonol et en flavone des aliments végétaux est fortement influencée par des facteurs tels que la variation du type de croissance, la saison, le climat et le degré de maturité (Lugasi et al., 2003). La teneur en composés phénoliques des plantes est également influencée par des facteurs tels que la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement et le stockage. La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont des 3-O-glucosides ou des polymères, mais peuvent également exister sous formes aglycones. Il est estimé que la prise moyenne des flavonoïdes par l'homme est comprise entre 25 mg/jour et 1 g/jour (Wang et Mazza, 2003).

Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités : antioxydantes, anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes, et prévention des maladies cardiovasculaires. Pharmacologiquement, les aglycones sont particulièrement efficaces. Certains ont des activités hépatoprotectrices, diurétiques, vasodilatatrices, antibactériennes, chimoprotectrices, anti-inflammatoires, antidiabétiques, inhibitrices de l'aldolase réductase et antiallergiques (Sharma et al., 2008; Mercader et al., 2008; Cushnie et Lamb, 2005).

Une synthèse de quelques études concernant l'action des flavonoïdes pour la prévention de maladies est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3: Prévention de certaines maladies par les flavonoïdes

Références	Flavonoïdes	Activités
Mercader et al., 2008	56 flavonoïdes	Inhibition de l'aldolase réductase : prévention de la formation de cataracte chez les diabétiques

Cushnie et Lamb, 2005	Différents types de flavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols…)	Activité antifongique, antivirale, antibactérienne.
Ziaee et al ., 2009	Rutine	Inhibition de l'hypercholestérolémie chez des souris sous régime hypercholestérolémiant.
Hooper et al., 2008	Différentes sous classes de flavonoïdes et aliments riches en flavonoides (chocolat, thé noir, thé vert, soja, cacao)	Diminution du niveau de LDL, diminution de la pression sanguine
Lotito et Frei, 2006	Différentes classes de flavonoïdes et aliments riches en flavonoïdes	Diminution de l'oxydation des LDL du plasma et du sérum. Inhibition de l'oxydation des lipides et des protéines
Yochum et al.,1999	Apport élevé en flavonoïdes	Diminution du risque de mort par maladie coronarienne chez les femmes ménopausées
Arts et al., 2001	Catéchine	Prévention de la mort par cardiopathie ischémique
Nakagawa et al., 2000	Quercétine, rutine	limitation de la peroxidation des lipides dans les fractions lysosomales. Activité antioxydante grâce à sa localisation dans les membranes.
Hirano et al., 2001	catéchine, épicatéchine , épigallocatéchine, épicatéchine gallate, gallate d'épigallocatéchine, myricétine, quercétine, apigénine, kaempférol, et lutéoline	Inhibition de radical DPPH, inhibition de l'oxydation du LDL
Kosmider et al., 2004	Différentes classes de flavonoïdes	Activité antitumorale
Plochmann, 2007	23 flavonoïdes	Relation structure-activité cytotoxique vis-à-vis des cellules leucémiques humaines.
Nijveldt et al., 2001	Différentes classes de flavonoïdes	Piégeage direct des radicaux libres, inhibition des enzymes génératrices de radicaux libres (xanthine oxydase, acide nitrique synthase), activités antitumorale, antiinflammatoire, antiarthérosclérose, antithrombogénique, antivirale, antiostéoporotique, inhibition de la peroxydation lipidique, cytotoxicité sélective des cellules cancéreuses.

La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant et chélateur. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en flavonoïdes peut avoir des effets bénéfiques sur la santé. Grâce à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, les flavonoïdes ont démontré des effets cardioprotecteurs importants (Hooper et al., 2008 ; Lotito et Frei, 2006). Une autre étude a montré qu'un apport élevé en flavonoïdes peut diminuer la mortalité par maladies coronariennes et réduit les risques de ces maladies de 38% chez les femmes ménopausées (Yochum, 1999). Une étude réalisée sur 806 hommes âgés a démontré qu'il y a une relation inverse entre la consommation de catéchine,

un flavonoïde prédominant dans le thé, et la mortalité par maladies cardiaques (Arts et al., 2001).

Nakagawa et al. (2000) ont évalué l'efficacité antioxydante de la quercétine dans les fractions lysosomales hépatiques des souris à l'aide du générateur de radical hydrophile AAPH (2,2' azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride) et du générateur de radical lipophile AMVN (2,2' azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile). La quercétine a empêché la peroxidation des lipides dans les fractions lysosomales et a inhibé la libération des enzymes lysosomales contre AAPH et AMVN. La rutine, un dérivé glycosylé de la quercétine, a été moins efficace. Ces auteurs ont suggéré que la quercétine pouvait avoir une activité antioxydante efficace à l'interface entre la phase aqueuse et la phase lipidique dans les systèmes biologiques grâce à sa localisation dans les membranes.

Dans ce qui suit, les activités antioxydantes et anticancéreuses des flavonoïdes, faisant objet de ce travail, seront davantage détaillées.

6.2.4. Activité antioxydante des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant (Cotelle, 2001, Nijveldt, 2001, Peterson et Dwyer, 1998) : par capture directe des radicaux, par chélation des métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Notons que sous certaines conditions, les flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme des agents prooxydants et d'engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides (Van der Woude et al., 2005, Oikawa et al., 2001, Galati et al., 2001).

6.2.4.1. Activité des flavonoïdes vis-à-vis des espèces radicalaires

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante et donc une bonne stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont très souvent exprimées en terme de potentiel antiradicalaire. De nombreuses études ont montré que

l'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxyde, hydroxyle, peroxyle, et alkoxyle (Rajendran et al., 2004; Nagai et al., 2005; Krishnamachari et al., 2002; McPhail et al., 2003). La plupart des résultats proviennent d'études expérimentales de radiolyse pulsée, (Saran et al., 1987 ; Erben-Russ et al., 1987). Cette technique permet de générer et de suivre le devenir des formes radicalaires de composés antioxydants comme les flavonoïdes. Elle est souvent combinée à diverses techniques analytiques comme la spectroscopie d'absorption UV/visible afin de déterminer les constantes de vitesse associées aux processus conduisant à l'apparition et à la capture des espèces radicalaires (Bors et al., 1994 ; Bors et al., 1990; Jovanovic et al., 1994; Sichel, 1991).

Le pouvoir antioxydant de composés est le plus souvent évalué par le biais d'une méthode spectrométrique de référence (Miller et Rice-Evans, 1997; Miller et Rice-Evans, 1996 ; Miller et al., 1996a ; Miller et al., 1996b ; Miller et al., 1993). Il s'agit de mesurer la capacité d'un composé à piéger le radical 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ($ABTS^{\cdot+}$) et de la comparer à celle d'un antioxydant de référence, le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (analogue de la vitamine E mais soluble dans l'eau). Cette méthode a permis de comparer le pouvoir antioxydant de différents flavonoïdes (Rastija et Medić-Šarić, 2009 ; Montoro et al., 2005; Re et 1998; Rice-Evans et al., 1996). Celui-ci est exprimé selon un indice TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Il s'agit de la concentration (en mM) d'une solution de Trolox ayant la même activité antioxydante qu'une solution de concentration 1 mM de la substance testée. Il s'ensuit que plus l'indice TEAC est élevé plus le composé possède une activité antioxydante importante. A titre d'exemple, la quercétine fait partie des flavonoïdes présentant les indices TEAC les plus élevés (4,7) (Rice-Evans et al, 1996).

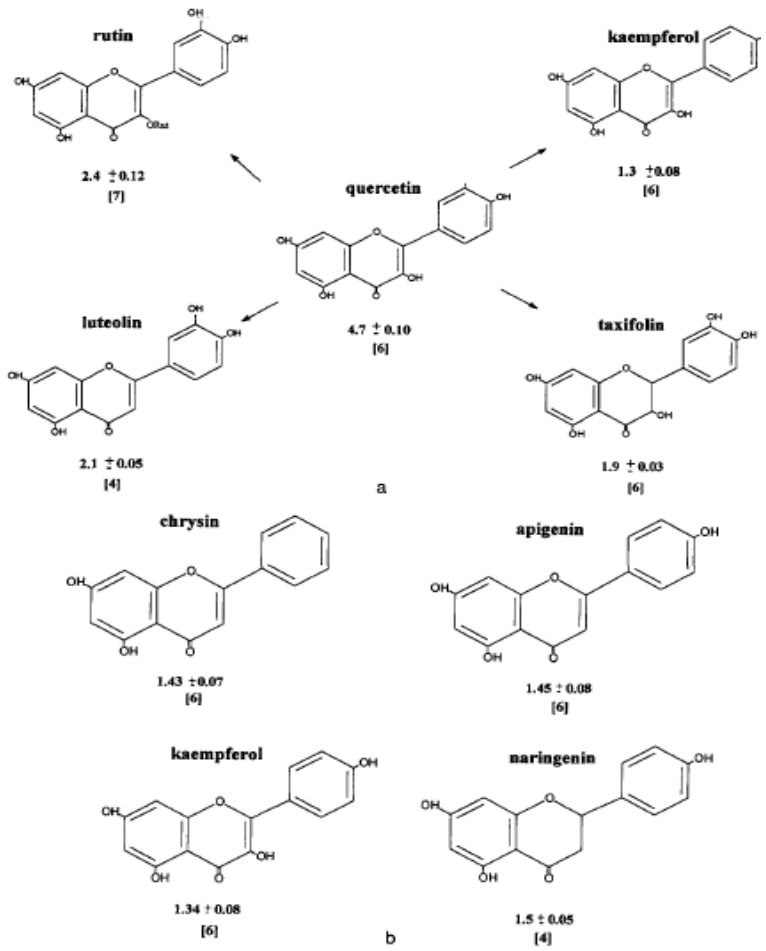


Figure 12: activité antiradicalaire de divers flavonoïdes vis-à-vis du radical ABTS.+, exprimée en indice TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) (Rice-Evans et al., 1996).

D'autres méthodes basées sur le même principe existent. On peut, par exemple, citer la méthode DPPH (Atsumi et al., 1999). Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) donne naissance à un radical stable possédant une couleur violette en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. En effet, son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette. Ce changement de coloration est suivi par spectrométrie à 517 nm (Koleva et al., 2002; Acuna et al., 2002). La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox.

6.2.4.2. Interaction des flavonoïdes avec les cations métalliques

Les ions métalliques présents dans l'organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce moins réactive H_2O_2, via la réaction de Fenton (Delattre et al., 2005).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$$

Les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques. Ils sont donc capables d'inhiber la réaction de Fenton et de limiter ainsi la production d'ERO (Moridani et al., 2003 ; Engelmann et al., 2005). La capacité des flavonoïdes à interagir avec les cations métalliques peut être mise en évidence par les modifications spectrales provoquées par la complexation. Les effets bathochromes au maximum d'absorption sont caractéristiques de la chélation du métal par le composé. Plus le complexe résultant est stable, plus le décalage vers les grandes longueurs d'ondes sera important. Les études d'électrochimie sont ici utiles pour obtenir les potentiels d'oxydation des différents couples flavonoïde/métal mis en jeu (Van Acker et al., 1998). Il est alors possible de classer les flavonoïdes selon leur capacité à chélater un cation, et par suite selon leur activité antioxydante. Il a été montré que l'un des éléments structuraux déterminants pour l'obtention d'un pouvoir chélatant est la présence d'un motif catéchol (Moridani et al., 2003).

Des études récentes suggèrent que les flavonoïdes, en subissant une réaction d'oxydoréduction en présence de métal, possèdent une activité antioxydante accrue (Moridani et al., 2003; De Souza et al., 2004; Afanas'eva et al., 2001 ; Bodini et al., 1999). La forme radicalaire obtenue dans ces conditions, une semiquinone, serait plus active que la forme initiale. De Souza et al. (2004) suggèrent que l'augmentation de l'activité antioxydante des flavonoïdes après leur complexation avec des métaux est dûe à la présence de centres de dismutation de superoxyde supplémentaires. De même, Afnas'ev et al. (2001) ont montré que le complexe Cu(rutine)Cl_2 présente une bonne capacité à piéger les radicaux libres *in vivo* et *in vitro* et présente une activité antioxydante 2 à 30 fois plus importante que la rutine non complexée. Ces auteurs expliquent ce résultat par l'acquisition au sein du complexe rutine-cuivre d'un centre de dismutation de superoxyde supplémentaire.

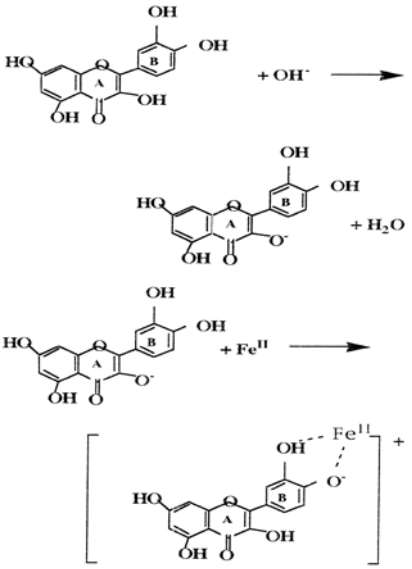


Figure 13: Complexation de la quercétine avec le fer II au niveau du groupement catéchol (Bodini et al., 1999)

Au cours de ce processus, des réactions de disproportionation peuvent avoir lieu dans lesquelles deux formes semiquinones réagissent ensemble pour former deux espèces neutres : une forme oxydée (la forme quinone) et une autre forme (généralement la forme initiale) comme montré dans la figure 14.

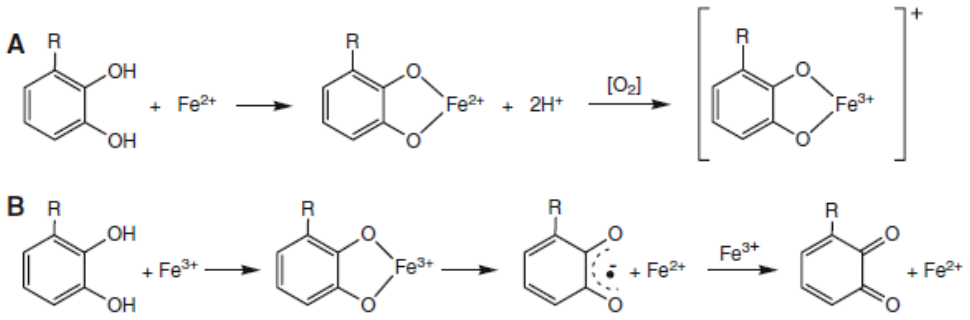


Figure 14:Coordination du Fe2+ avec un polyphénol et transfert d'électrons en présence d'oxygène générant le complexe Fe3+-polyphénol. B : Coordination du Fe3+ avec un polyphénol, réduction de l'ion et formation de la semiquinone, et réduction du Fe3+ ,. R=H, OH

Les études portant sur les interactions entre les flavonoïdes et les métaux restent peu nombreuses et les conclusions conduisent parfois à des contradictions lorsque l'effet prooxydant des flavonoïdes en présence de métaux de transition est évoqué (Yamashita et al., 1999; Galati et al., 1999).

6.2.4.3. Action des flavonoïdes dans le processus de peroxydation lipidique

Les deux modes d'action des flavonoïdes vis-à-vis des phénomènes oxydatifs évoqués précédemment pourraient expliquer l'effet de ces composés dans le processus d'oxydation lipidique dans la mesure où celui-ci implique la présence de radicaux libres et d'ions métalliques.

Les lipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Leur peroxydation est un processus qui intervient dans certaines pathologies impliquant le stress oxydant (Delattre et al., 2005). La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables notamment de la diminution de la fluidité membranaire. L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) est en partie la cause de lésions liées à l'accumulation de dépôts lipidiques (essentiellement cholestérol) dans les vaisseaux sanguins. Depuis longtemps, le mécanisme d'oxydation des LDL fait l'objet de nombreuses études visant une meilleure compréhension de maladies comme l'artériosclérose. Depuis les résultats obtenus par Rankin et *al.* (Rankin, 1988 ; De Whalley. 1990) démontrant le rôle inhibiteur des flavonoïdes sur l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines de faible densité (LDL), cette famille de substances naturelles a suscité beaucoup d'intérêt.

Il est admis que les acides gras polyinsaturés sont oxydés en présence de radicaux libres et d'un cation métallique (Fe^{2+} ou Cu^{+}). Dans les équations ci-dessous, LH désigne un acide gras polyinsaturé, $X^{\cdot}$ un radical libre, $L^{\cdot}$ le radical alkyl dérivant de l'abstraction de $H^{\cdot}$ par le radical libre $X^{\cdot}$, $LOO^{\cdot}$ le radical peroxyle, LOOH l'hydroperoxyde, et $LO^{\cdot}$ le radical alkoxyle.

Le mécanisme de la peroxydation lipidique comporte plusieurs étapes :

$LH + X^{\cdot} \rightarrow XH + L^{\cdot}$ (1)

$L^{\cdot} + O2 \rightarrow LOO^{\cdot}$ (2)

$LOO^{\cdot} + LH \rightarrow LOOH + L^{\cdot}$ (3)

$LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LO^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}$ (4)

La première étape (1) correspond à la phase d'initiation de la peroxydation lipidique ; les étapes (2) et (3) à la propagation du radical. Un ion Fer (II) réagit généralement avec l'hydroperoxyde produit lors de l'étape (3) pour former un radical alkoxyle et un ion hydroxyle (4). Simultanément, diverses réactions de terminaison peuvent avoir lieu :

$L^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow$ L-L

$LO^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow$ LOL

$LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow$ LOOL + O_2

$LOO^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow$ LOOL

Les flavonoïdes peuvent intervenir à différents niveaux de ce processus de peroxydation (Leake et al., 1998a ; Leake et al., 1998b). Ils sont capables de capturer directement les espèces radicalaires et ainsi d'interrompre l'étape de propagation radicalaire. Par ailleurs, étant de bons chélatants, ils sont capables de coordiner le fer libre (Ferrali et al., 1997; Bravo et al., 2001 ; Zhou et al., 2001a ; Zhou et al., 2001b; Van Acker et al., 1998; Moridani et al., 2003 ; Engelmann et al., 2005). Enfin, les flavonoïdes présents à la surface des membranes sont capables de régénérer la vitamine E, l'un des antioxydants essentiels dans la protection des membranes cellulaires (Jessup et al., 1990 ; Wickramasinghe et al., 1996 ; Negre-Salvayre et al., 1995).

6.2.4.4. Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsables de l'inhibition de nombreuses enzymes dont certaines sont impliquées dans le stress oxydant : la glutathion S-transférase, les lipoxygénases, les cyclooxygénases, la xanthine oxydase, et les oxyde nitrique synthétases (NOS). Certains flavonoïdes inhibent les kinases. C'est le cas par exemple de la quercétine et la myricétine qui inhibent la phosphoinositide 3-kinase, protéine intervenant dans la signalisation cellulaire. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le flavonoïde et l'enzyme étudiés (Chi et al., 2001, Pinto et al,. 2005; Da Silva et al., 1998 ; Perusse et al., 2003 ; Borbulevych et al., 2004 ; Skrzypczak-Jankun et al., 2003).

6.2.4.4.a. Inhibition de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) et la xanthine déshydrogénase sont impliquées dans le métabolisme de transformation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Cette réaction s'accompagne de la génération des ERO, $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 à partir du dioxygène. La voie de la xanthine oxydase est importante dans les processus d'oxydation des tissus, particulièrement après une ischémie-reperfusion (Sanhueza, 1992). La xanthine déshydrogénase est la forme de l'enzyme sous conditions physiologiques. Sous conditions ischémiques sa configuration change en XO.

La quercétine et la silibine ont montré une importante activité inhibitrice de la XO, conduisant par conséquent à une réduction des dommages oxydatifs (Chang et al., 1993; Iio et al., 1986; Shoskes et al., 1998). Cos et al. (1998) ont étudié les relations entre la structure des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la xanthine oxydase. Ils ont montré que la lutéoline est le plus puissant inhibiteur de la XO. En effet cette molécule répond à toutes les conditions décrites par ces auteurs pour qu'une molécule soit un bon inhibiteur de la xanthine oxydase, à savoir la présence de groupement OH en position C5 et C7, la présence d'une double liaison au niveau C2-C3 ainsi que l'absence du groupement OH au niveau C3.

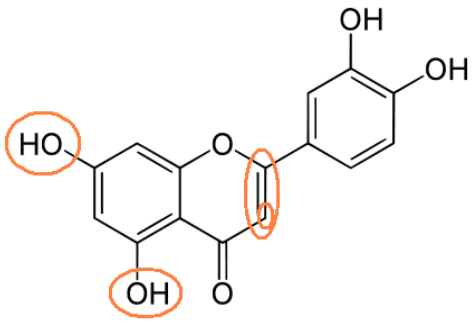


Figure 15: Les fonctions dans la structure de la lutéoline lui attribuant une forte activité inhibitrice de la xanthine oxydase.

A l'aide de méthodes de chimie quantique, une similarité structurale et électronique du cycle purique de la xanthine et du cycle A des flavonoïdes a été mise en évidence (Da Silva et al., 2004). D'autres facteurs peuvent entrer en jeu comme l'absence de substitution en position 6 ou la présence de fonctions hydroxyles au niveau des positions 7, 3 et/ou 5 (Cotelle et al., 2001). Les flavonoïdes présentant ces différents critères constituent des inhibiteurs potentiels. Différents modes d'inhibition ont été suggérés : compétitifs, non compétitifs ou

mixtes (Cotelle et al., 2001; Lin et al., 2002). Dans le dernier cas, le flavonoïde est capable de se lier aussi bien à l'enzyme native qu'au complexe enzyme/substrat.

6.2.4.4.b. Inhibition de l'oxyde nitrique synthase

L'oxyde nitrique (NO) est produit par différents types de cellules y compris les cellules endothéliales et les macrophages. Bien que la synthèse de l'oxyde nitrique par l'oxyde nitrique synthase (NOS) soit importante pour le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins, une production excessive peut être à l'origine de dommages oxydatifs (Huk, 1998). En effet, l'oxyde nitrique peut réagir avec les radicaux libres pour produire le peroxynitrite très réactif (Nijveldt, 2001).

Plusieurs flavonoïdes dont la quercétine ont montré un effet réducteur des dommages causés par l'ischémie-reperfusion en interférant avec l'activité de la NOS inductible (Shoskes, 1998). Une étude réalisée par Guerra et al. (2006) suggère que l'inhibition de l'expression de la NOS inductible par les flavonoïdes est à l'origine de leur activité anti-inflammatoire. D'autres publications traitent de ce sujet et font référence aux flavonoïdes comme inhibiteurs potentiels de la NOS (Harris et al., 1997; Chiesi et al., 1995; Man-Ying Chan et al., 2000; Chen et al., 2001).

6.2.4.4.c. Inhibition des lipoxygénases

Les lipoxygénases constituent une classe d'enzymes à fer non-hème responsables de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Delattre et al., 2005). L'hydroperoxyde produit intervient dans divers processus cellulaires selon l'acide gras initial et la lipoxygénase considérés. L'oxydation de l'acide arachidonique par la lipoxygénase donne lieu à la synthèse de lipoxines et de leucotriènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Fauconnier et Marlier, 1996).

Le cycle catalytique des lipoxygénases a été très étudié et le mécanisme d'oxydation des acides gras est relativement bien connu. Le mécanisme d'inhibition de ces enzymes par les flavonoïdes a également fait l'objet de plusieurs études (Terao et al., 1998; Jessup et al., 1990; Wickramasinghe et al., 1996 ; Da Silva, 1998. Perusse, 2003). La molécule la plus étudiée est la quercétine qui est considérée comme responsable de l'inhibition de la 3-

lipoxygénase. Ce flavonoïde semble se dégrader au niveau de l'enzyme, et le produit de dégradation (l'acide protocatéchuique) serait responsable de l'inhibition de l'enzyme. Sadik et al. (2003) ont montré que les flavonoïdes de cacao inhibent la 15-lipoxygénase en étudiant l'activité de 18 flavonoïdes différents sur les 15-lipoxygénases de lapin et de soja. Une relation structure-activité a été établie. En comparant les CI50 de l'inhibition de la 15-lipoxygénase de réticulocytes de lapin par plusieurs flavonoïdes, ces auteurs ont montré que la présence de groupes hydroxyles dans la structure de la molécule n'est pas nécessaire pour cette activité. Par ailleurs, l'arrangement catéchol renforce l'inhibition : en présence de cet élément structural, le pouvoir inhibiteur de l'enzyme est inversement corrélé avec le nombre de groupes hydroxyles. Il a également été montré que la présence d'une double liaison entre les carbones C2 et C3 renforce l'effet inhibiteur. Les flavonoïdes lutéoline (IC50=0.6 µM), baicaléine (CI50 =1 µM) et fisétine (CI50 =1.5 µM) ont été identifiés comme étant les plus inhibiteurs de l'enzyme d'origine animale.

Ces mêmes auteurs ont étudié le mode d'action de la quercétine sur la lipoxygénase. Ils ont montré que la présence de quercétine influence l'activité de l'enzyme quelle que soit son origine (animale ou végétale), lors de l'oxydation de l'acide linoléique, en exerçant trois effets : la prolongation du temps de latence, une diminution rapide de la vitesse initiale avant la fin du temps de latence en présence de substrat.

6.2.4.5. Prooxydation

Un nombre croissant d'études traitent de l'effet prooxydant des flavonoïdes. Certains auteurs attribuent cet effet à la capacité des flavonoïdes à s'autooxyder, en engendrant les formes semiquinones et quinones ainsi que la production de ERO (Metodiewa et al., 1999 ; Awad 2000; van der Woude et al., 2005 ; Galatti et al., 1999 ; Awad et al., 2001 ; Awad et al., 2002a ; Awad et al., 2002b). La présence d'une double liaison en position 2,3 et de la fonction carbonyle en position 4 permet une isomérisation de la forme quinone en méthides de quinones connues pour être responsables d'altérations sur les acides nucléiques et les acides aminés. Les mécanismes ne sont pas encore clairement définis, mais récemment plusieurs modes d'action ont été proposés.

Plusieurs auteurs ont étudié la formation d'adduits par création de liaisons covalentes entre des formes quinones ou leurs isomères avec le glutathion (GSH) (van der Woude et al.,

2005 ; Awad et al., 2002 ; Awad et al., 2003). Ces études ont pour but de suivre, par spectroscopie, la formation d'adduits en présence d'un flavonoïde et d'une protéine et plus précisément de groupements thiols. Awad et al. (2002) ont montré la formation de l'adduit quercétine glutathionyl dans la lignée cellulaire mélanomique possédant la tyrosinase. Les résultats obtenus indiquent que l'adduit est formé à l'intérieur de la cellule et est excrété par la suite dans le milieu de culture, ce qui indique une métabolisation prooxidative de la quercétine dans les cellules. Awad et al. (2003) ont étudié la formation de flavonoïdes quinone / méthides de quinones. Ces auteurs ont indiqué que bien que l'adduit quercétine cystéinyl ne présente pas le caractère réversible des adduits glutathion, il semble néanmoins être instable.

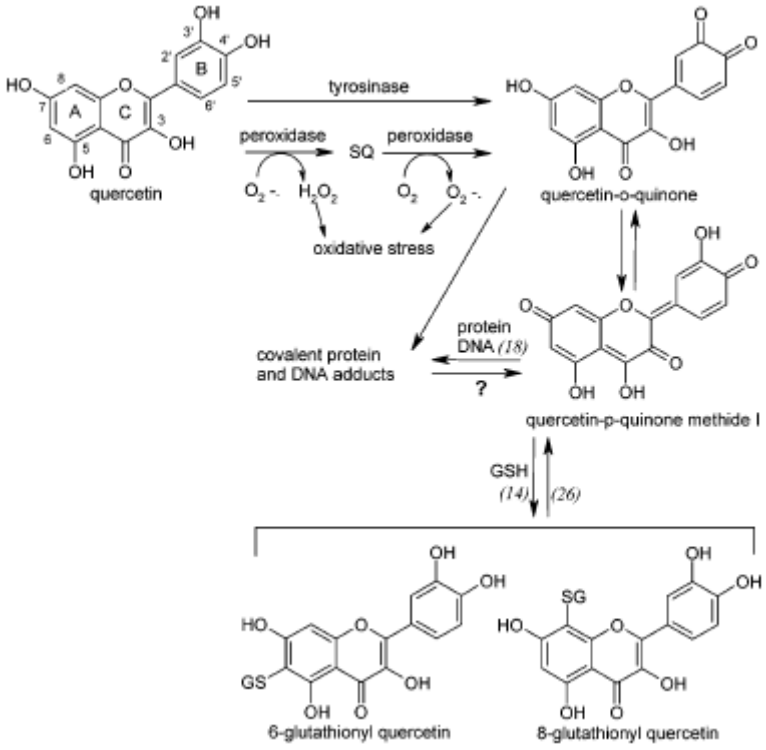


Figure 16: Représentation de l'activité prooxydante de la quercétine permettant la formation de 6- et 8-quercétine glutathionyl (Van Der Wood et al., 2005).

Van Der Wood et al. (2005) ont montré que la formation des adduits de la quercétine avec le glutathion, les protéines et l'ADN est indépendante du contenu des cellules en enzymes oxydatives dans (Figure 16). Cependant le caractère transitoire de ces adduits pourrait limiter ou provoquer leur impact biologique.

D'autres études ont permis de mieux comprendre le rôle prooxydant des flavonoïdes sur l'ADN. La formation d'adduits figure toujours dans les modes d'action proposés, mais certains auteurs suggèrent l'intervention de métaux de transition. Ainsi, Yamashita et al. (1999) proposent un mécanisme au cours duquel la formation des espèces quinone et semiquinone implique des co-réactifs. Les ERO jouent alors le rôle d'oxydant et l'espèce H_2O_2 est formée puis se complexe avec le cuivre(II). Le complexe Cu(I)OOH formé est supposé être responsable de l'altération des bases nucléiques.

6.2.5. Relations structure-activités de flavonoïdes

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relations structure-activités (RSA) dans le cas des flavonoïdes. Ainsi, il a été montré que les activités des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels. Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs (Wolfe et Liu., 2008; Mercader et al., 2008 ; Khlebnikov ; 2007 ; Sroka et al., 2005 ; Afanas et al., 2001 ; Van Acker et al., 1996) et sont présentés dans les figures 17 et 18.

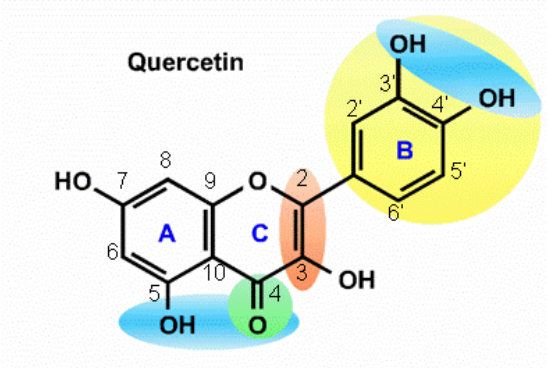


Figure 17: Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante

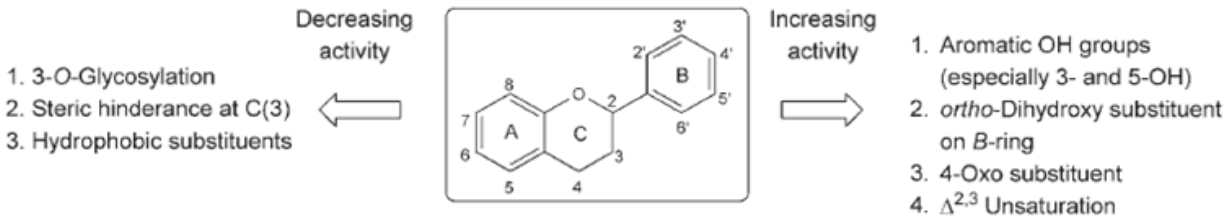


Figure 18: Relation entre la structure de flavanes et leur capacité à piéger des radicaux libres (Ma et al., 2007)

Ces éléments sont :

- la présence d'une fonction catéchol sur le cycle B

La configuration des hydroxyles au niveau du noyau B est le paramètre structural le plus déterminant pour l'activité antioxydante. Ces hydroxyles sont des donneurs d'hydrogène et d'électrons vis-à-vis des radicaux hydroxyles, peroxyles et peroxynitrine, conduisant à des espèces radicalaires beaucoup plus stables. La présence d'une fonction catéchol (motif ortho-diphénol) sur le cycle B est étroitement corrélée à une activité antioxydante importante du fait de la stabilisation du radical phénoxy généré lors du piégeage par la fonction phénolique située en ortho.

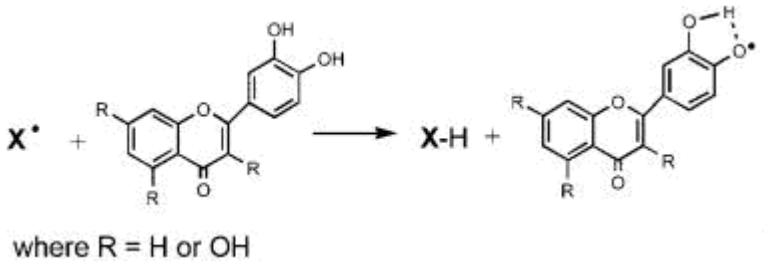


Figure 19: Rôle du groupement catéchol dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (Musialik et al., 2009)

- la présence d'un groupement hydroxyle en position 3

L'hétérocycle C des flavonoïdes contribue à leur activité antioxydante lorsqu'elle comporte un groupement hydroxyle en position 3. La capacité de ces molécules à piéger les radicaux dépend fortement de la présence de ce 3-OH libre. Dans le cas des flavonols, la glycosylation ou la méthylation de ce groupement conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante (Musialik et al., 2009 ; Ma et al., 2007; Rice-Evans et al., 2006 ; Burda et al., 2001). La présence d'un groupement hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'activité antioxydante dans le cas des isoflavones (Heim et al., 2002).

- la présence d'un motif énone au niveau du cycle C

Une double liaison entre les carbones C2 et C3, conjuguée à la fonction carbonyle en C4 permet une bonne stabilisation du radical phénoxy par délocalisation électronique (Musialik et al., 2009). La présence ou l'absence de chacune de ces deux caractéristiques structurales est déterminante dans la distinction des différentes classes de flavonoïdes.

Différentes études ont été menées pour comprendre leur rôle dans l'activité antioxydante de la quercétine. La comparaison des activités respectives de la quercétine et de la dihydroquercétine (taxifoline) suggère que la fonction carbonyle et la double liaison en C2-C3 permettent une meilleure activité antioxydante (Burda et al., 2001; Rice-Evans et al., 2006; Van Acker et al., 1996).

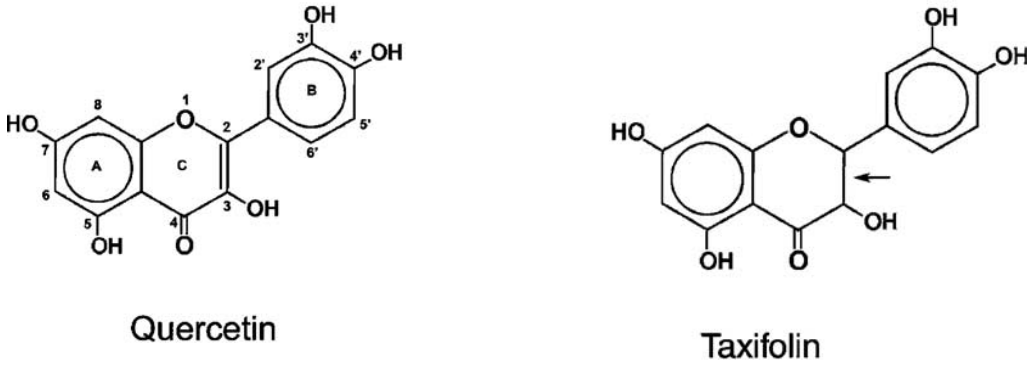


Figure 20: Structures chimiques de la quercétine et de la taxifolin

La majorité des recherches effectuées indiquent que les molécules possédant ces deux éléments de structure sont plus actives que celles qui sont dénuées de l'une, ou de l'autre, ou des deux (Rice-Evans et al., 1996 ; ; Sekher Pannala, 2001; Burda, 2001). Ces résultats s'expliquent par la conjugaison des cycles A et B qui permet la résonance du noyau aromatique, stabilisant ainsi le radical phenoxy généré au niveau de la fonction catéchol **(**Rice-Evans et al., 1996). A titre d'exemple, on peut citer l'activité antioxydante de la quercétine (TEAC = 4,7) qui est presque deux fois plus importante que celle de la catéchine (TEAC = 2,4) en utilisant le

test ABTS (figure 21).

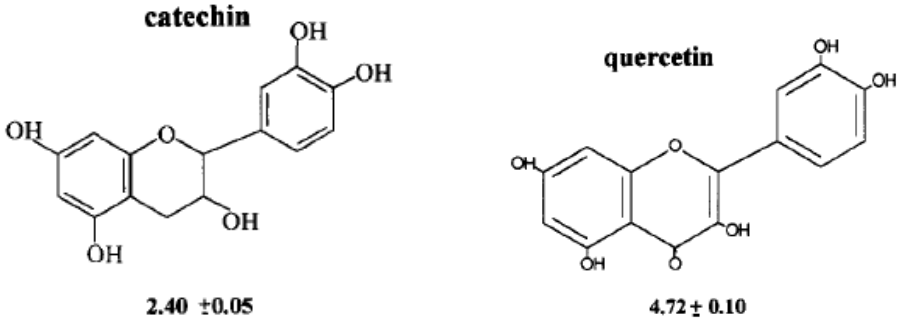


Figure 21: Structures et valeurs TEAC du test ABTS de la catéchine et de la quercétine (Rice-Evans et al., 1996).

- la O-méthylation

Différents travaux ont mis en évidence des écarts de pouvoir antioxydant entre les flavonoïdes hydroxylés et les flavonoïdes méthylés. Les résultats obtenus ont été attribués à la différence d'hydrophobie et de planéité des molécules. Si l'on reprend l'exemple de la quercétine, celle-ci est un puissant piégeur du radical peroxyl en comparaison avec ses dérivés O-méthylés et O-glycosylés (Dugas et al., 2000). La diminution de l'activité antioxydante associée à la O-méthylation peut s'expliquer par un effet stérique qui modifie la planéité du flavonoïde, et par suite sa capacité à délocaliser les électrons. Bien qu'il ne soit pas possible d'établir un lien direct entre le nombre de substituants méthoxyles et hydroxyles et l'activité antioxydante d'un flavonoïde, on peut noter que la méthylation d'un hydroxyle du cycle B est particulièrement défavorable à l'activité antioxydante. Ainsi, dans le cas de la myrigalone B (2',6'-dihydroxy-4'-méthoxy-3',5'-diméthyl-dihydrochalcone) et de l'angolétine (2',4'-dihydroxy-6'-méthoxy-3',5'-diméthyl-dihydrochalcone, le passage d'une configuration 6-OH/ 4-OMe à une configuration 6-OMe/4-OH permet une récupération complète de l'activité antioxydante, associée à une récupération de la planéité de la molécule (Mathiesen et al., 1997). Toutefois, ces résultats sont à moduler en fonction des conditions dans lesquelles l'activité antioxydante est mesurée (nature du milieu, nature des radicaux). En effet, il se peut que des flavonoïdes polyméthoxylés soient efficaces pour le piégeage de radicaux dans des milieux lipidiques en raison d'une meilleure affinité pour ceux-ci et que ces mêmes composés soient totalement inefficaces dans des milieux plus hydrophiles.

6.2.6. Propriétés anticancéreuses (et/ou de prévention des cancers) de flavonoïdes

Selon les dernières observations du Fonds Mondial de la Recherche contre le Cancer publiées en 2007, on estime que 30% de tous les cancers sont directement reliés à la nature du régime alimentaire des individus, ce pourcentage pouvant même atteindre jusqu'à 70% dans le cas des cancers du système gastro-intestinal (œsophage, estomac et côlon). Parmi les facteurs alimentaires ayant le plus d'influence sur le développement du cancer, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et légumes était associée à une baisse importante du risque de développer la maladie. Dans les études cliniques, les personnes

consommant le moins de fruits et légumes sont environ deux fois plus susceptibles de développer certains cancers que celles ayant la plus forte consommation de ces aliments.

Des études sur la composition chimique de certains fruits et légumes ont montré que la richesse de ces plantes en certains métabolites tels que les flavonoïdes est à l'origine de leur efficacité dans la prévention et le traitement de cancer.

In vitro, les flavonoïdes sont considérés comme des agents antiprolifératifs et cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Certaines autres études menées sur des animaux ainsi que des études épidémiologiques se sont intéressées à évaluer le pouvoir anticancéreux des flavonoïdes *in vivo*.

Quelques études concernant l'effet anticancéreux de flavonoïdes sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4: Propriétés anticancéreuses, in vitro et in vivo de certains flavonoïdes

Références	**Flavonoïdes**	**Cibles**	**Résultats**
Jeong et al., 2009	Quercétine	cellules cancéreuses : SK-Br3 et MDA-MB-453 et HeLa	***In vivo*:** activité antiproliferative Arrêt de cycle cellulaire en phase G1.
Li et al. 2009	Oroxylin A		***In vivo*:** Inhibition de la croissance de cellules cancéreuses HeLa transplantées par xénogreffes à des souris. ***In vitro***: inhibition de la prolifération de cellules HeLa
Lin et al. 2009	Rutine	Cellules leucémiques murines WEHI-3	***In vivo***: inhibition des cellules cancéreuses dans le foie et la rate des souris *BALB/c* injectées avec des cellules WEHI-3
Chen et Dou, 2008	Apigénine, lutéoline, quercétine et kaempférol	Cellules Jurkat T, 22Rv1et MDA-MB-231.	***In vitro***: mort cellulaire par apoptose de cellules Jurkat T ***In vivo:*** inhibition de la croissance des cellules MDA-MB-231 xénogreffées dans des souris Inhibition de la croissance des tumeurs
Chang et al ; 2008	Protoapigenone	Cellules cancéreuses MDAH-2774, SKOV3 HeLa, C33A et 468 et T47D	***In vivo*:** activité antiproliférative Inhibition du cycle cellulaire en phase S et M/G2 Induction de l'apoptose de cellules ***In vivo***: suppression de la croissance de cellules MDAH-2774 injectées à des cellules

Durgo et al., 2007	Quercétine, fisétine, myricétine, lutéoline et naringine	Cellules cancéreuses HEp2 et CK2	Cytotoxicité vis-à-vis de cellules CK2 et HEp2
Susanti et al., 2007	Kaempférol-3-O-(2˝,6˝-di-O-p-trans-coumaroyl)-b-glucopyranoside Naringenine Kaempférol Kaempférol-3-O-D-glucoside	Cellules MCF7	Activité antiproliférative
Morley et al., 2007	Tangérétine et nobilétine	Cellules cancéreuses MDA-MB-435, MCF-7 et HT29	Activité antiproliférative : Arrêt du cycle cellulaire de trois lignées en phase G1
Teng et al., 2006	Isorhamnétine	Cellules de cancer hépatocellulaire humain :BEL-7402	Activité antiproliférative Fragmentation et condensation de chromatine de cellules
Bacon et al., 2003	Quercétine	Hépatocytes humains	Modulation des phases I et II de l'expression d'enzyme dans les hépatocytes
Caltagirone et al., 1997	Quercétine	Cellules cancéreuses SK-LU1, SW900, ChaGo-K-1, H441, H661, A549.	Inhibition de la prolifération des cellules
Kuo, 1996	Quercétine, kaempférol, biochanin-A, naringine, catéchine, génistéine, daidzeine, rutine, naringenine	Cellules cancéreuses Caco2 et HT29	activité antiproliferative, apoptose

Un certain nombre de flavonoïdes fréquents dans les légumes, les fruits et certaines herbes consommés quotidiennement par l'homme ainsi que leurs structures, leurs sources alimentaires et leurs activités chémopréventives ont été également décrits par Pan et Ho (2008).

En plus des travaux effectués *in vitro* sur des cellules ou *in vivo* sur des animaux afin d'évaluer le pouvoir anticancéreux de flavonoïdes, d'autres études épidémiologiques ont été réalisées afin d'étudier l'influence du régime alimentaire riche en polyphénols et/ou en flavonoïdes sur la prévention de certains cancers. Plusieurs de ces études sont synthétisés dans le tableau 5:

Tableau 5: Quelques études épidémiologiques mettant en évidence la relation entre la consommation de flavonoïdes et le cancer

Références	**Flavonoïdes ou source de flavonoïdes**	**Echantillons**	**Effets des flavonoïdes sur le cancer**
Bosetti et al., 2005	Flavanones, flavanols, flavones, flavonols, Anthocyanidins, isoflavones	2569 femmes atteintes de cancer de sein, 2588 femmes contrôles	les flavones diminuent le risque de cancer du sein.
Fink et al., 2007	Flavones, isoflavones	1210 femmes	Réduction de la mortalité pour les malades de cancer du sein post ménopausique
Knekt et al., 1997	Flavonoïdes	9959 Hommes et femmes	Diminution du risque de cancer dans tous les sites combinés
Le Marchant et al., 2000	Quercétine, oignons, raisin blanc	582 malades et 582 contrôles	Diminution de la réapparition du cancer du poumon.
Knekt et al., 2002	Quercétine	10054	Diminution des incidences du cancer du poumon
	Myricetine		Diminution des risques du cancer de la prostate
Garcia-Closas et al., 1999	Kamphérol, Quercetin	354 malades 354 contrôles	Diminution des risques de cancer de l'estomac
Arts et al., 2002	Catéchine	34651 femmes	Diminution des incidences du cancer du rectum
De stefani et al., 1999	Flavonoïdes	133 malades 393 contrôles	Diminution du risque de cancer de la cavité buccale, du pharynx, du larynx et l'oesophage

Les études épidémiologiques mentionnées dans le tableau 5 indiquent que différentes classes de flavonoïdes présentent une activité anticancéreuse. D'autre part, la consommation de flavonoïdes diminue le risque de plusieurs types de cancer: cancer du sein, du poumon, de la prostate, de l'estomac, du rectum etc (Bosetti et al., 2005, Knekt et al., 1997, Knekt et al., 2002 Garcia-Closas et al., 1999, De stefani et al., 1999).

Fink et al., 2007, ont également que la consommation de flavones et d'isoflavones diminuent le risque de la mort pour les femmes atteintes d'un cancer de sein post ménopausique. Le Marchant et al., 2000 ont mis en évidence que la consommation de la quercétine et d'aliments riches en flavonoïdes comme l'oignon et le raisin blanc empêchent la réapparition du cancer du poumon pour les gens qui ont été ateints par ce cancer pour une première fois. Les études indiquées dans le tableau 5 ont montré que les composés phénoliques pourraient inhiber les différents stades du cancer ; l'initiation, la promotion et la progression. Ils peuvent également, augmenter l'expression des composants proapoptotiques

lors de l'initiation de la prolifération cellulaire et par conséquent ils préviennent ou éliminent le cancer.

6.2.6.1. Modes d'action de flavonoïdes

Les radicaux libres peuvent s'attaquer aux composés vitaux des cellules (lipides, protéines, ADN), et par conséquent être une cause de cancer. Les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur (Favier, 2003).

La carcinogénèse est un processus multi-étapes avec une accumulation d'altérations génétiques et différentes stratégies peuvent être envisagées pour prévenir, ralentir ou inverser ce processus. Des travaux ont montré que les flavonoïdes pouvaient agir sur différentes voies reliées à l'apparition d'un cancer telles que la bioactivation des cancérogènes, la signalisation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, l'angiogénèse et l'inflammation (Plochmann et al., 2007, Nijveldt et al., 2001).

Le mécanisme d'action antitumorale de flavonoïdes est variable et dépendant de la structure chimique de ces molécules induisant des propriétés biologiques et des mécanismes d'action différents (Di Carlo et al., 1999). Les principaux modes d'action de ces métabolites sur les cellules eucaryotes sont décrits ci-dessous.

- **Activité antioxydante**

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont en partie responsables des activités antitumorales de ces molécules. Elles préviennent des dommages causés par les ERO formés par des processus métaboliques et induits par des facteurs exogènes (UV, radiation, xenobiotiques) et qui peuvent modifier les facteurs transcriptionnels et les activités des protéines kinases (Win et al., 2002) en augmentant la probabilité de mutation et de décalage de réparation de l'ADN. Une étude épidémiologique effectuée par De Stefani et al. (1999) a montré que les flavonoïdes, comme antioxydants pouvaient prévenir le cancer du poumon.

Inhibition de l'induction de proto-oncogène

L'altération de proto-oncogène, gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire et le changement au niveau des gènes suppresseurs, régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, peuvent déclencher une transformation cancéreuse (Nijveldt et al., 2001). Au niveau du mécanisme d'activation, l'ATP a la propriété d'activer la protéine kinase C et d'induire l'expression de proto-oncogène. Huang et al. (1996) et Lin et al. (1997) ont, par exemple, montré que le flavonoïde apigénine peut inhiber la protéine kinase C par compétition avec l'ATP et inhiber ainsi l'induction des proto-oncogènes.

Inhibition du cycle cellulaire

Les flavonoïdes sont notamment considérés également comme de bons inhibiteurs de la prolifération bien que leurs cibles au niveau du cycle cellulaire (figure 22) ne soient pas bien connues. La progression des cellules eucaryotes au travers des différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par une famille de ser/thr kinases, les CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) associées à leurs partenaires cyclines. La formation et l'activation des complexes CDK-cyclines s'effectuent selon un ordre précis permettant le bon déroulement du cycle. Toute perturbation dans l'expression ou l'activité des protéines participant à ce réseau intégré peut conduire à une dérégulation de la prolifération et à la transformation cellulaire.

Les travaux de Casagrande et al, (1998) ont montré par exemple qu'un dérivé de la quercétine est inhibiteur de PI 3-kinases, induit un arrêt de cycle cellulaire en G1 par inhibition des activités CDK2 et CDK4. Afin d'établir des relations structure/fonction, cette équipe a étudié différents flavonoïdes et a montré que les composés, quercétine, daidzéine et lutéoline, qui induisent un arrêt des cellules en phase G1, inhibent spécifiquement la CDK2 et les composés, kaempférol, apigénine et génistéine, qui conduisent à un arrêt de cycle cellulaire en G2, inhibent la CDK1 (Casagrande et Darbon, 2001). Xu et al. (2008) ont montré que le kaempférol-7-O-β-d-glucoside provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et la diminution de la cycline B1 et de la Cdk1 de cellules cancéreuses du col utérin humain (HeLa) d'une manière p53 indépendante.

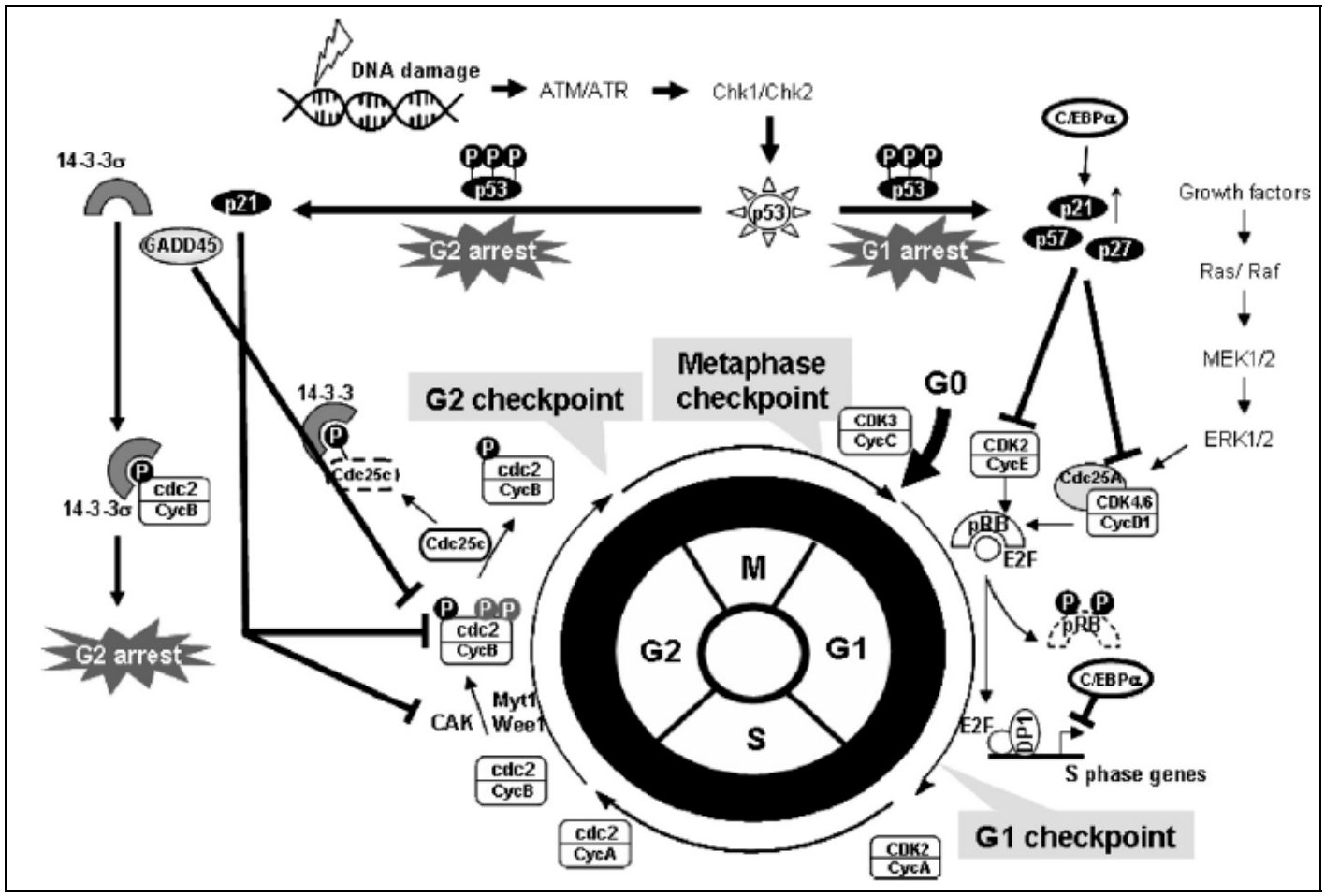


Figure 22: Description du cycle cellulaire (Pan et Ho, 2008)

Le traitement de cellules d'adénocarcinomes oesophagiens humains OE33 avec des flavones et des flavonols entraine un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M à travers la régulation de GADD 45β et 14-3-3σ et de la cycline B1 et induit l'apoptose par voie mitochondriale par régulation de la PIG3 et le clivage de la caspase-9 et de la caspase-3 (Zhang et al., 2008).

6.2.6.2. Relation structure activité cytotoxique des flavonoïdes

Des nombreuses études sur les activités cytotoxiques des flavonoïdes montrent que le pouvoir de ces molécules varie entre les différentes classes de flavonoïdes et entre les molécules d'une même classe. Plusieurs études ont cherché à établir une relation entre la structure chimique de flavonoïdes et leurs activités anticancéreuses. Ces études ont été effectuées essentiellement sur des cellules cancéreuses *in vitro*.

Présence de la double liaison C2-C3

La présence d'une double liaison C2-C3 et de trois groupements hydroxyles adjacents dans les cycles A ou B au niveau de la myricétine et de la baicaléine, confère à ces flavonoïdes une cytotoxicité plus importante vis-à-vis des cellules de mélanome B16F10 et des mélanocytes Melan-a que celle de leurs analogues, quercétine, lutéoline et, ériodictyole qui ne disposent pas de l'une ou de deux de ces caractéristiques (Martinez, 2003).

Plochmann et al. (2007) ont, par exemple, fait une comparaison entre l'effet cytotoxique de 3 paires de flavonoïdes qui ont la même structure et qui diffèrent uniquement par la présence ou l'absence de la double liaison C2-C3. Ils ont montré que la quercétine, l'apigénine et la lutéoline, qui possèdent une double liaison C2-C3 étaient 3 à 10 fois, plus actifs que leurs analogues qui ne possèdent pas cette fonction, la taxifoline, la naringénine et l'ériodictyole.

Kang et al. (2004), ont montré une corrélation entre la présence d'une insaturation au niveau C2-C3 et l'inhibition de la farnésyl transferase (FTase) par les flavonoïdes. Cette enzyme catalyse l'addition de groupement isoprène farnézyl sur une variété de protéines cellulaires. Les flavonoïdes qui inhibent la FTase, sont également inhibiteurs de la croissance de cellules tumorales humaines. Par exemple, la butéine qui a une activité inhibitrice de la FTase, a montré une forte inhibition de la croissance de la lignée HCT116, cellules cancéreuses de colon humain. Par contre, les flavonones et les flavanols n'ont pas présenté d'effets ni sur la FTase ni sur la croissance de ces cellules tumorales.

Présence d'un groupement carbonyle en position 4

Il a été montré que le groupement carbonyle en position 4 est important dans l'attribution du pouvoir cytotoxique des flavonoïdes. Ainsi, Plochmann et al. (2007) ont montré que la catéchine (qui ne présente pas de groupe carbonyle en position 4) était la moins active parmi différents flavonoïdes. Au contraire, la taxifoline, qui possède un groupement carbonyle, était 30 fois plus active que son analogue structural, la catéchine, qui est dépourvue de cette fonction. Une corrélation a ainsi pu être établie entre l'inhibition de la synthèse des acides gras et la présence d'un groupe carbonyle sur le flavonoïde ; cet effet est

fortement associé à l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire provoqués par les flavonoïdes (Brusselmans, 2005).

Rôle du cycle B

Le cycle B, présent dans la structure des flavonoïdes, confère différentes propriétés biologiques à ces métabolites. Le nombre des groupements hydroxyles présents dans le cycle B des flavonols est essentiel pour leur activité cytotoxique et peut leur conférer des activités biologiques importantes lors de processus et le développement de cancer et d'athérosclérose (kim et al., 2006).

Kim et al. (2006) ont montré que les flavonols possédant le plus grand nombre de groupes hydroxyles dans le cycle B sont plus actifs comme inhibiteurs de la prolifération cellulaires mais ne sont pas cytotoxiques. Ces auteurs ont montré que l'activité toxique de flavonoïdes vis-à-vis de cellules HUVEC, cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale de cordons sains et de cellules U937, cellules monocytes leucémiques de lymphome humain augmentait inversement au nombre des OH présents dans le cycle B. Dans cette étude, la myricétine et la quercétine, possédant trois ou deux OH dans le cycle B, inhibent fortement l'expression des molécules d'adhésion, qui permettent l'interaction cellule-cellule mais ne sont pas cytotoxiques vis-à-vis des cellules HUVEC, alors que le kaemphérol et la galangine contenant un ou pas de groupe hydroxyle dans le cycle B n'inhibent pas l'expression des molécules d'adhésion mais sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules HUVEC et U937. Par contre, la myricétine qui possède trois groupes OH dans le cycle B est la moins cytotoxique vis-à-vis des cellules HUVEC, et U937, alors que la galangine qui ne possède pas de OH dans le cycle B a été la plus cytotoxique vis-à-vis de ces deux lignées cellulaires.

Plochmann et al. (2007) ont étudié le rôle du cycle B dans l'activité cytotoxique des flavonoïdes en comparant la cytotoxicité du chalcone phlorétine à celle du phloroacétophénone, composé ne possédant pas de cycle B, et ont montré que le phloroacétophénone est 50 fois moins cytotoxique que la phlorétine.

Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont montré que les flavonoïdes présentant une orthohydroxylation dans le cycle B étaient plus cytotoxiques que ceux métahydroxylés. La

quercétine, flavonoïde orthohydroxylé, est 3 fois plus active que la morine, flavonoïde méthahydroxylée.

- **Présence d'un hydroxyle en position C3**

La présence d'un C3-OH diminue souvent la cytotoxicité des flavonoïdes. Plochmann et al. (2007) ont fait la comparaison de la cytotoxicité de 3 couples de flavonoïdes (apigénine/kaempférol, lutéoline/quercétine, ériodictyole/taxifoline) qui diffèrent uniquement par la présence ou non d'un C3-OH. La présence de ce groupe hydroxyle en position C3 (le kaempférol, la quercétine, la taxifoline) est associée à une diminution de 2 à 10 fois du pouvoir cytotoxique par rapport à celui des molécules n'ayant pas cet hydroxyle (apigénine, lutéoline, ériodictyol).

D'autres auteurs, Li et al. (2008), ont également montré que l'élément majeur concernant la relation entre la structure des flavanones et leur activité cytotoxique était la présence ou non d'un groupe hydroxyle au niveau C3 et ont trouvé que les molécules possédant cette fonction ne présentaient aucune activité vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires évaluées (cellules cancéreuses murines 26-L5 et B16-BL6, cellules de cancer pulmonaire de Lewis de souris, cellules cancéreuses humaines de poumons A549, cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus HeLa et une lignée cellulaire de fubrosarcome humain, HT-1080). Ils ont également mis en évidence que l'alnusine, flavonol possédant un groupe hydroxyle en C3 n'était pas cytotoxique vis-à-vis des différentes lignées cellulaires testées. Ainsi, la présence d'un C3-OH dans la structure des flavanones, isoflavones ou tisoflavanones réduit leur cytotoxicité.

- **Influence de la méthoxylation sur la cytotoxicité des flavonoïdes**

Plusieurs flavonoïdes présentent des méthoxylations au niveau de leurs structures comme l'isorhamnétine, la cirsimaritine, l'hispiduline et la 7-méthoxy-baïcaléine. L'influence de cette méthoxylation sur le pouvoir cytotoxique de flavonoïdes a été étudiée par comparaison de l'activité des molécules méthoxylées avec celle de leurs analogues non méthoxylés ou moins méthoxylés. Ainsi, Plochmann et al. (2007) ont montré que la méthoxylation ainsi que la glucuronidation augmentaient le pouvoir cytotoxique de ces molécules vis-à-vis des lymphoblastes Jurkat T. En effet la 7-méthoxy-baicaléine, la

cirsimaritine, l' hispiduline, et l'isorhamnétine ont été davantage cytotoxiques que leurs analogues moins ou non méthylés la baicaléine, l' hispiduline, la scutellaréine et la quercétine, respectivement. Ces auteurs ont supposé que la méthoxylation augmente l'hydrophobie des molécules et par conséquent améliore leur cytotoxicité.

Michels et al. (2006), ont montré que la méthylation de la lutéoline diminuait son pouvoir cytotoxique vis-à-vis des cellules de l'hépatome murin, H4IIE. La méthylation au niveau C4' de flavonoïdes, limite également leur activité cytotoxique vis-à-vis de cellules HT29. En effet la diosmétine, présentant un groupe méthoxyle en position C4', a été moins active que l'apigénine et la lutéoline, qui eux présentent un groupement OH à cette position (Agullo et al., 1996).

Une autre étude a montré qu'une méthylation au niveau du cycle B de la quercétine diminue de 50 % son pouvoir antiprolifératif vis-à-vis de cellules de muscles lisses de voies aériennes humaines, HASMC, et une méthylation de tous les groupes hydroxyles de ce flavonoïde supprime totalement ce pouvoir (Chaabi et al., 2007).

6.2.7. Biodisponibilité des flavonoïdes

Lors d'une consommation par voie orale, l'absorption, passage des nutriments à travers la paroi intestinale depuis la cavité de l'intestin jusque dans le sang, d'aliments, de micronutriments ou de composés phytochimiques dans l'organisme est non complète et un certain pourcentage n'est pas absorbé. Pour quantifier la partie absorbée, distribuée dans les tissus, métabolisée et finalement éliminée, le terme biodisponibilité a été utilisé. La biodisponibilité désigne la concentration d'un composé ou de ses métabolites dans l'organe cible. Elle représente donc le taux pour lequel une substance est passée de la circulation sanguine dans l'organe cible où elle est stockée et utilisée. La figure 23 présente le devenir dans l'organisme d'un aliment en fonction ou non de son absorption au niveau intestinal.

En raison des difficultés d'accès aux organes cibles *in vivo* chez l'homme, il est difficile de quantifier réellement la biodisponibilité.

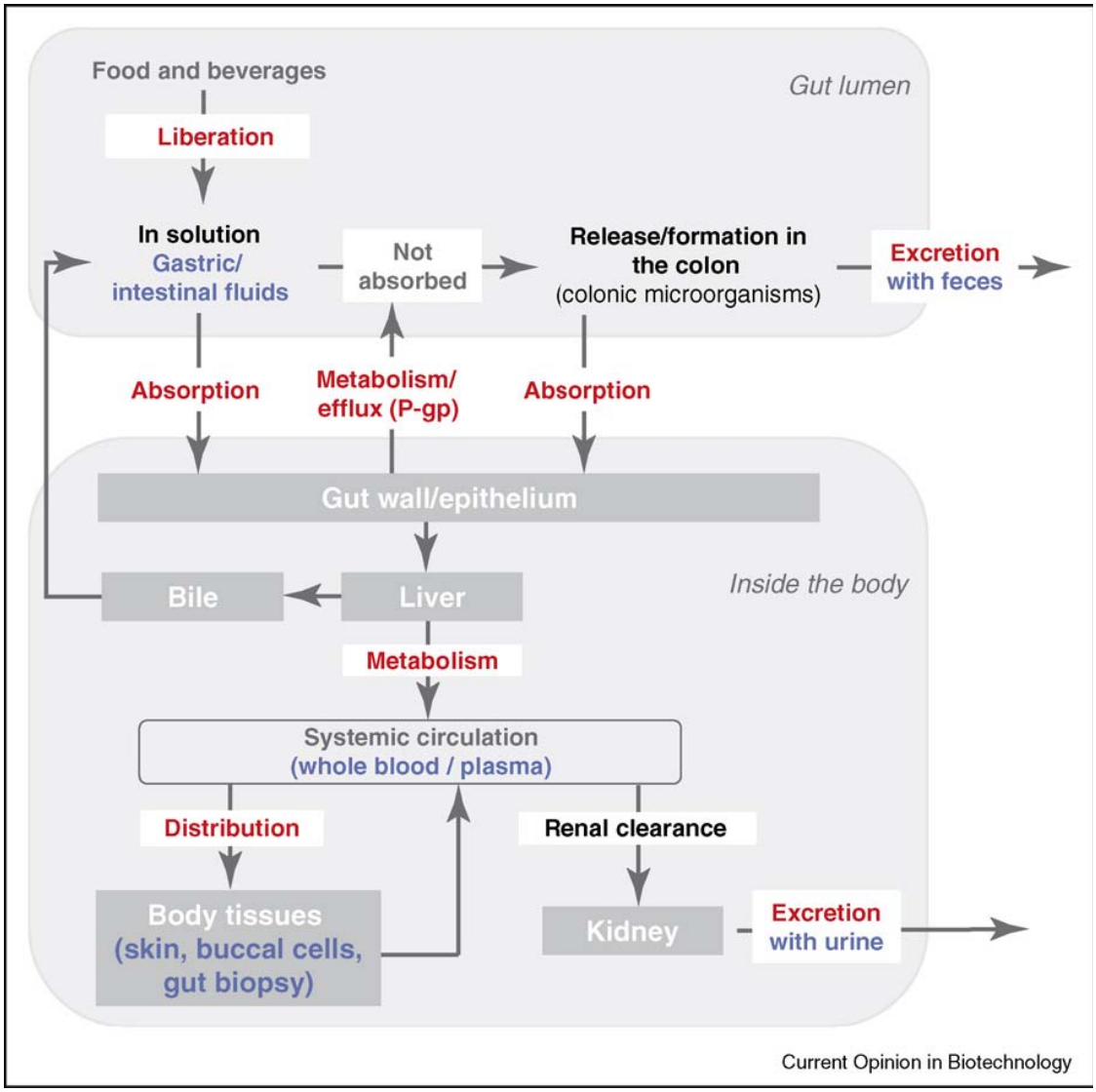


Figure 23: Destination des nutriments après leur administration: (1) 1ibération, (2) absorption (bioaccessibilité) (3) distribution (4) métabolisme, (5) l'élimination (Holst et Williamson, 2008)

La première étape lors de l'ingestion d'un nutriment est la libération et la dissolution de celui-ci afin de le rendre disponible pour l'absorption. La deuxième étape est l'absorption qui correspond au mouvement d'un composé à partir du site de l'administration à la circulation sanguine. La distribution est le processus qui permet le transfert de composés diffusés de l'espace intravasculaire (sang) vers l'espace extra vasculaire (tissus de l'organisme). L'étape suivante est la métabolisation, elle consiste à la conversion biochimique ou la transformation de composés en une forme facile à éliminer. L'étape finale est l'excrétion correspondant à l'élimination du composé inchangé ou de ses métabolites, principalement par voies rénale, biliaire ou pulmonaire. La connexion complexe entre la lumière intestinale et l'organisme résulte de l'existence de plusieurs voies pour chaque composé. (Holst et Williamson, 2008).

6.2.7.1. Absorption des flavonoïdes aglycones

Bien que la quercétine, représente uniquement un exemple de flavonoïdes alimentaires parmi des centaines, il est parmi les plus abondants, les plus actifs, et largement étudiés et donne un aperçu de l'absorption et du métabolisme de ces polyphénols.

Rice-evans et al. (1996) ont proposé un schéma de métabolisme de la quercétine dans lequel l'hétérocycle flavone est clivé en acides phénoliques, qui sont transformés par la suite en des dérivés d'acide benzoïque par déhydroxylation, O-méthylation ou β-oxydation (figure 24)

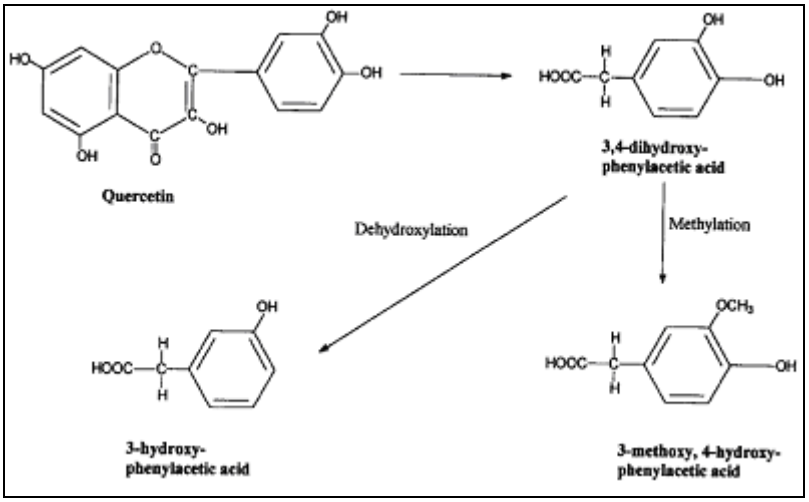


Figure 24: Métabolites de la quercétine (Rice-Evans et al., 1996)

Après son administration orale, la quercétine a été détectée dans le plasma humain mais uniquement sous forme de traces dans l'urine (Olthof et al., 2000). Walle et al. (2001) ont montré que 36 à 53 % de la quercétine ^{14}C ont été absorbés après une administration orale, en tenant compte des produits de métabolisation et de décomposition chimique.

Le taux de kaempférol a été mesuré dans le sérum de rats après une administration orale d'une dose unique de 1 mg/kg. Le profil pharmacocinétique dans le sérum suggère une absorption rapide du kaempférol, atteignant un maximum de 2 nM après 0,5 h; au delà, la concentration de kaempférol diminue et augmente de nouveau pour atteindre un 2ème pic de 1,7 nM à 1 h. Ceci pourrait être expliqué par le phénomène de recirculation hépatique. La détection de kaempférol après 0,5 h indique que son principal site d'absorption est l'estomac ou le duodénum. La détection limitée de kaempférol après 6 h d'administration témoigne

d'une forte élimination post absorption. Il a été également trouvé que le niveau de kaempférol était de 0,3 nM après 4 semaines et de 0,8 nM après 10 semaines de traitement (Trivedi et al., 2008).

Le niveau de kaempférol a été également mesuré dans la moelle osseuse et il a été montré que sa concentration maximale atteignait environ 0,7 nM après 90 min d'une administration orale de 1mg/kg. Ce qui indique qu'une partie du kaempférol administré passe dans la moelle osseuse.

6.2.7.2. Absorption des Flavan-3-ols

Lors de l'ingestion, les flavon-3-ols réagissent en premier lieu avec les protéines riches en proline, ce qui leur confère un goût astringent. Ceux qui traversent la barrière intestinale, arrivent au foie où ils seront transformés en métabolites et pourront éventuellement atteindre les tissus après quelques heures suivant leur consommation, comme cela a été montré dans des expériences radiomarquées réalisées sur des rats vivants. La présence de flavan-3-ols de faible poids moléculaire dans l'urine et les fèces de ces rats ainsi que ceux de poules et de moutons indiquent que les proanthocyanidines sous forme polymérique ne peuvent pas être absorbés par l'intestin avant d'être dégradés en métabolites de faible poids moléculaire. La dégradation des polymères est probablement réalisée par la microflore intestinale. Six flavanols ont été trouvés dans l'urine de personnes en bonne santé après leur consommation de chocolat riche en proanthocyanidines et en catéchine. L'analyse de l'urine de 69 personnes après 6 semaines de consommation d'un supplément d'extrait de pépins de raisin (apport de polyphenols 1g/jour) a montré la présence de trois acides phénoliques comme produits de dégradation de ces proanthocyanidines : l'acide 3-hydroxyphenylpropionique, l'acide 4-O-méthylgallique et l'acide 3 hydroxyphénylacétique (Ward et al., 2004).

6.2.7.3. Absorption des flavonoïdes glycosylés

La cinétique d'absorption varie considérablement d'un aliment à un autre, en raison notamment de l'hétérogénéité de sucres et d'autres groupes sur le noyau flavane des flavonoïdes. L'absorption peut dépendre également de la posologie, du véhicule d'administration, du sexe, et de la population microbienne du colon (Erlund et al., 2001).

La majorité des flavonoïdes sont présents dans les aliments sous forme O-glycosylée (Hammerstone et al., 2000). Dans la plupart des cas, le groupe glycosyle est le glucose; cependant, des flavonoïdes peuvent contenir d'autres groupements comme le glucorhamnose, le galactose, l'arabinose ou le rhamnose (Cook, 1996). La liaison β de ces sucres résiste à l'hydrolyse par les enzymes pancréatiques. Il a été longtemps supposé que les microorganismes de la flore intestinale étaient responsables de la β-hydrolyse des groupements sucres. Cependant, deux β-endoglucosidases capables d'hydrolyser les flavonoïdes glycosylés ont été caractérisées au niveau des intestins grêles humains, y compris la lactase-phlorizine hydrolase (Leese et al., 1973; Day et al., 2000) qui est une enzyme cytosolique ayant une capacité à déglycosyler les flavonoïdes. Cette déglycosylation permet la conjugaison (Gopalan et al., 1992), laquelle met en jeu une réaction de synthèse entre les molécules ou leurs métabolites fonctionnalisés et des résidus endogènes activés polaires, essentiellement le glutathion et l'acide glucuronique. Cette réaction a essentiellement lieu dans les microsomes hépatocytaires et est assurée par des enzymes de type cytochromes. Le produit conjugué est généralement plus hydrosoluble que le produit parent et par conséquent moins apte à traverser les membranes biologiques et plus facile à éliminer dans la bile (Kintz, 1998, Frexinos et Buscail, 2004). Spencer et al. (1999), ont signalé que la lutéoline-7-glucoside, le kaemphérol-3-glucoside et la quercétine-3-glucoside étaient hydrolysés et absorbés par les intestins grêles, ce qui confirme l'activité β glucosidase. Lors de son passage dans les intestins, la lutéoline-3-glucoside est totalement hydrolysée en son aglycone en plus de ses dérivés methylés et sulfatés (Day et al., 1998). Dans une autre étude, des extraits d'intestins grêles humains clivent les flavonoïdes 4'- et 7-monoglucosides mais pas les rhamnoglucosides ni les diglucosides (Shimoi et al., 1998) suggérant des différences de biodisponibilité de ces flavonoïdes en fonction de la localisation et de la structure de la partie sucre. Bien que quelques études montrent que les anthocyanines glycosides sont absorbées intactes (Cao et al., 1999), l'hydrolyse du glucose de la quercétine a souvent été montrée (Spencer et al., 1999; Day et al., 1998; Crespy et al., 2001; Manach et al., 1997; Hollman et al., 1995 ; Kim et al., 1998, Heim et al., 2002).

6.2.7.4. Absorption de polymères de flavonoïdes

En raison de leur taille moléculaire, l'absorption de polymères de flavonoïdes à travers l'épithélium intestinal exige la dégradation préliminaire de ceux ci en des composés de plus petite taille et de plus faible poids moléculaire. (Deprez et al., 1998). Ainsi, il est possible que

le degré de polymérisation modifie l'activité antioxydante *in vivo* par rapport à *in vitro*. Comme exemple des polymères de flavonoïdes, les proanthocyanidines sont dégradés en catéchine et épicatéchine. La présence de bactéries dans le caecum (Groenewoud et al., 1986) et le faible pH gastrique (Spencer et al., 2000) contribuent à ce processus. Au-delà de 3 unités de catéchine, la susceptibilité à la dégradation augmente proportionnellement au degré de polymérisation (Heim et al., 2002).

L'absorption des proanthocyanidines semble être plus difficile par comparaison aux autres classes de flavonoïdes. Elle est 10 à 100 fois moins importantes que celle des constituants monomères (Tsang et al., 2005 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000; Deprez et al., 2001 ; Manach et Donovan, 2004)

Après la consommation de 200 mg/kg de poids corporel d'un mélange de polymères d'épicatéchine (dimères, trimères, tétramères et nanomères), des rats mâles Wister ont fait l'objet d'une analyse du plasma et du foie. Après une heure de consommation, des procyanidines dimériques tétramethylés ont été retrouvés dans le plasma des rats. Deux heures après consommation, des dimères méthylés ont pu être également détectés dans le plasma (14 mg/L) et dans le foie (15 µg/L) (Garcia-Ramirez et al., 2006). De même, une étude sur l'absorption de procyanidines de pomme administrés à des rats par voie orale, a montré que des dimères et des pentamères de procyanidines atteignent un maximum de concentration dans le plasma après 2 heures (Shoji et al., 2006).

Enfin, bien que la métabolisation de polymères de proanthocyanidines par la microflore intestinale (en particulier les dimères et les trimères) soit limitée, la microflore fécale humaine cultivée sous des conditions anaérobies est capable de dégrader les proanthocyanidines en des métabolites de plus faible poids moléculaire (Scalbert et al., 2000 ; Aron et Kennedy, 2008)

Les problèmes de biodisponibilité ainsi que le manque de solubilité et de stabilité de certains flavonoïdes est un frein à leur utilisation. Parmi les solutions utilisées pour face à ces problèmes, la glycosylation et l'acylation ont suscité plus d'intérêt.

7. Acylation des flavonoïdes

Les propriétés biologiques des flavonoïdes in vitro se révèlent nombreuses, ce qui explique l'intérêt que suscitent ces métabolites dans le domaine médical où des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses leur sont reconnues. Certains flavonoïdes sont d'ailleurs déjà utilisés pour la production de nouveaux principes actifs contenus dans des médicaments et des préparations cosmétiques. Dans les domaines de l'alimentaire et de la cosmétique, le potentiel des flavonoïdes notamment en tant qu'agents de conservation (antioxydants, antimicrobiens) est d'ores et déjà exploité et fait encore actuellement l'objet de nombreuses études.

Lors de la formulation des flavonoïdes, plusieurs problèmes se posent. En effet, la solubilité des flavonoïdes dans de nombreux milieux aqueux ou lipophiles est faible et dépend fortement de leur structure. De plus, ces molécules sont sensibles à l'oxygène, aux métaux et à la lumière, ce qui constitue un risque important de diminution de la valeur marchande des produits qui les contiennent (Vercauteren et al., 1994; Saija et al., 2003). A ce manque de solubilité et de stabilité s'ajoute parfois une faible biodisponibilité.

Pour faire face à ces limitations, il est envisagé depuis quelques années de modifier la structure de ces composés pour améliorer un certain nombre de leurs propriétés (solubilité, stabilité, biodisponibilité …). La recherche de moyens permettant de conférer une stabilité satisfaisante aux dérivés phénoliques en général et de les rendre liposolubles ou hydrosolubles a fait l'objet de nombreux travaux reposant sur la mise au point de techniques de fonctionnalisation de ces métabolites. Ainsi, l'augmentation de la solubilité dans l'eau des flavonoïdes peut être réalisée par l'introduction de groupes glycosyles ou hydroxyéthyles tandis que l'introduction d'un acide gras par acylation d'un ou plusieurs groupes hydroxyle va augmenter leur lipophilie. Pour effectuer cette réaction, trois voies sont possibles : chimique, chimio-enzymatique et enzymatique.

7.1. Acylation chimique des flavonoïdes

Ces réactions d'acylation chimique de flavonoïdes sont réalisées par des méthodes classiques déjà appliquées à d'autres composés polyhydroxylés. Elles s'effectuent dans des conditions de catalyse basique ou acide. Elles reposent très souvent sur des séquences réactionnelles délicates intégrant des étapes de protection/déprotection des différents groupements hydroxyles des substrats afin de contrôler la structure des produits.

Quelques exemples de travaux réalisés dans ce domaine sont référencés dans le tableau 6.

Tableau 6: Acylation chimique de flavonoïdes

Références	Substrats	Conditions	Résultats (esters obtenus et pourcentage de conversion)
Mariotte et al. 2001	**Flavo** : héspéritine, quercétine, héspéritine, hespéridine **DA** : chlorure de laurate, chlorue de palmitate, chlorure de stéarate, chlorure de linoléate, chlorure d'hetanoate, anhydre butryrique, anhydre succinique	Pyridine, température ambiante, 1h Pyridine, 100°C, 6h Toluène K_2CO_3, reflux, 1h	Diacyle d'héspéritine (64%), Mélange diacyle d'hespérétine,(18 à 25%). Monoacyle d'héspéritine (10 à 12%) Pentaacyle de quercétine (48 à 61%) Triacyle d'hespérétine (55 à 59%) Octaacyle d'hespéridine
Nie et Wang, 2000	**Flavo :** Polyphénol du thé **DA :** Chlorures d'acide gras (C12-C18)	Acétate d'éthyle, catalyseur d'alcali, 0-80°C, 1-15h	
Patti et al., 2000	**Flavo :** Catéchine **DA :** Anhydre ou chlorure d'acyle	Ter-butyl méthyl ether, triéthanolamine, température ambiante	Pentapropionate de catéchine (94%) Pentavalérate de catéchine (92%) Pentapalmitate de catéchine (90%)
Alluis et al., 2000	**Flavo** : Rutine **DA :** Anhydre succinique	DMAP, pyridine, 6 à 7h, à 0°C, sous azote	Disuccinate de rutine (28%) (3 isomères) 4β˝˝-succinate de rutine

			(21%)
Boumendjel et al (1999)	**Flavo :** Hespéritine, hespéridine, quercetine, apégenine, naringénine, diosmine, rutine, **DA :** Acide gras et derivés d'acides gras (C3-C30) : halogénures, anhydrides et esters.	Toluène, pyridine, chloroforme et acétone. Agent d'activation d'acide (dicyclohexylcarboiiomide, tert-butylchloroformiate.	Di, mono+di, tri, penta et octa-esters (de 10 à 64%)
Nicolosi et al., 1999	**Flavo :** Quercetine **DA :** Chlorure de palmitate	Ter-butyl méthyl ether, triéthanolamine, température ambiante, 12h	Pentapalmitate de quercétine (96%)
Alluis et Dangles, 1999	**Flavo :** Chrysine glucoside (5,7-dihydroxyflavone-7-β-D-O-glucoside). **DA** : Anhydre succinate	DMAP, pyridine, 96h, 70°C, sous azote	2″ ,3″, 4″, 6″-tétra-O-succinate de chrysine glucoside (90%).
Alluis et Dangles, 1999	**Flavo :** Chrysine glucoside (5,7-dihydroxyflavone-7-β-D-O-glucoside). **DA :** Chlorure de p-méthoxycinnamate, chlorure de 3, 4, 5-triméthoxybenzoate, anhydre succinate	DMAP, pyridine, 96h, température ambiante, sous azote	6″-O-p-méthoxycinnamate de chrysine glucoside (31%) 6″-O-(3‴, 4‴, 5‴-triméthoxybenzoate) de chrysine glucoside (30%) 6″-O-succinate de chrysine glucoside (16%)
Giorno et al., 1997	**Flavo :** Chrysine **DA :** Anhydride acétique	Pyridinium, pyridine anhydre, 2h, température ambiante	Diacétate de chrysine
Calias et al., 1996	**Flavo :** Quercétine protégée **DA :** Chlorure de 1,4,5,6-tétra-O-benzyl-2-O-(dibenzyloxyphosphoryl)-myo-inositol 3 succinate	DMAP, 1,2-dichloroéthane, 15 min	5-(2-O-phosphono-myo-inositol 1-succinate de quercétine (62%) 3-(2-O-phosphono-myo-inositol 1-succinate de quercétine (71%)
Vercauteren et al. (1994)	**Flavo :** Flavonols et catéchine **DA :** Acides gras saturés ou insaturés (C5 à C24),	Agent d'activation d'acide : dichlohexylcarboiiomide, tert-butylchloroformate…	Stéarates de flavonols Oléates de flavonols Sorbate de flavonols Hexanoate de flavonols

	et leurs dérivés chlorures, anhydrides et esters Phényle, groupe arylalkyle et arylalkylène	THF, dichlorométhane, pyridine et diméthylaminopyridine. Mélange au reflux sous agitation, 24 h	Perbutyrate de catéchine Perstéatare de catéchine
Natoli et al., 1992	**Flavo :** Lutéoline, kaempférol, kaempféride, quercétine **DA :** Anhydride acétique	Pyridine anydre	Tétraacétate de lutéoline tétraacétate de kaempférol triacétate de kaempféride pentaacétate de quercétine

Flavo : Flavonoïdes

DA : Donneur d'acyle

Les flavonoïdes les plus utilisés pour l'acylation chimique sont plutôt des flavonols aglycones ou glycosylés. En effet cette voie d'acylation n'est pas sélective et une fonctionnalisation de groupes hydroxyles phénoliques est possible.

Les solvants utilisés dépendent de la nature des flavonoïdes devant être acylés. Dans le cas de flavonoïdes aglycones, le toluène, l'éther tertbutyl-méthylique ether sont utilisés (Boumendjel et al., 1999, Patti et al., 2000, Nicolosi et al., 1999). Tandis que la pyridine est très souvent utilisée pour l'acylation chimique de flavonoïdes glycosylés (Alluis et al., 2000 ; Boumendjel et al (1999 ; Alluis et Dangles, 1999). Les agents acylants sont de différentes natures : acides, esters d'acides gras, esters phénoliques.

Bien que la voie chimique d'acylation puisse aboutir à de bons rendements, son manque de sélectivité amène généralement à la fonctionnalisation de la totalité des groupes hydroxyles des flavonoïdes, y compris ceux impliqués dans les activités de ces molécules (Natoli et al., 1992; Giorno et al., 1997; Nicolosi et al., 1999; Patti et al., 2000; Mariotte et al., 2001). Ceci peut conduire à des dérivés certes plus stables ou plus facilement incorporables mais dépourvus des activités recherchées. Par ailleurs, les réactions chimiques d'acylation se déroulent dans des conditions drastiques de pH et de température susceptibles de conduire à la dégradation rapide des substrats et des produits.

Afin d'obtenir une certaine chimiosélectivité, l'approche souvent développée consiste à protéger les fonctions chimiques ne devant pas être acylées ; il est possible également d'utiliser des catalyseurs plus doux comme le Diméthoxyphenylacetophenone (DMPA)

(Calias et al., 1996 ; Alluis et Dangles, 1999; Alluis et al., 2000; Mariotte et al., 2001). Toutefois l'efficacité de ces méthodes reste limitée puisqu'elles nécessitent, dans tous les cas, de nombreuses étapes de synthèse et de purification.

7.2. Acylation chimio-enzymatique

Pour améliorer la sélectivité des procédés chimiques précédemment décrits, tout en limitant le nombre d'étapes de synthèse et de purification des dérivés de flavonoïdes, plusieurs auteurs ont opté pour une stratégie chimioenzymatique. Celle-ci combine des protocoles de la chimie classique et l'emploi de biocatalyseurs. Elle comprend le plus souvent deux étapes : une première acylation chimique du substrat polyfonctionnel est réalisée, puis les différents produits obtenus sont soumis à une hydrolyse enzymatique. Ainsi, la lipase de *Pseudomonas cepacia* a été utilisée sous forme libre ou immobilisée pour effectuer des alcoolyses partielles d'esters de flavonoïdes produits par voie chimique. Giorno et al.(1997); Natoli et al. (1990); Natoli et al. (1992) ont utilisé cette lipase pour hydrolyser des dérivés polyacylés de lutéoline, kaempférol, quercétine, chrysine dans un milieu THF/butanol (5/1). Des produits variés (mono, di, tri ou quadriacylés) ont été obtenus à des pourcentages variables (de 10 à 90%).

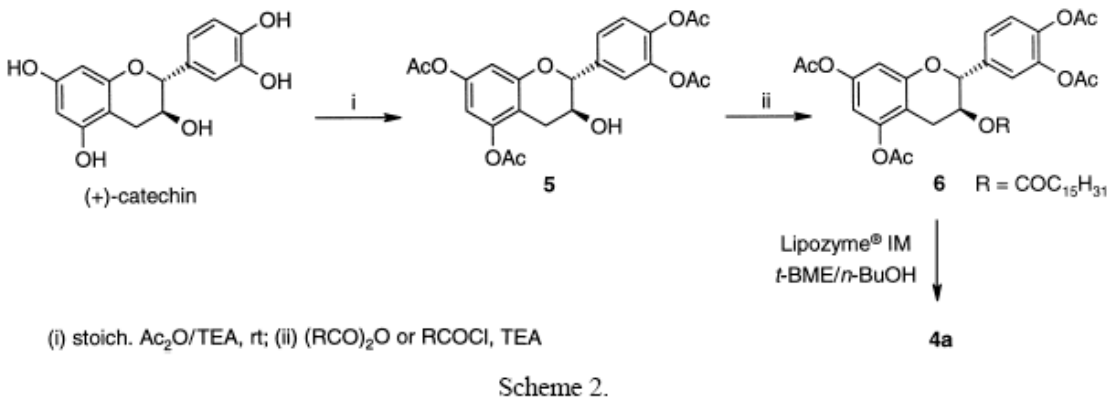
Des résultats satisfaisants ont également été obtenus par Nicolosi et al. (1999) et Patti et al. (2000) avec la lipase immobilisée de *Mucor miehei* pour catalyser la déacylation sélective d'esters de quercétine et de catéchine. Cette lipase a permis de libérer tous les hydroxyles phénoliques, sauf celui situé en position 3 (figure 25). Les procédés de synthèse chimio-enzymatique se révèlent donc plus sélectifs que les procédés chimiques. Toutefois, la démarche peut se révéler parfois laborieuse en raison du nombre d'étapes de synthèse et de purification nécessaires.



1 R = COMe
2 R = COEt
3 R = COBu
4 R = $COC_{15}H_{31}$

2a R = COEt
3a R = COBu
4a R = $COC_{15}H_{31}$

Scheme 1.



Scheme 2.

Figure 25: Synthèse de catéchine 3- O-acylée en présence de lipozyme (Patti et al., 2000)

7.3. Acylation enzymatique

Depuis quelques décennies, les procédés d'acylation impliquant des biocatalyseurs ont largement fait leurs preuves en terme d'efficacité et de sélectivité. Ces procédés permettent de produire des dérivés acylés de manière spécifique, en fonction du biocatalyseur employé, tout en allégeant les étapes de purification. Par ailleurs, ils sont généralement plus respectueux de l'environnement que les procédés chimiques traditionnels, en raison de l'innocuité des catalyseurs employés et de la nature des solvants utilisés. Ceci explique le nombre croissant de travaux publiés décrivant la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes. La plupart d'entre eux comprennent une étape d'optimisation des conditions de synthèse au cours de laquelle l'influence de différents paramètres est étudiée : origine et concentration de l'enzyme, activité de l'eau du milieu, concentration des substrats, nature du solvant, conditions de température et pression … Une fois cette étape réalisée, la littérature montre qu'il est possible de produire, avec des rendements compétitifs et des temps réactionnels acceptables, des dérivés acylés de flavonoïdes de structures spécifiques.

7.3.1. Les enzymes utilisées dans la catalyse des réactions d'acylations enzymatiques

Plusieurs types d'enzymes peuvent être utilisés pour catalyser les réactions d'acylation. Ce sont généralement des hydrolases bien connues pour leurs propriétés d'énantiosélectivité et déjà largement employées pour la résolution de mélanges racémiques. Ces enzymes présentent également des propriétés de chimio et régiosélectivité

particulièrement intéressantes dans le cadre de l'acylation de composés polyfonctionnels comme les flavonoïdes. Danieli et Riva (1994) indiquent que Klibanov et ses collaborateurs ont été les premiers à exploiter ces propriétés des hydrolases et ont montré que certaines lipases et protéases constituent d'excellents catalyseurs pour l'acylation des diols, des mono- ou des polysaccharides en milieu organique. Depuis, de nombreux autres travaux ont été menés pour explorer le potentiel de ces enzymes sur une large gamme de substrats et de réactions, et dans de nombreux milieux.

7.3.1.1. Les protéases

Le rôle physiologique des protéases est l'hydrolyse de protéines solubles dans l'eau. Récemment, ces enzymes ont fait leurs preuves pour catalyser des réactions comme la synthèse de peptides, l'estérification de sucres et de composés glycosylés, dans des milieux non-aqueux.

Les premières études de faisabilité relatives à la synthèse d'esters de flavonoïdes ont été réalisées en utilisant la subtilisine de *Bacillus licheniformis* comme biocatalyseur. Ainsi, Danieli et al. (1989) ont utilisé cette enzyme pour l'acylation de trois flavonoïdes glycosylés, l'isoquercitrine, la lutéoline-3-glucoside et la quercitrine, en présence de butanoate de trifluoroéthyle, dans la pyridine. Ces auteurs ont montré que cette réaction n'est possible que lorsque le groupement sucre des flavonoïdes est un glucose (cas de l'isoquercitrine et de la lutéoline-3-glucoside). Aucune acylation n'a lieu dans le cas de la quercitrine qui comporte un rhamnose. Un autre résultat intéressant est l'absence de réaction lorsque le cinnamate de trifluoroéthyle est utilisé comme donneur d'acyle.

Les investigations de cette équipe se sont étendues à des flavonoïdes de structures plus complexes tels que les flavonoïdes disaccharides (rutine, hespéridine, naringine et quercétine disaccharide) (Danieli et al., 1990). Les résultats obtenus confirment la préférence de l'enzyme vis-à-vis des entités glucose comme observé lors de l'acylation de l'isoquercitrine et de la quercitrine. En effet, l'acylation de la rutine et de l'hespéridine a lieu uniquement sur l'unité glucose de ces composés (flavonoïde 3˝-O-butanoyle). Dans le cas de la rutine, la sélectivité vis-à-vis de l'OH-C3 du glucose est expliquée par la non disponibilité de l'OH-C6 qui est bloqué par la liaison inter-sucre. Par contre pour la naringine, la liaison

interglycosidique est entre le C1 du rhamnose et le C2 du glucose ce qui rend l'OH-C6 primaire accessible et la synthèse d'un 6˝-O-butanoyle ester a lieu (figure 26).

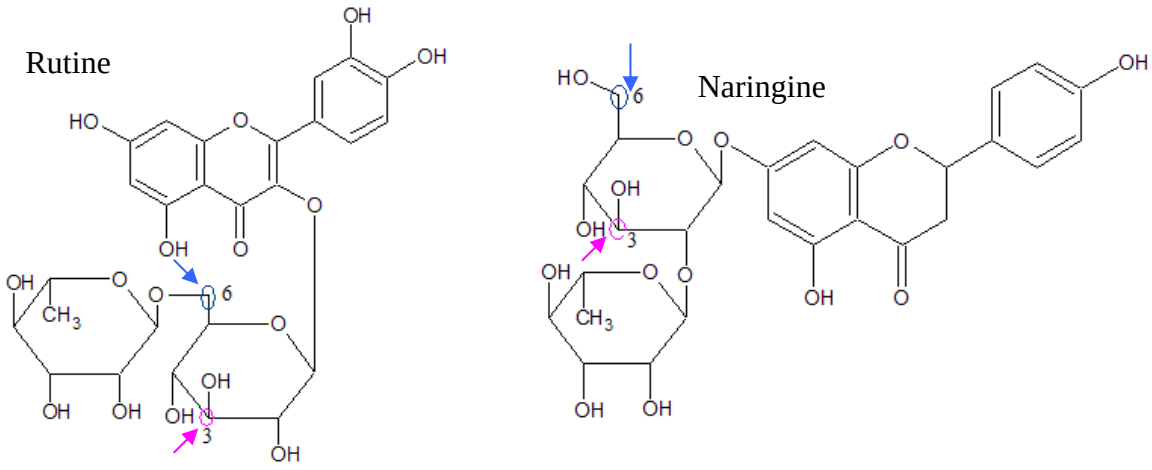


Figure 26: Structure chimique de la rutine et la naringine

Ces travaux ont par ailleurs montré que la sélectivité de cette protéase est indépendante de la nature de la partie aglycone des flavonoïdes. En effet, dans les mêmes conditions, l'acylation du rutinoside a donné un ester 3˝-O-butanoyle.

7.3.1.2. Les transférases

La synthèse naturelle d'esters de flavonoïdes est catalysée par des acyl-CoA transférases. Ces transférases fonctionnent en présence de donneurs d'acyle activés par le coenzyme A. L'application industrielle étant limitée par son coût élevé dû au coenzyme A; des essais de régénération de Co-A ont été réalisés. Nakajima et al. (2000) ont testé un système enzymatique issu d'*Ipomoea batatas* permettant la régénération de l'acyl Co-A. La réaction d'acylation, réalisée avec l'isoquercitrine, la callistéphine et la chrysanthémine en présence d'acide caféique, d'acide férulique, d'acide 4-hydroxycinnamique ou d'acide cinnamique est à la fois sélective et rapide (3 h), mais les rendements sont inférieurs à 40 %. Ces auteurs ont montré l'efficacité de cette méthode dans la synthèse d'esters de flavonoïdes glucosides comme le caféate d'isoquercitrine. En effet, l'acylation de l'isoquercitrine, de la callistéphine et de la chrysanthémine par l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide 4-hydroxycinnamique et l'acide cinnamique dans du tampon Tris-HCl (pH 7,8) en présence du système enzymatique d'*Ipomoea batatas* a permis d'obtenir différents rendements d'esters (après 3 h de réaction). Le caféate d'isoquercitrine a été obtenu avec le meilleur rendement (38%); le 4-hydroxycinnamate d'isoquercitrine (28%) ; le férulate d'isoquercitrine (19%) ; le

caféate de callistéphine (12%) et le caféate de chrysanthémine (12%). Fujiwara et al. (1998) ont utilisé l'extrait protéique de *Perilla frutescens* dans du tampon Tris (pH 7,5) pendant 10 min à 30°C pour la synthèse de 6˝-O-(4-hydroxycinnamate) d'anthocyanine-3-glucoside et de 6˝-O-caféate d'anthocyanine-3-glucoside.

7.3.1.3. Les estérases

Présentes dans tous les organismes vivants et jouant un rôle important dans le métabolisme, les estérases catalysent l'hydrolyse en milieu aqueux des esters et sont actives sur une large variété de substrats: peptides, amides et esters. Il existe plusieurs types d'estérases : carboxyle estérases, aryle estérases, acétyle estérases, cholinestérases et cholestérol estérases.

Sakai et al. (1994) ont utilisé les carboxyles estérases de *Streptomyces rochei* et d'*Aspergillus niger* dans la réaction d'acylation de la catéchine et de l'épigallocatechine par acétate d'éthyle, propionated'éthyle, le propionate de phényle et le butyrate de phényle. Des dérivés de la catéchine et de l'épigallocatéchine ont été obtenus avec différents rendements: 3-O-acétyl catéchine (45%), 3-O-propionylcatéchine (20%), 3-O-propionyl épigallocatechine (55%), 3-O-butyryl épigallocatechine (12,5%).

7.3.1.4. Les lipases

Contrairement aux autres enzymes citées ci-dessus, l'utilisation des lipases pour catalyser la synthèse d'esters de flavonoïdes est bien argumentée dans la littérature. Les performances des différentes lipases dépendent des conditions opératoires et de la nature de la réaction. Ceci fera l'objet de la partie suivante

7.3.2. Description de l'activité catalytique des lipases dans les réactions d'acylation.

Les lipases (triacylglycérol acyl-hydrolases) sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. Ces hydrolases sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol. Chez

de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides. De plus, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques. En milieu organique, elles peuvent catalyser de nombreuses réactions allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoolyse tout en présentant une certaine énantio-, régio- et chimio-sélectivité. Toutes ces propriétés ont conduit au développement de nombreuses applications aussi bien dans l'industrie agro-alimentaire et chimique, qu'en médecine humaine (Fickers et al., 2008).

7.3.2.1. Structure des lipases

Les lipases sont des catalyseurs stéréosélectifs utilisables dans des réactions de transestérification, de synthèses d'esters et de peptides. Elle également très employées pour la résolution de mélanges racémiques pour la production de composés optiquement actifs car elles sont capables d'hydrolyser sélectivement certains énantiomères d'esters, d'amides () ou encore de thioesters (Gotor, 1999, Ohrner et al., 1996, Kazlauskas et al., 1991 ;Cygler et Schrag., 1999; Grochulski et al., 1994 ; Uppenberg et al.,1995, Santaniello et al., 1992; Kim et al., 1997).

C'est au début des années 80 que les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées du point de vue biochimique. À ce jour, plusieurs centaines de séquences sont répertoriées dans les bases de données. Les lipases sont de tailles variables, 20-25 kDa à 60-65 kDa (Cygler et al., 1999). Les premières structures cristallographiques publiées ont été celles de la lipase du champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990) et de la lipase pancréatique humaine (Winkler et al., 1990). Actuellement, plus de 60 structures tridimensionnelles sont accessibles. Bien que les séquences peptidiques montrent peu de similitude entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle (Ollis et al., 1992 ; Derewenda, 1994). Différents travaux ont permis le classement des lipases en sous-familles en fonction de leurs origines et de leurs rôles physiologiques respectifs (Anthonsen et al., 1995 ; Drablos et Petersen., 1997 ; Arpigny et Jaeger, 1999). Nous nous intéresserons par la suite aux structures des deux lipases les plus utilisées dans les réactions d'acylation : la lipase de *Pseudomonas cepacia* et celle de *Candida antarctica.*

7.3.2.1.a. Structure de la lipase de *Pseudomonas cepacia*

Kim et al. (1997) ont déterminé la structure cristalline de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL) par cristallographie aux rayons X (figure 27). Cette lipase contient un repliement α/β-hydrolase et une triade catalytique composée des résidus Ser87, His286 et Asp264. L'enzyme présente plusieurs caractéristiques structurales analogues à celles d'autres lipases comme la lipase de *Pseudomonas glumae* (PGL) et la lipase de *Chromobacterium viscosum* (CVL), en particulier un site de fixation de calcium. Ces auteurs indiquent que la structure de PCL montre une conformation très ouverte avec un site actif accessible au solvant, contrairement aux structures de PGL et CVL dans lesquelles le site actif accessible au solvant est enfoui sous un couvercle fermé ou partiellement ouvert.

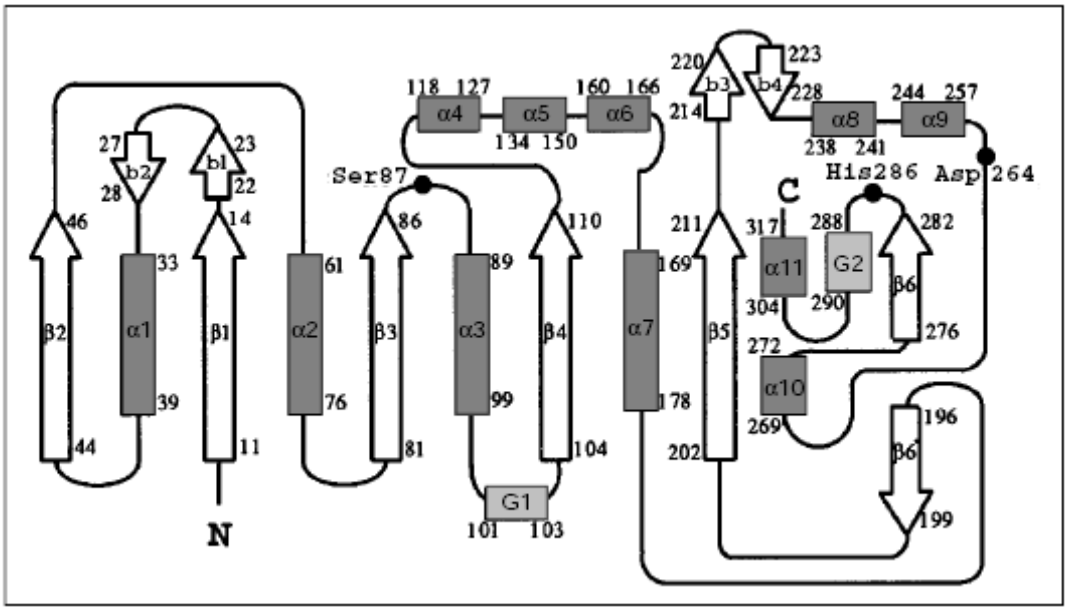


Figure 27: Structure secondaire de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (Kim et al., 1997)

La présence de la triade catalytique Ser-His-Asp, du trou oxyanion et du couvercle en hélice ouvert indique que cette enzyme partage les mêmes mécanismes de catalyse et d'activation interfaciale que les autres lipases. L'activation interfaciale implique la réorganisation des structures secondaires et un grand mouvement du couvercle pour exposer le site actif, mécanisme similaire à celui d'autres lipases fongiques ou mammaliennes bien caractérisées (Kim et al., 1997).

Le positionnement des acides gras au sein du tunnel destiné à interagir avec les chaines acyles des substrats de différentes lipases a été étudié par Pleiss et al. (1998). Dans le

cas de *Pseudomonas cepacia*, la poche catalytique est une cavité elliptique de 17 Å de longueur et de 4,5 à 10,5 Å de largeur (figure 28).

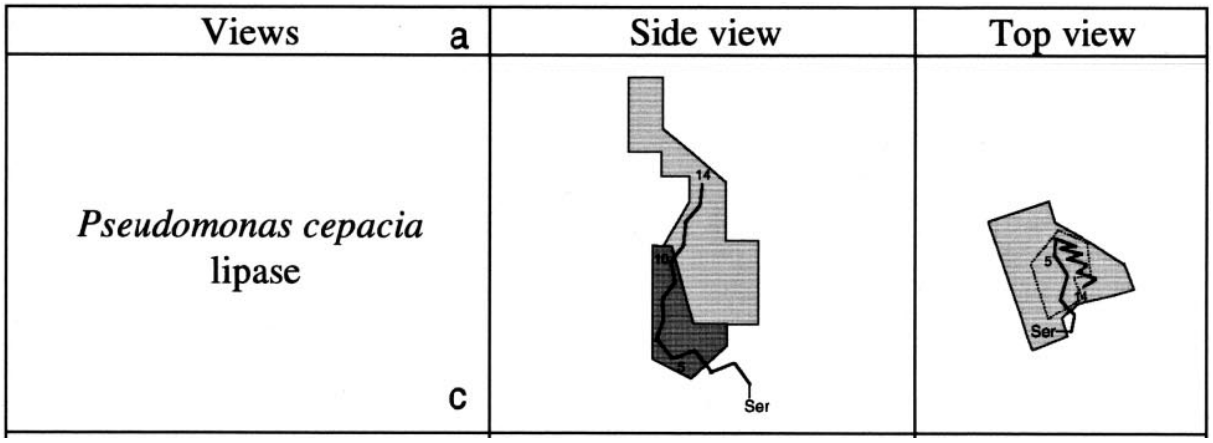


Figure 28: Forme des sites de liaison de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (Pleiss et al., 1998).

7.3.2.1.b. Structure de la lipase de *Candida antarctica*

La structure tridimensionnelle de la lipase B de *Candida antarctica* a été déterminée par Uppenberg et al.(1994) par cristallographie. Cette protéine de 317 acides aminés (33 kD) comporte une triade catalytique constituée des résidus Ser 105, Asp 187, His 224.. La région entourant la sérine catalytique est polaire: on y trouve les résidus His 224, Thr 40, Asp 134 et Gln 157. Uppenberg et al. (1994) ont montré que l'accessibilité au site actif pourrait être régulée par deux hélices α5 et α10.

La lipase B de *Candida antarctica* présente une cavité catalytique ellyptique (9,5x4.5 Å). Une partie de la cavité est destinée aux substances acyles, une autre, plus petite, est réservée aux alcools. La forme de cette dernière est à l'origine de la stéréospécificité de la lipase B de *Candida antarctica* envers les alcools secondaires.

Pleiss et al. (1998) ont décrit le site de liaison des acides gras dans la cavité catalytiquede la lipase Bde *Candida antarctica* et ont montré que seuls les acides gras dont la chaîne hydrocarbonée n'excède pas 13 carbones peuvent pénétrer intégralement dans le tunnel. Au delà de cette taille, les carbones sont stabilisés à la surface de la protéine par des interactions hydrophobes (figure 29).

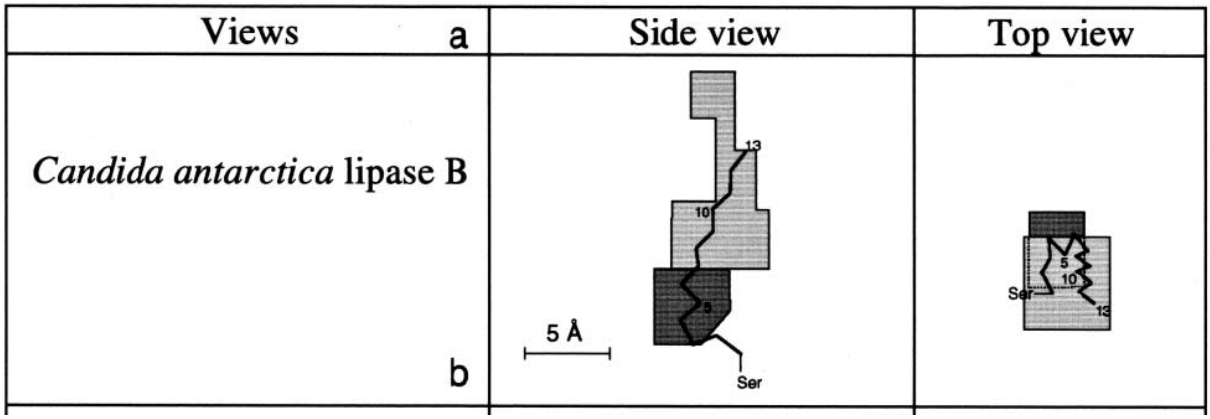


Figure 29: Forme des sites de liaison de la lipase B de *Candida antarctica* (Pleiss et al., 1998)

7.4. Paramètres affectant l'acylation enzymatique des flavonoïdes

7.4.1. Effet de la nature du solvant

Contrairement aux milieux aqueux dans lesquels on trouve naturellement l'enzyme, les milieux organiques sont appelés milieux « non conventionnels ».

Le choix du solvant est généralement un compromis puisqu'il doit à la fois permettre une bonne activité de l'enzyme, une bonne solubilité du donneur et de l'accepteur d'acyle et enfin une extraction aisée des produits du système réactionnel. De plus, la toxicité du solvant est un critère déterminant dans la synthèse de molécules à usage pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire. En fonction de ces contraintes, certaines propriétés de solvants ont été déterminées afin de faciliter le choix du solvant pour une réaction donnée (toxicité, polarité).

Laane et al. **(**1985) ont étudié l'effet de l'hydrophobie des solvants sur l'activité catalytique de différents biocatalyseurs. Une corrélation entre la nature du solvant et l'activité de ces enzymes a été établie en fonction du logP (coefficient de partage octanol/eau). Plusieurs autres travaux ont étudié l'influence des solvants en fonction de leurs logP et ont rapporté que ceux présentant une valeur de logP inférieure à 2 peuvent produire une déshydratation de l'enzyme et par conséquent un changement de la conformation de la protéine qui se traduit par une perte du pouvoir catalytique et par conséquent une diminition de taux de conversion et de la vitesse initiale de la réaction (Yahya et al., 1998; Hari Krishna

et al., 2001). D'autre part, Valivety et al. (1991) ont montré que l' activité lipasique, mesurée en terme de vitesse initiale de la réaction, est favorisée dans des solvants à logP > 3,5.

Plusieurs autres études ont recherché l'effet des solvants sur le rendement de conversion et la vitesse initiale de la réaction de synthèse d'esters de flavonoïdes.

Il apparait que, pour des substrats donnés, l'effet du solvant dépend de la nature de l'enzyme utilisée : subtilisine, lipase *de Pseudomonas cepacia* (PCL) ou CALB. En effet, les synthèses d'esters de flavonoïdes catalysées par la subtilisine sont généralement réalisées dans la pyridine (Danieli et al., 1989 ; Danieli et al., 1990), tandis que Lambusta et al. (1993) et Nakajima et al. (1999) ont montré que l'acétonitrile et l'acétone sont les solvants les plus adéquats pour l'acylation enzymatique des flavonoïdes glycosides par PCL. Pour Cernia et al. (1998), les solvants apolaires et hydrophobes comme l'hexane et le méthylcyclohexane améliorent l'activité de cette enzyme dans les réactions de transesterification de trans-3-(4-méthoxyphenyl) glycidate et de butanol. Quant à la CALB, son activité est améliorée en présence d'acétone ou d'un mélange acétonitrile/pyridine (Riva et al., 1996; Danieli et al., 1997; Nakajima et al., 1999; Gao et al., 2001; Kontogianni et al., 2003; Kontogianni et al., 2001; Mellou et al., 2005). Danieli et al. (1997) ont indiqué que le mélange THF/pyridine favorise l'activité catalytique de la CALB alors que ce même mélange a été décrit par Kontogianni et al. (2001) comme inhibiteur de cette enzyme. Cette contradiction peut être expliquée par la différence des substrats et des conditions expérimentales. Les équipes de Ardhaoui (2004) et de Gayot (2003) ont mentionné que le solvant le plus approprié pour obtenir un rendement et une vitesse initiale importants pendant la synthèse d'esters de flavonoïdes est le tert-amyle alcool (Ardhaoui et al. 2004a; Ardhaoui et al. 2004 b; Ardhaoui et al. 2004c; Gayot et al., 2003).

De plus, la nature de l'enzyme, du flavonoïde et celle du donneur de groupement acyle sont importantes dans le choix du solvant. Kontogianni et al. (2001; 2003) ont testé plusieurs donneurs de groupement acyle pour l'acylation de la rutine et de la naringine en présence de la CALB. Ils ont trouvé que le taux de conversion est variable et fortement dépendant de la composition du milieu réactionnel. Ces auteurs ont mentionné que pour divers flavonoïdes testés, le taux de conversion le plus élevé (30%) est obtenu pour la réaction d'acylation de naringine en utilisant l'acide octanoïque dans l'acétone. Dans le cas de l'acide décanoïque, le taux de conversion le plus élevé est obtenu dans la réaction d'acylation de l'isoquercitrine

dans le tert-butanol. Mellou et al. (2005) ont confirmé ces observations. En effet, en présence de CALB, ces auteurs ont obtenu de meilleurs rendements de conversion de la naringine avec des esters vinyliques (entre 58 et 70%), en utilisant l'acétone comme solvant.

7.4.2. Effet de la nature de la réaction

L'acylation de flavonoïdes peut se faire selon deux réactions : l'estérification directe et la transestérification. Bien que ces deux réactions aient fait l'objet de plusieurs études, peu de travaux ont comparé leurs performances. Gayot et al. (2003), Kontogianni et al. (2001), Ardhaoui et al. (2004a, 2004b, 2004c) ont synthétisé des esters de flavonoïdes par estérification directe en utilisant des acides aromatiques et des acides aliphatiques substitués ou non, en présence de CALB. La transestérification a été utilisée pour la synthèse des esters de flavonoïdes par des esters vinyliques en présence de plusieurs enzymes (Danieli et al., 1989; Lambusta et al., 1993; Nakajima et al., 1999; Gao et al., 2001; Enaud et al. , 2004; Ishihara and Nakajima, 2003; Mellou et al. 2005). Certains travaux ont montré que les performances de la transestérification sont supérieures lorsque des acides aromatiques sont utilisés comme donneurs de groupements acyles, par rapport à d'autres types de donneurs d'acyle (Buisman et al., 1998; Guyot et al., 1997; Otto et al., 1998; Otto et al., 2000; Stamatis et al., 2001). Outre la nature du donneur de groupement acyle, les performances de la transestérification dépendent de la nature de l'enzyme. Nakajima et al. (2000) ont montré que le taux de conversion de l'isoquercitrine lors de son acylation avec l'acide caféique a été supérieur en présence d'une culture de cellules *d'Ipomoea batatas* qu'en présence de la lipase. Le faible taux de conversion obtenu avec la lipase pourrait être dû à la condensation oxydative des hydroxyles phénoliques des molécules d'acide caféique.

7.4.3. Effet de la nature des flavonoïdes

Les flavonoïdes glycosylés sont ceux dont l'acylation a été la plus étudiée. Parmi les quelques travaux qui se sont intéressés à l'acylation des aglycones, on peut citer ceux de Chebil et al. (2007) qui ont montré que l'acylation de l'aglycone quercétine n'est pas faisable en présence de la lipase B de *Candida antarctica*. Par contre, la quercétine a été acylée en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur de groupement acyle et en solvant acétone, acétonitrile ou tert-amyl alcool. Trois esters de la

quercétine ont été synthétisés : la quercétine 4′-acétate, la quercetine 3′,4′-diacétate et la quercétine 7,3′,4′- triacétate avec des rendements de 31, 46 et 23 % respectivement et en utilisant un rapport molaire des substrats (donneur d'acyle /flavonoïde) de 40. En effet, les rendements obtenus sont dépendants de la nature du solvant et des concentrations relatives des substrats. Lumbusta et al. (1993) ont acylé la catéchine avec l'acétate de vinyle en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* dans l'acétone pour la synthèse de 5-O-acylcatéchine et de 7-O-acylcatéchine. Sakai et al. (1994) ont acylé cette même molécule en utilisant une estérase d'*Aspergillus niger* ou de *Streptomyces rochei* et différents donneurs d'acyle (acétate d'éthyle, propionate d'éthyle etc…). Les rendements obtenus dans cette étude sont faibles (inférieurs à 20%). Saija et al. (2003) ont acylé la quercétine en appliquant les mêmes conditions que Lambusta et al. (1993) afin d'évaluer l'activité antioxydante des dérivés de quercétine: quercétine-3-acétate, quercétine-3-propionate et quercétine-3-palmitate.

Contrairement aux flavonoïdes aglycones, l'acylation de flavonoïdes glycosides a fait l'objet de plusieurs études. Pour ces flavonoïdes, l'acylation est sélective des hydroxyles glycosidiques, primaires de préférence, quand ils sont libres. Les hydroxyles phénoliques ne sont pas touchés. La régiosélectivité de cette réaction dépend de la nature de l'enzyme. En effet, Danieli et al. (1989) ont montré que l'acylation des flavonoïdes dont le groupement glycosylé est un rhamnose n'est pas possible en présence de la subtilisine. Ces auteurs ont montré que l'acylation des flavonoïdes, quercitrine, isoquercitrine et lutéoline glucoside, en présence de cette enzyme en solvant pyridine et d'esters de butanoate comme donneurs d'acyle, a été possible seulement sur le résidu sucre de l'isoquercitrine et de la lutéoline glucoside. Ces résultats peuvent être expliqués par la différence dans la structure du résidu sucre, glucose pour l'isoquercitrine et la lutéoline-glucoside et rhamnose pour la quercitrine. En effet, le glucose et le rhamnose appartiennent à deux séries stériques différentes, et la configuration du L-rhamnose pourrait l'empêcher d'interagir avec le site actif de l'enzyme.

La longueur du groupement sucre (monosaccharide, disacharide) et la position du sucre sur l'aglycone ne semblent pas influencer pas l'activité de la subtilisine (Danieli et al., 1989; Danieli et al., 1990). Cette enzyme a montré une bonne sélectivité vis à vis de la rutine, de la naringine et de l'hespéridine. Un seul dérivé acylé est produit par acylation de chacun de ces flavonoïdes avec le butyrate en présence de la subtilisine dans la pyridine anhydre: le 3″-O-butanoate de rutine (67%), le 3″-O-butanoate d'hespéridine (65%) et le 3″-O-butanoate de naringine (33%). Cependant, l'acylation du peltatoside (Quercetin-3-arabinoglucoside) mène

à la formation de plusieurs produits: le 3˝-O-butanoate de peltatoside, le3‴, 4‴-O-butanoate de peltatoside, 4‴-O-dibutanoate de peltatoside (Danieli et al., 1990). Danieli et al. (1993) ont ensuite acylé l'isoquercitrine avec le chloroéthyle méthyle succinate dans la pyridine en utilisant la même enzyme. Trois esters ont été synthétisés : le 6˝-O-méthyl malonate d'isoquercitrine (45%), le 3˝-O-méthyl malonate d'isoquercitrine (5%) et le 3˝, 6˝-O-méthyl malonate d'isoquercitrine (5%). En remplaçant la subtilisine de *Bacillus licheniformis* par celle de *Bacillus subtilis* et en gardant les mêmes conditions décrites par Danieli et al (1990), Kodelia et al. (1994) ont augmenté le rendement d'acylation de la rutine de 67% après 48 h à 90% après 8 h.

Pour les réactions catalysées par CALB, l'acylation des flavonoïdes glycosylés dépend de la composition du sucre et de sa position sur l'aglycone.

Gao et al. (2001) ont indiqué que la réactivité de la catéchine glycosylée dépend de la nature du sucre : les flavonoïdes monoglycosylés ayant un OH primaire sur leur sucre sont plus réactifs que les flavonoïdes n'ayant pas de groupe OH primaire disponible. La catéchine α-D-glucoside est ainsi un meilleur substrat que la catéchine fucopyranoside et maltoside. Ces auteurs expliquent ce résultat par l'absence de groupe OH primaire au niveau de la catéchine fucopyranoside et la faible solubilité de la catéchine maltoside dans le solvant de réaction.

Cependant, d'autres facteurs, comme l'encombrement stérique et la solubilité de la molécule dans le solvant, interviennent dans la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis du flavonoïde. Ces constatations ont été confirmées lors d'une étude faite avec plusieurs autres flavonoïdes (naringine, hespéridine, isoquercitrine…). Il a été constaté que l'acylation des flavonoïdes portant un disaccharide est moins efficace que celle d'un monoglycoside (Danieli et al., 1990). Une étude menée par Ardhaoui et al. (2004) a montré que lors de l'acylation de différents flavonoïdes (esculine, rutine, hesperidine, quercétine) avec l'acide palmitique en présence de CALB, les meilleurs rendements ont été obtenus avec l'esculine en raison de son faible encombrement stérique (monosaccharide) et de la présence d'un OH primaire dans son résidu sucre. La faible réactivité de l'hespéridine est due à sa faible solubilité dans le solvant utilisé, le tert-amyl alcool.

Chebil et al. (2007) ont réalisé l'acylation de l'isoquercitrine en présence de deux lipases, la lipase B de *Candida antarctica* et la lipase de *Pseudomonas cepacia*. Deux produits

ont été synthétisés en présence de la lipase de *Candida antarctica* : l'isoquercitrine 3″,6″-diacétate et l'isoquercitrine 2″,3″,6″-triacétate. Cependant en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia,* trois produits ont été obtenus : l'isoquercitrine 6˝-acétate, l'isoquercitrin 4′,6″-diacétate, et un troisième produit, obtenu en faible quantité et dont la structure n'a pas été déterminée.

Une synthèse de la régioselectivité de l'acylation de flavonoïdes en fonction de leur nature en présence de différentes enzymes (subtilisine, CALB et PCL), est présentée dans la figure 30.

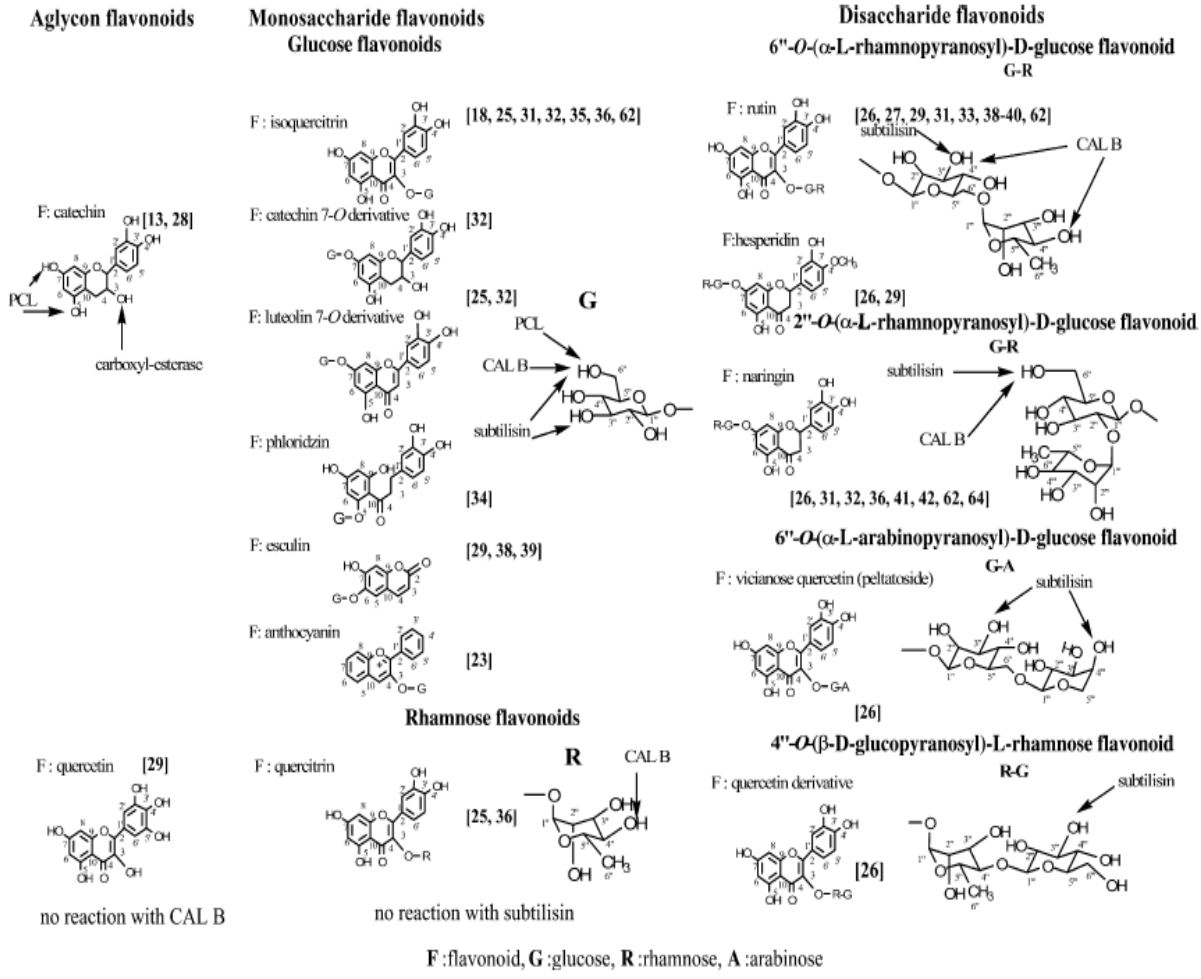


Figure 30: Régioselectivité de l'acylation de flavonoïdes biocatalysée par la subtilisine, la CALB et la PCL (Chebil et al., 2006).

La figure 30 montre que les flavonoïdes glycosylés sont plus accessibles à l'acylation ; en effet, la quercétine n'a pas pu être acylée avec la CALB. Une acylation de la catéchine au niveau du groupe hydroxyle en position 3 a été obtenue en utilisant une hydroxy-estérase. Pour les flavonoïdes monoglycosylés présentant un glucose dans leur structure, l'acylation se

fait préférentiellent sur le OH primaire de ce groupe en présence de la CALB, de la PCL ou de la subtilisine. En absence de OH primaire, l'acylation peut se faire sur un OH secondaire (groupe rhamnose). En fonction de la nature des groupes sucres, l'acylation des flavonoïdes diglycosylés peut avoir lieu sur un seul sucre ou sur les deux sucres en présence de la CALB ou de la subtilisine. En conclusion cette figure montre l'effet de la nature du flavonoïde (glycosylé ou non), de la nature des groupes glycosidiques et du nombre des sucres sur la régioselectivité de la réaction.

7.4.4. Effet de la nature du substrat donneur de groupement acyle

La nature du donneur d'acyle est un facteur important dans l'acylation enzymatique des flavonoïdes. Elle influt sur la performance de la réaction ainsi que sur les propriétés de l'ester synthétisé. La spécificité des lipases vis-à-vis des substrats est à l'origine de travaux concernant l'effet des donneurs d'acyles sur l'activité de l'enzyme et sur la performance de la réaction.

Les meilleurs résultats, en termes de taux de conversion et de vitesse initiale de réaction, ont été obtenus en utilisant des acides gras ou des esters vinyliques comme donneurs d'acyle (Chebil et al., 2006). Pour les acides aromatiques, la performance de la réaction est dépendante de leur structure : nature de la substitution, la position des groupements hydroxyles (ortho, para etc.). Ainsi, Gao et al. (2001) ont mentionné l'ordre de réactivité suivant : Vinyl cinnamate (45%) > ferulate (32 %) > p-coumarate (15%), lors de l'acylation de l'isoquercitrine en présence de Novozym 435®.

Nakajima et al. (1999) ont synthétisé des esters de naringine et de rutine en présence de la lipase de *Candida antarctica* et de la lipase de *Pseudomonas cepacia*, en utilisant le cinnamate, p-coumarate, caféate et ferulate de vinyle comme donneurs d'acyle. En présence de Novozym 435®, Gao et al. (2001) ont indiqué que le cinnamate de vinyle est le plus efficace pour l'acylation de la catéchine, suivi du ferulate de vinyle et du p-coumarate de vinyle. Enaud et al. (2004) ont utilisé le cinnamate d'éthyle et les cinnamate, benzoate et salicylate de méthyle pour la synthèse d'esters de phloridzine en présence de CALB. La réaction avec le cinnamate d'éthyle est la plus rapide et permet l'obtention de 100% de phloridzin 6˝-O-cinnamate après 5h de réaction, ce qui est expliqué par le fait que l'enzyme

est moins spécifique des esters méthylés. Une méthode de synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes par estérification directe a été rapportée dans le brevet déposé par la société Henkel/Cognis (Otto et al., 2000). Ces auteurs ont étudié l'acylation de la naringine dans le tert-butanol à une température variant entre 60 et 65°C en présence de la lipase de *Candida antarctica*, en utilisant des acides aromatiques comme donneurs de groupement acyle. Les rendements obtenus avec les dérivés cinnamiques sont faibles, inférieurs à 15%. Pour les autres dérivés aromatiques utilisés : acides 4-hydroxyphenylacétique, 4-chlorophenylacétique, 5-phenylvalerique, 4-phenylbutyrique, 3-phenylpropionique (20%), des rendements supérieurs à 15% ont été obtenus.

L'effet de la structure des donneurs de groupement acyle aromatiques sur l'acylation par Novozym 435® a été décrit par Ardhaoui et al. (2004) : les meilleurs taux de conversion et de vitesses initiales de réaction sont obtenus en présence des acides aliphatiques et des acides aryl-aliphatiques. Aucune réaction ne se produit en présence de l'acide benzoïque. Les taux de conversion (après 150h) et les vitesses initiales de toutes les réactions effectuées avec les acides aliphatiques ont été supérieurs à 68% et $9{,}5.10^{-2}$ mmol/h respectivement. Cependant, pour les acides aromatiques ayant au moins un alkyle ou un alkenyle entre le groupement carboxylique et le noyau aromatique, l'acylation est affectée par la présence d'une insaturation au niveau de la chaîne acyle et/ou d'une substitution (hydroxyles ou nitro-groupes) au niveau du noyau aromatique. Les variations de taux de conversion et de vitesses initiales obtenus avec ces donneurs d'acyle sont expliquées par différents mécanismes comme des effets électrostatiques, stériques et de polarité (Ardhaoui et al., 2004).

Stevenson et al. (2006) ont utilisé la Novozym 435® pour l'acylation de la naringine et de l'isoquercitrine ainsi que des flavonoïdes contenus dans les extraits de pomme ou de bleuets, en utilisant des acides carboxyliques comme donneurs d'acyle, acide palmitique, acide cinnamique et acide phénylpropionique (PPA) ainsi que des dérivés hydroxylés de PPA et le M_2B_2 comme solvant. Les rendements obtenus sont compris entre 17% pour l'acylation de l'isoquercitrine par l'acide cinnamique et 95% pour l'acylation de la naringine par l'acide palmitique. La naringine et l'isoquercitrine ont été aisément acylées. Dans le cas des extraits de pomme et de bleuets, l'enzyme a été sélective vis-à-vis de flavonoïdes glycosylés présentant un OH primaire dans le groupement sucre comme la phloridzine et les antocyanidines glycosides et galactosides. L'acylation avec l'acide palmitique augmente

remarquablement la lipophilicité et par conséquent la solubilité des flavonoïdes dans le solvant de la réaction.

D'autres enzymes ont été utilisées pour réaliser l'acylation des flavonoïdes avec des acides aromatiques. Nakajima et al. (2000) ont utilisé une culture cellulaire d'*Ipomoea* pour catalyser l'introduction directe des acides aromatiques aux flavonoïdes.

L'utilisation d'acides aliphatiques comme donneurs de groupement acyle dans la synthèse enzymatique d'esters de flavonoïdes a été étudiée. Danieli et al. (1997) ont utilisé l'acétate de vinyle afin d'étudier la sélectivité de CALB vis-à-vis de différents flavonoïdes glycosylés. Des mono et des diacétates de flavonols ont été obtenus avec des rendements supérieurs à 75%. Cependant lors de cette synthèse, en plus de la toxicité de la pyridine utilisée pour améliorer la solubilisation des flavonoïdes, une production d'acétaldéhyde, molécule toxique, par isomérisation du groupement vinylique libéré par l'alcoolyse a été mentionnée.

L'equipe de Kontogianni et al. a étudié l'acylation de la naringine et de la rutine catalysée par la Novozym 435®, en présence de l'acide octanoïque, l'acide décanoïque et l'acide dodécanoïque, étaient très sélectives au cours de cette synthèse. En effet seul l'hydroxyle primaire de la naringine et la position 3˝ de la rutine ont été acylés (Kontogianni et al., 2001 ; Kontogianni et al., 2003). L'acide palmitique à été utilisé comme donneur de groupement acyle pour la synthèse de palmitate de naringine catalysée par la Novozym 435® dans le 2-Méthyl-2-butanol (Gayot et al. 2003).

En ce qui concerne l'effet de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras utilisés comme donneurs de groupement acyle sur la performance de l'acylation enzymatique de flavonoïdes, des résultats contradictoires ont été obtenus. Katsoura et al. (2006) ont indiqué que la nature du donneur de l'acyle joue un rôle dans l'efficacité de la réaction d'acylation de la rutine et de la naringine par des acides gras libres ou leurs esters vinyliques en présence de CALB. Pour la naringine, le meilleur taux de conversion, 65%, a été obtenu avec les donneurs d'acyle à courte chaîne carbonée. En utilisant des donneurs d'acyle à longue chaîne carbonée, le taux de conversion ne dépasse pas 23%. Kontogianni et al. (2001) n'ont remarqué aucun effet de la longueur de la chaîne carbonée sur le rendement de conversion du flavonoïde, lors de la synthèse d'esters de naringine et de la rutine en utilisant des acides gras (C8-C12)

comme donneur d'acyle en présence de la CALB. Melou et al. (2005) ont trouvé, lors de l'acylation de la naringine avec des acides gras ou des esters vinyliques, que la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle n'influence que légèrement le taux de conversion ainsi que la vitesse initiale de la réaction. Cependant, Ardhaoui et al. (2004) qui ont étudié l'acylation de la rutine en utilisant des acides gras libres dont la longueur de la chaîne carbonée varie entre 6 et 18, ont trouvé que pour les acides gras à chaîne carbonée inférieure à 12, la performance de la réaction augmente avec la longueur de la chaîne, par contre pour les chaînes supérieures à 12 carbones, aucun effet sur le rendement de conversion n'a été observé. Des esters vinyliques et des acides gras dicarboxyliques ont aussi été utilisés par ces auteurs. Ces donneurs d'acyle ont été plus réactifs que les acides aromatiques et les acides gras libres.

7.4.5. Influence des conditions opératoires

- **Teneur en eau dans le milieu réactionnel**

La teneur en eau dans le milieu influence la stabilité et la structure des lipases et, par conséquent, l'activité enzymatique de ces biocatalyseurs, indépendamment de la nature du solvant utilisé. L'eau produite lors de l'estérification directe influence l'équilibre thermodynamique donc la vitesse et le taux de conversion de la réaction. Cependant, l'effet de l'eau varie d'une enzyme à une autre (Yahya et al., 2003; Wehtje et Adlercreutz,1997). Pour une enzyme donnée, cet effet dépend de la nature du solvant, de l'état de l'enzyme (immobilisée ou libre) ainsi que de la nature du support (Arroyo et al., 1999). Une certaine quantité d'eau est nécessaire pour maintenir l'activité enzymatique. Un niveau optimum doit être maintenu tout au long de la réaction (Halling, 1994; Wehtje et al., 1993; Wehtje et Adlercreutz, 1997). Dans le cas de Novozym 435®, l'étude de la courbe d'absorption d'eau de cette enzyme (Chamouleau et al., 2001) montre qu'une petite variation de la quantité d'eau dans le milieu provoque une grande variation de l'activité de l'eau. Ce comportement explique la forte sensibilité de l'enzyme vis-à-vis de l'eau dans le milieu. En effet, l'étude faite par Kontogianni et al. (2001) et Ardhaoui et al (2004) lors de l'acylation de la rutine et de la naringine par Novozym 435® montre que le meilleur taux de conversion est obtenu lorsque la teneur en eau et l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel sont inférieures à 0,11 et 200 ppm, respectivement. Gayot et al (2003) ont rapporté que l'association de la déshydratation des substrats à l'élimination de l'eau au cours de la réaction améliore le

rendement lors de la synthèse de palmitate de naringine. Par contre, le séchage de l'enzyme entraîne une forte diminution de la conversion et de l'activité spécifique. Ceci a été expliqué par le fait que l'eau entourant la protéine est nécessaire pour son fonctionnement. Ces auteurs ont trouvé que la valeur optimale de teneur en eau est de 0,05%.

Wehtje et Adlercreutz (1997) ont montré que l'activité optimale est atteinte à des activités en eau de 0,33 pour *R. arrhizys*, 0,97 pour *C. rugosa* et entre 0,33 et 0,75 pour *P. Cepacia*.

Au cours de l'estérification directe, de l'eau est produite. Pour éliminer cette eau, plusieurs méthodes ont été utilisées. La plupart des études utilisent des sels qui permettent d'obtenir une activité de l'eau bien définie (Greenspan, 1977; Goderis et al., 1987). Dudal et Lortie (1995) ont indiqué que l'activité de l'eau peut être ajustée avec une solution de sel saturée tout au long de la réaction. Une deuxième méthode propose de mettre les solutions de sel saturées dans un compartiment, séparé par une membrane de silicone semi-perméable, du compartiment contenant le milieu réactionnel. L'eau est transférée à travers la membrane (Kvittingen et al., 1992, Wehtje et al., 1993). Le travail sous vide a également été proposé comme un procédé pour éliminer l'eau (Guillardeau et al., 1992; Barfoed et Skagerlind, 1994. Ducret et al., 1995, Coulon, 1997).

Mellou et al. (2005) ont observé qu'après l'ajout de tamis moléculaire (100 g/L) dans le milieu réactionnel, le taux de conversion augmente passant de 15 - 20% à plus de 30 - 40% pour 72 h de réaction. D'autres études ont utilisé les tamis moléculaires (Wehtje et Adlercreutz, 1997 ; Coulon, 1997). Cependant, certains auteurs ont montré que l'utilisation de tamis moléculaires peut affecter la stabilité et l'activité de l'enzyme (Ergan et al., 1988; Bloomer et al., 1992).

- **Influence de la température**

La température est un facteur important dans l'acylation enzymatique. Elle affecte la viscosité du milieu, l'activation ou la dénaturation de l'enzyme et la solubilité des substrats et des produits. Enaud et al. (2004) ont indiqué que le taux de conversion de la phloridzine par transestérification, en présence de Novozym 435® est de 100%. Cependant, le temps de réaction nécessaire pour une conversion totale dépend de la température utilisée. Il est de 15 h

à 6°C, 4 h à 80°C et 2 h à 100°C. Ema et al. (2003) ont indiqué que le taux de conversion augmente, passant de 3% à 60°C à 39% à 90°C, lors de la transestérification du 1,1-diphényl-2-propanol avec l'acétate de vinyle.

Katsoura et al. (2007) ont étudié l'influence de la température sur la réaction d'acylation de la naringine avec le butyrate de vinyle dans des liquides organiques, en présence de la lipase B de *Candida antarctica.* Ils ont montré que l'augmentation de la température de 35 à 60°C améliore la vitesse initiale et le taux de conversion de la réaction. D'autres auteurs ont indiqué que l'activité optimale de cette lipase est obtenue a 60°C (Coulon, 1997 ; Hugon, 2000).

La température affecte également la stabilité de l'enzyme. Ainsi, Enaud et al. (2004) ont rapporté que l'activité enzymatique a diminué de 30% après un jour d'incubation à 80°C lors de la synthèse d'esters de phloridzine en présence de Novozym 435®. Cette désactivation a été attribuée à la dénaturation de l'enzyme et à une probable interaction avec le cinnamate d'éthyle. Les températures très élevées peuvent parfois dénaturer l'enzyme (Mutua et Akoh, 1993; Guillardeau et al., 1992 ; Khaled., 1992).Turner et Vulfson (2000) ont montré que la lipase de *Candida antarctica* reste active jusqu'à 130°C sans changement significatif de conformation et Woudenberg-van Oosterom et al. (1996) ont indiqué qu'elle conserve son activité pendant 7 jours à 82°C. Par ailleurs, lors de la synthèse d'esters de sucre, Coulon et al. (1997), Cao et al. (1999) et Chamouleau et al. (2001), ont indiqué que l'effet de la température n'est pas clair et dépend de l'environnement de l'enzyme.

- **Influence de la pression**

L'élimination des sous-produits réactionnels d'acylation améliore le rendement de la réaction par déplacement de l'équilibre vers la synthèse. Lorsque l'eau ou l'alcool est le seul composé volatil du milieu, il peut être éliminé par application d'un vide partiel (Napier et al., 1996). Peu de travaux se sont intéressés à ce facteur lors de la synthèse d'esters de flavonoïdes. Passicos et al. (2004) ont étudié l'effet de la pression sur la vitesse initiale, le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre thermodynamique et le taux de conversion de la réaction d'acylation de la naringine avec l'ester méthylique de l'acide palmitique en présence de la lipase de *Candida antarctica*, dans le 2-méthyl-2-butanol (M_2B_2). Ils ont montré que l'application d'une pression réduite peut orienter l'équilibre de la réaction vers la synthèse. A

200 mbar, ces auteurs ont remarqué que le méthanol produit au cours de la réaction est éliminé. Dans cette étude, en abaissant la pression jusqu'à 200 mbar, le rendement et la vitesse initiale de la réaction augmentent respectivement de 32% à 85% et de 0,44 g/L.h à 0,99 g/L.h et l'équilibre thermodynamique est obtenu après 60 h de réaction sous une pression de 200 mbars contre 120 h sous pression atmosphérique. La différence de vitesse initiale s'explique par la dénaturation de la protéine causée par le méthanol accumulé lors de la réaction sous pression atmosphérique (Coulon et al., 1996). En effet, le méthanol désorganiserait la couche d'eau entourant l'enzyme, ce qui changerait la structure tridimensionnelle de cette dernière, lui faisant perdre son activité (Gorman et Dordick, 1992).

Enaud et al. (2004) ont choisi de travailler sous une pression de 200 mbars lors de l'acylation, en milieu fondu, de la phloridzine par le cynamate d'éthyle, en présence de Novozym 435. Ces auteurs ont suggéré que cette pression permet d'éliminer l'éthanol, sous-produit de la réaction, et ainsi de favoriser la synthèse.

L'effet de la pression sur la réaction d'acylation des sucres a été étudié par plusieurs auteurs. Guillardeau et al. (1992) ont étudié l'effet de la pression sur la synthèse de caprylate de fructose par estérification directe, catalysée par Lipozyme. A pression atmosphérique, des rendements faibles ont été obtenus dûs à l'accumulation de l'eau formée. Le rendement maximum a été obtenu sous 0,28 mbar. En deçà de cette pression, le rendement chute. En effet, une trop faible pression semble affecter la couche d'hydratation de l'enzyme, qui exige environ 10% de son poids en eau pour avoir une activité optimale de synthèse (Kao et al., 1997). Avec la lipase B de *Candida antarctica*, Ducret et al. (1995) ont obtenu un rendement de conversion du fructose de 90% en travaillant sous une pression de 70 mbars. Avec cette même enzyme, la diminution de la pression a permis également à Coulon et al. (1999) d'améliorer la concentration finale en oléate de fructose (30 g/L sous pression atmosphérique contre 50 g/L sous 200 mbars) lors de la transestérification du fructose.

7.5. Activités biologiques des esters de flavonoïdes

L'acylation des flavonoïdes permet une amélioration de leur stabilité, de leur solubilité et de leur biodisponibilité (Chebil et al., 2006) et, par conséquent, de leur utilisation dans des formulations cosmétiques, alimentaires et thérapeutiques. Cependant, peu de travaux ont étudié l'effet de l'acylation sur les activités biologiques des flavonoïdes.

L'étude de l'activité antibactérienne de certains esters de flavonoïdes a été rapportée par Suresh Babu et al. (2005) qui ont montré que l'acylation du groupe 7-OH de l'oroxyline (figure 31) augmentait significativement son activité antibactérienne vis-à-vis d'une gamme de bactéries gram- (*Chromobacterium violaceum* (MTCC 2656), *Klebsiella aerogenes* (MTCC 39) et *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741) et gram+ (*Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Bacillus sphaericus* (MTCC 11) et *Staphylococcus aureus* (MTCC 96).

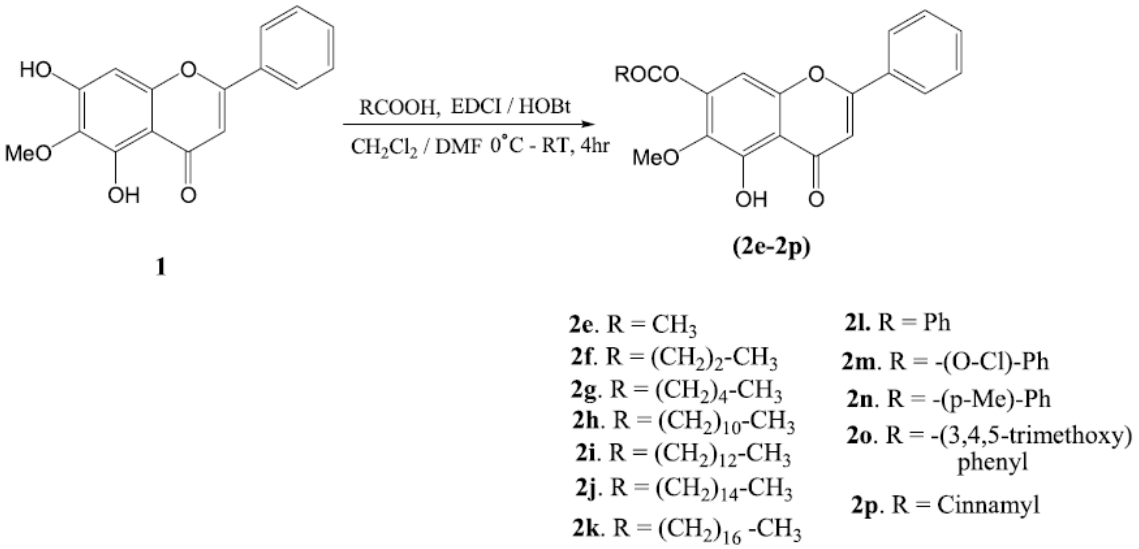


Figure 31: Synthèse de dérivés 7-O-acylés de l'oroxyline (Babu et al., 2005)

Ces auteurs ont testé l'activité antibactérienne de dérivés alkylés et acylés de l'oroxyline synthétisés par voie chimique et ont mis en évidence que l'introduction d'un groupement acyle en position C-7 de l'oroxyline améliorait d'une façon remarquable le pouvoir antibactérien de ce flavonoïde, indépendamment de la longueur de la chaîne et de la nature du donneur d'acyle.

Mellou et al. (2005) ont étudié les activités antibactériennes et antioxydantes de dérivés acylés de deux flavonoïdes isolés à partir de plantes endémiques grecques, le chrysoériol-7-O-β-d-(3 ″-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (1), flavonoïde monoglycosylé et le chrysoériol-7-[6‴-O-acetyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (2), flavonoïde diglycosylé. L'acylation de ces deux flavonoïdes par le laurate de vinyle, catalysée par la lipase de *Candida antarctica* dans le *tert*-butanol ou l'acétone a permis d'obtenir les esters P1 et P2 correspondant aux flavonoïdes (1) et (2) respectivement (figure 32). L'activité antibactérienne a été évaluée vis-à-vis de trois bactéries Gram+ (*S. aureus, B. cereus,*

M.flavus) et 3 bactéries Gram- (*P. aeruginosa, P. mirabilis et E. coli.*) Le dérivé acylé P2 possède une activité antibactérienne plus importante que le flavonoïde (2) ce qui a été expliqué par sa plus grande lipophilie, facilitant son passage à travers la membrane bactérienne.

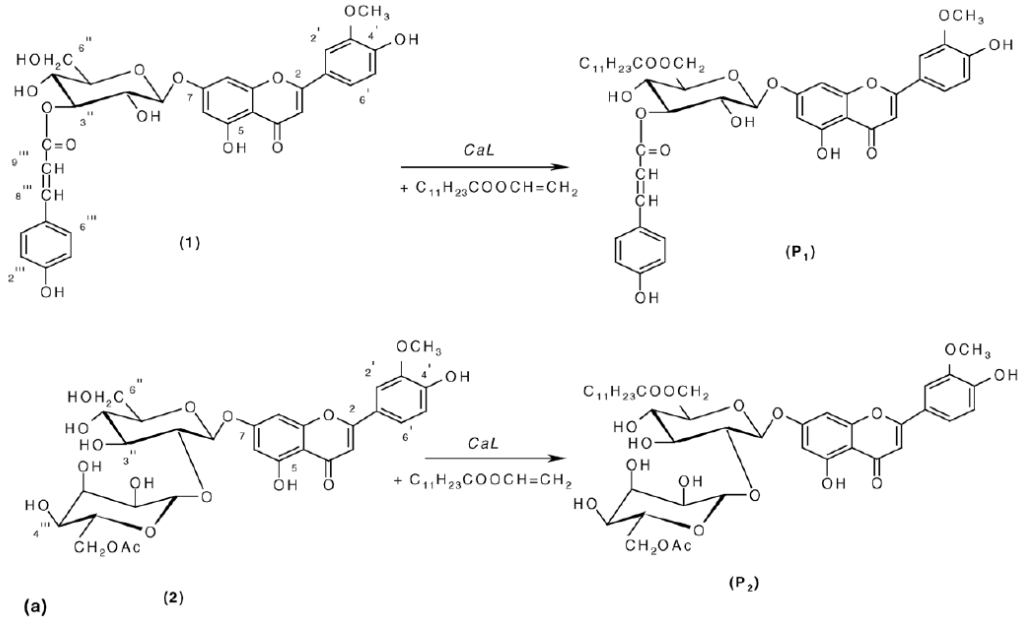


Figure 32: Esterification enzymatique du chrysoériol-7-O- β -D -(3 ″-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (1), et du chrysoériol-7-[6‴-O- -acetyl-β-D-dallosyl-(1-2) β-D-glucopyranoside] (2) (Melou et al., 2005).

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les deux dérivés acylés P1 et P2 ont montré une capacité à augmenter la résistance du LDL et du sérum total à l'oxydation induite *in vitro* plus importante que celle des flavonoïdes non acylés. Ces auteurs ont expliqué ce résultat par le fait que la partition d'un antioxydant donné entre la phase aqueuse et la phase lipidique est importante pour l'inhibition de l'oxydation de LDL (Frankel et al., 1996) et ont suggéré que la propriété lipophile d'un antioxydant lui permet de mieux s'incorporer dans la partie lipidique de la particule LDL et facilite son arrivée jusqu'au site de lipoperoxydation.

L'évaluation de l'activité antioxydante de la rutine et de ses dérivés acylés a été basée sur l'étude de leur capacité à améliorer la résistance des LDL (lipoprotéines de faible densité) et du sérum à l'oxydation induite par le cuivre *in vitro*. L'acylation de la rutine avec le laurate de vinyle n'a aucun effet sur son pouvoir antioxydant. Cependant, l'utilisation de stéarate de vinyle comme donneur d'acyle améliore l'activité antioxydante de la rutine dans le cas de l'oxydation du LDL mais pas dans le cas de l'oxydation du sérum. L'introduction de l'acide oléique, acide gras mono-insaturé, a engendré une importante activité antioxydante à de faibles concentrations, vis-à-vis de l'oxydation du LDL et du sérum.

Ces auteurs ont ainsi démontré que l'activité antioxydante dépendant de la lipophilie de la molécule et suggèrent que le caractère lipophile d'un antioxydant donné facilite son incorporation dans la partie lipidique de la particule de LDL pour atteindre le site de la lipoperoxydation. Ils ont également montré qu'en plus de la structure et la lipophilie de la molécule, d'autres mécanismes en relation avec la structure du donneur d'acyle, comme la présence d'une insaturation, peuvent influer sur le pouvoir antioxydant des esters de flavonoïdes.

Mellou et al. (2006) ont étudié la capacité à moduler la sécrétion de VEGF (Facteur Vasculaire Endothélial de Croissance, facteur majeur dans la régulation de l'induction de tumeur par angiogénèse) de la rutine, de la naringine et de leurs esters obtenus par acylation avec des acides gras en présence de la lipase de *Candida antarctica* dans l'acétone, L'étude a été réalisée sur des cellules K562, cellules leucémiques humaines erythrolymphoblastiques et les résultats ont montré que les esters de rutine possèdent une capacité plus importante à libérer le VEGF des cellules K562 que la rutine, indiquant que ces esters peuvent avoir un pouvoir antiangiogénique et antitumorale.

Madhusudana Rao et al. (2003) ont mis en évidence que le mesquitol, flavonoïde purifié à partir de *Dichrostachys cinerea*, présentait un pouvoir piégeur de radicaux libres et une activité inhibitrice de l'α-glucosidase. Cependant, ce flavonoïde n'a pas d'activité inhibitrice de la xanthine oxydase. L'acylation chimique du mesquitol sur la position 3-OH avec des chaînes aliphatiques de différentes longueurs améliore son pouvoir inhibiteur de l'α-glucosidase et lui confère une activité inhibitrice vis-à-vis de la xanthine oxydase (figure 33).

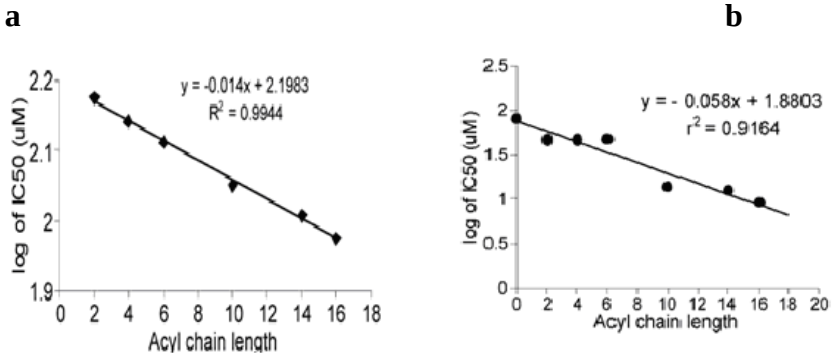


Figure 33: Pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase (a) et de la β-glycosidase (b) du mesquitol et de ses esters-3-O-acylés (Madhusudana Rao et al., 2003).

Une relation structure activité a été établie par ces auteurs qui ont observé une corrélation positive entre le pouvoir d'inhibiteur des enzymes étudiées (la xanthine oxydase et

l'α-glucosidase) et la longueur de la chaîne acyle des esters aliphatiques. Ces résultats montrent que le degré de lipophilie joue un rôle important dans l'induction du pouvoir inhibiteur de ces enzymes. Concernant le piégeage des radicaux libres, ces auteurs ont montré que l'acylation n'a pas influencé le pouvoir piégeur des radicaux ABTS et DPPH du mesquitol.

Katsoura et al. (2006) ont mis en évidence que l'influence de l'acylation avec différents donneurs d'acyle : acide oléique, stéarate de vinyle et laurate de vinyle, sur l'activité antioxydante de la rutine dépendait du donneur d'acyle.

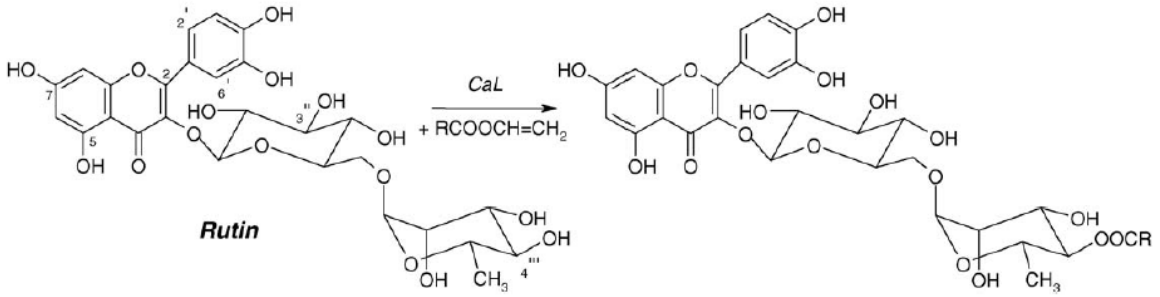


Figure 34: Acylation enzymatique de la rutine en liquide ionique, catalysée par la CALB (Katsoura et al., 2006).

Les nombreuses propriétés biologiques des acides aromatiques ont incité les chercheurs à étudier leur utilisation pour l'acylation de flavonoïdes. Ainsi, Parejo et al. (2005) ont montré que des dérivés acylés de quercetagine glycosides (quercetagetine (6-O-caffeoyl-β-D-glucopyranoside), quercetagine (6-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside) et quercetagetine (6-O-caffeoyl-β-D-glucopyranoside) présentent une activité antiradicalaire significative vis-à-vis du radical DPPH par comparaison aux différents standards utilisés (quercétine, isoquercitrine, rutine, BHA, acide chlorogenique et quercetagine). Les dérivés p-coumaroyle de quercétine et de kampférol 3-O-biosides, composés présents en quantité dans le *Ginko biloba*, se sont révélés efficaces pour le traitement des symptômes de l'insuffisance cérébro-vasculaire (Hasler et al., 1992). Egalement, il a été montré que les dérivés à base d'acide p-coumarique de kampférol et d'isorhamnétine inhibent la tyrosinase (Kubo et Yokokawa, 1992).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Nitraria retusa* ont été collectées dans la ville de Monastir, près de la saline de Sahline (route de Wardanine). En effet, cette plante étant halophile, elle pousse sur des sols salins. La partie aérienne de la plante a été mise à sécher à l'ombre pendant 2 semaines. Les feuilles ont été ensuite détachées des tiges et broyées dans un mixeur pour les transformer en poudre.

1.2. Enzymes

1.2.1. La lipase de *Candida antarctica* (CALB)

La lipase de *Candida antarctica* (CALB) utilisée est Novozyme 435®, préparation industrielle produite par Novozyme et commercialisée par Sigma. Elle est fournie avec une activité de 7000 PLU.g^{-1} (Propyl Laurate Synthesis) où une unité PLU est définie comme la quantité d'enzyme qui permet la transformation d'1 µmol d'acide laurique en laurate de propyle par minute en conditions standards et équimolaire. Il s'agit d'une lipase immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse. Cette préparation se présente sous forme de granules blanches de diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm avec une teneur en eau de 1 à 2 % (p/p) et une teneur protéique enzymatique comprise entre 1 et 10 % (p/p).

1.2.2. La lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL)

La lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur des particules de céramique est produite par Biochemika et commercialisée par Fluka. Elle se présente sous forme de petites granules beiges et possède une activité de 15 000 U/g (1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'1 µmol d'acide oléique par minute à pH 8 et 40°C lors de l'hydrolyse de la trioléine).

1.3. Les lignées cellulaires

L'activité antiproliférative de molécules étudiées, a été évaluée vis-à-vis de cellules cancéreuses Caco2 et de cellules saines HUVEC. Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules en phase exponentielle de croissance dans le but d'étudier les effets des molécules testées sur la prolifération cellulaire.

1.3.1. La lignée Caco2

Les cellules Caco2 forment une lignée cellulaire cancéreuse de colon qui a été isolée d'un adénocarcinome colique humain. Ces cellules proviennent du laboratoire URAFPA (Nancy, France).

Les cellules présentent une phase exponentielle de croissance et entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. A confluence et au-delà, les cellules forment une mono couche avec des jonctions serrées.

1.3.2. La lignée HUVEC

Les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, No. 07073101, ECACC Salisbury, UK) sont des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale de cordons sains. Elles sont cryopréservées en fin de culture primaire à une concentration supérieure à 500 000 cellules / mL et peuvent être cultivées et propagées jusqu'au passage 12. Ces cellules proviennent d'un mélange initial de plusieurs individus.

Toutes les expériences, avec ces deux lignées ont été réalisées avec des cellules en phase exponentielle de croissance dans le but d'étudier les effets des molécules testées sur la prolifération cellulaire.

1.4. Solvants

Les solvants utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau 7.

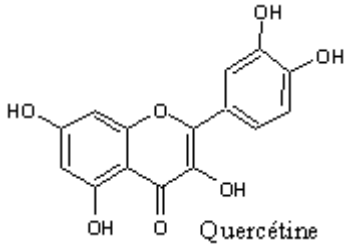
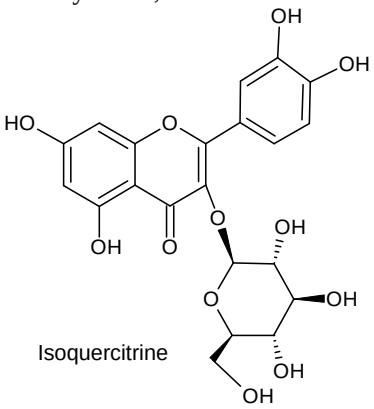
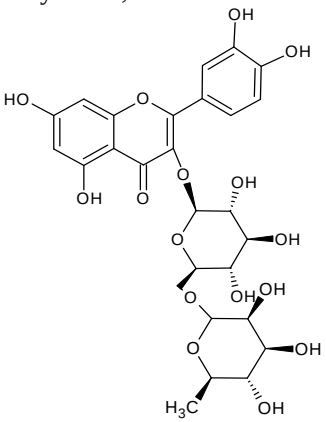
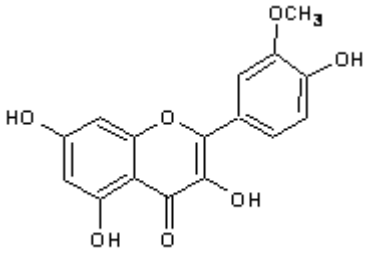
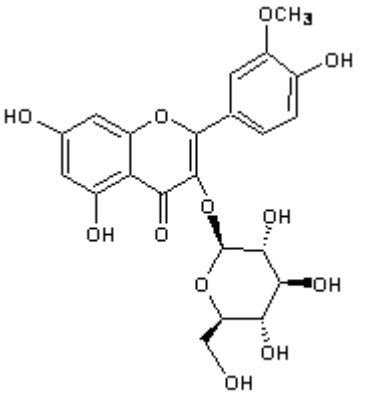
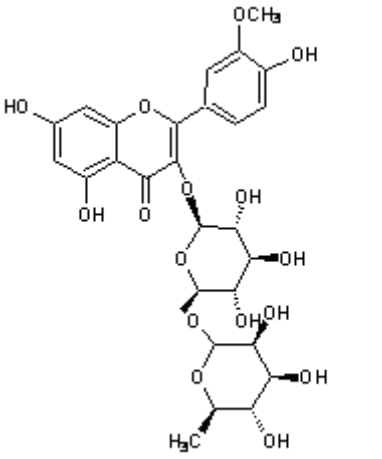
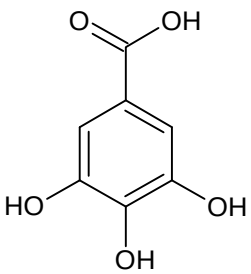
Tableau 7: Liste des solvants utilisés

Solvant	Fournisseur	référence
2 méthyl-2butanol	Fluka chemica	66000
Pyridine	Merck	4201249
Diméthyle sulfoxyde	Fluka chemica	25690
Méthanol	Carlo Erba	412383
Chloroforme	Fluka chemica	25690
Acétate d'éthyle	Sigma-Aldrich	45760
Hexane	Prolabo	24575.320
Butanol	Carlo Erba	414131
Acide trifluoroacétique	Accros organics	139725000
Acide acétique	Normapur	20 40.334
Isopropanol	Sigma	1-09516
Acide chlorydrique	Normapur	20 252.324
Ethanol	Prolabo	MC310653

1.5. Composés phénoliques

Les composés phénoliques utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau 8.

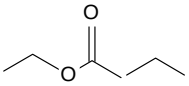
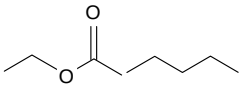
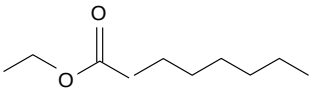
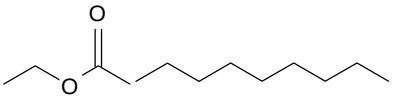
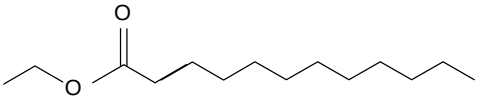
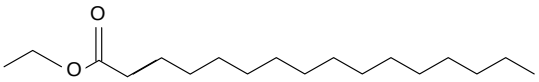
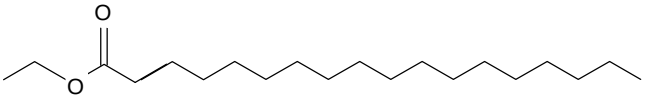
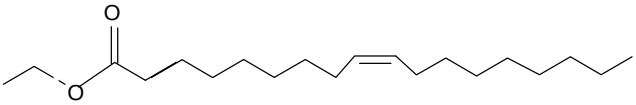
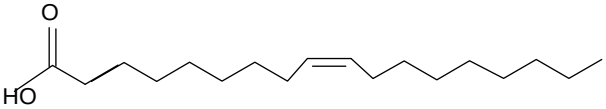
Tableau 8: Descriptif et structure de composés phénoliques utilisés dans cette étude

Flavonoïdes, Masse molaire, Fournisseur, Référence		
Flavonoïdes		
Quercétine, (MM=302 g/mol), Extrasynthèse , C066.  Quercétine	Isoquercitrine (MM=464 g/mol), Extrasynthèse, 0080.  Isoquercitrine	Rutine (MM=610 g/mol), Extrasynthèse, 0074.  Rutine
Isorhamnétine, (MM=316 g/mol), Extrasynthèse, 1120 S  Isorhamnétine	Isorhamnétine-3-O-glucoside (MM=478 g/mol), Extrasynthèse, 1128.  Isorhamnétine-3-O-glucoside	Isorhamnétine-3-O-rutinoside, (MM=624 g/mol), Extrasynthèse, 1133 S.  Isorhamnétine-3-O-rutinoside
Acide phénolique		
Acide gallique (MM=170 g/mol), Fluka-chemica, 48630  Acide gallique		

1.6. Acides gras

Les acides gras étudiés dans ce travail sont listés dans le tableau 9

Tableau 9: Descriptif des esters éthyliques d'acides gras utilisés

Ester éthylique, Masse Molaire (g/mol), Fournisseur, référence	**Structure**
Butyrate d'éthyle (MM=116 g/mol), Sigma, B239	
Caproate d'éthyle (MM=144 g/mol), Fluka chemica, 21550	
Caprylate d'éthyle (MM=172 g/mol), Fluka chemica, 21670	
Décanoate d'éthyle (MM=200 g/mol), Sigma-Aldrich, 148970	
Laurate d'éthyle (MM=228 g/mol), Sigma, L4625	
Palmitate d'éthyle (MM=284 g/mol), Sigma, P9009	
Stéarate d'éthyle (MM=312 g/mol), Sigma, S8269	
Oléate d'éthyle (MM=310 g/mol), Sigma-Aldrich, 268011	
Acide oléique (MM=282 g/mol), sigma-Aldrich, 490423	

1.7. Réactifs

Tableau 10: Descriptif des réactifs utilisés pour cette étude

Réactif	Fournisseur	Référence
2-Aminoéthyl diphénylborinate	Sigma	G-1876
L-glutamine	Sigma	G-3126
L-acide glutamique -γ-éthyl ester	Sigma	G-1876
hydroxylamine	Aldrich	467804
N-(1-Naphtylenediamine dihydrochloride)	Sigma	N9125
Acide sulfanilique	Sigma	S5263
Rouge neutre	Sigma	N-2880
Ethylène-diamine tetra acétate	Sigma	E-5134
Phosphate de potassium	Sigma	P-7386
Sérum de veau fœtal	Eurobio	CVSFVF00-01
Milieu d'eagle modifié par dulbecco (DMEM)	Sigma	D5796
bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)	Sigma	M5655
Milieu de croissance cellulaire endothéliale (ECGM)	ECACC	6091509
tampon phosphate (PBS)	Sigma	D5652
Pénicilline	Eurobio	CABPESO2-OU
Réactif de Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich	F-9252
Acide ethylène diamine tétraacétique (EDTA)	Sigma	E-5134
Xanthine	Sigma	X7375
Acide 2,2-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique) ABTS	Sigma	A1888
1,1 diphényl-2-picryl hydrazil (DPPH)	Sigma	D9132
Acide-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique,	Fluka	56610

2. Méthodes

2.1. Extractions/fractionnement

Différents extraits ont été préparés à partir de feuilles sèches de *N. retusa*. Quatre extraits ont été obtenus par extraction à l'appareil de soxhlet et un extrait aqueux a été préparé par décoction. Afin de concentrer les flavonoïdes, certains extraits ont ensuite été fractionnés.

2.1.1. Préparation d'extraits à partir des feuilles de *Nitraria retusa* par l'appareil de Soxhlet.

L'extraction à l'aide d'un appareil de type soxhlet est une technique couramment utilisée pour isoler des composés actifs d'origine végétale sans les dégrader.

On introduit 100 g de poudre de la plante dans la cartouche filtrante et 500 mL de solvant dans le ballon. Cette extraction en continu est menée jusqu'à extraction totale des composés extractibles. La durée d'extraction est de 8h. Des extractions successives par différents solvants, du moins polaires au plus polaires : l'hexane, puis le chloroforme, l'acétate d'éthyle et enfin le méthanol ont été réalisées à la température d'ébulition de chaque solvant.

L'extrait à l'hexane contient des composés apolaires, tandis que le chloroforme extrait les composés peu polaires et que l'acétate d'éthyle permet d'obtenir un extrait riche en composés moyennement polaires. Le méthanol, solvant le plus polaire, extrait, quant à lui les composés les plus polaires.

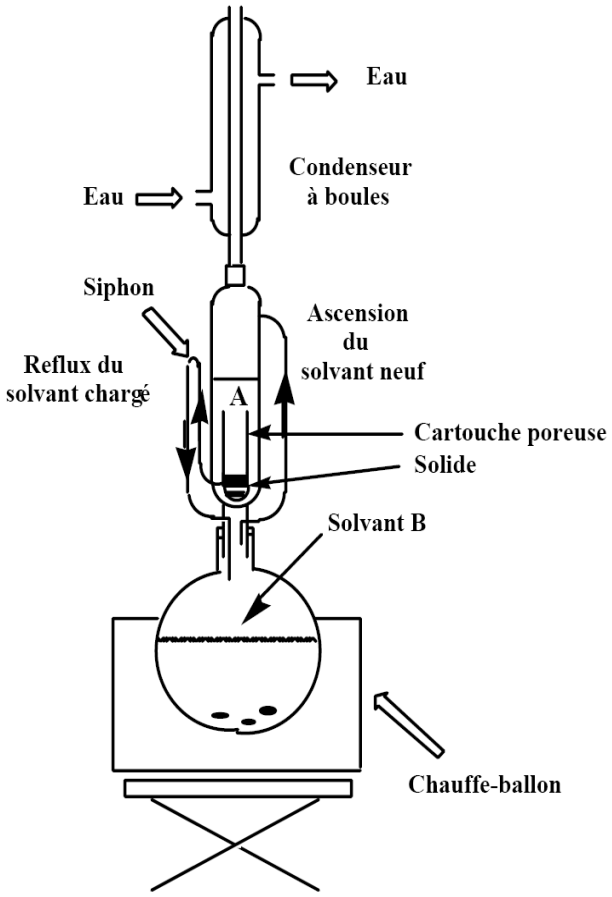


Figure 35: Appareil de soxhlet

2.1.2. Fractionnement de l'extrait au méthanol

L'extrait au méthanol est évaporé à sec. 30 g de résidu sec de cet extrait sont repris dans 200 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite successivement avec 3x200 mL de chloroforme, 3x200 mL d'acétate d'éthyle puis 3x200 mL de butanol.

2.1.3. Préparation d'un extrait aqueux à partir des feuilles de *Nitraria retusa*

100 g de poudre sont mis dans 300 mL d'eau distillée à ébullition, pendant 15 mn. Après refroidissement, l'extrait aqueux est filtré, congelé puis lyophilisé. Cet extrait lyophilisé doit être conservé à +4°C.

2.1.4. Préparation des extraits au méthanol à partir de l'extrait aqueux

2.1.4.1. Préparation à l'aide de l'appareil de soxhlet (SoxMAE)

10 g de lyophilisat de l'extrait aqueux liophylisé sont placés dans l'appareil de soxhlet en présence de 200 mL de méthanol à 60°C. Après 6h d'extraction, le solvant est évaporé dans un évaporateur rotatif. L'extrait est conservé dans un lieu sec et à l'obscurité.

2.1.4.2. Préparation par macération à reflux (MMAE)

10 g d'extrait aqueux lyophilisé de feuilles de *Nitraria retusa* sont placés dans 200 Ml de MeOH et chauffés à reflux pendant 2h. Le solvant est ensuite évaporé. L'extrait est récupéré et stocké dans un milieu sec et à l'oscurité.

2.2. Analyses

2.2.1. Etude du contenu en flavonoïdes et en polyphénols totaux des divers extraits

2.2.1.1. Caractérisation des flavonoïdes

La présence de flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine. En effet, les flavonoides sont responsables d'un dégagement d'hydrogène et de l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge pourpre, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium.

Protocole : Quelques mg de poudre d'extrait à caractériser sont dissouts dans 5 mL de solvant d'extraction. La solution obtenue est chauffée légèrement et filtrée, quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de tournures de magnésium sont ajoutés. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes en anthocyanes, on obtient une coloration rouge.

2.2.1.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits et des fractions obtenus à partir de feuilles de *Nitraria retusa* a été déterminée par la méthode décrite par Sokman et al. (2005). Ces auteurs ont utilisé la méthode de Folin Ciocalteu pour calculer le teneur en polyphénols d'un

extrait végétal. Cette méthode consiste à ajouter 2,5 mL d'une solution de Folin Ciocalteu (0,2 N) à 0,5 mL d'échantillon. Après 5 mn d'agitation, 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (75 g/l) sont ajoutés. Après 2h d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 760 nm est mesurée. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents acide gallique à l'aide d'une courbe étalon (figure 36)

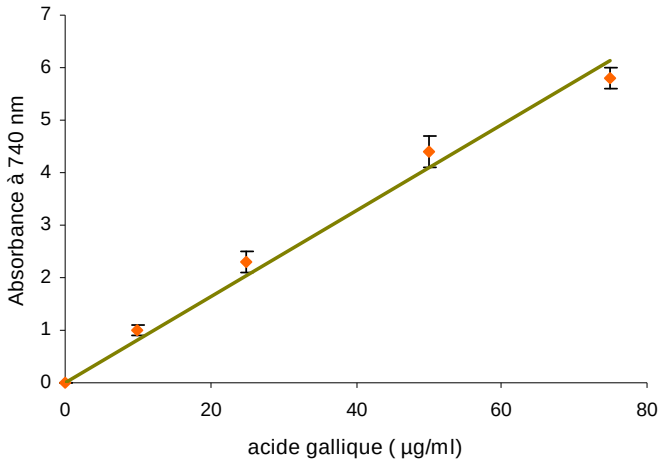


Figure 36: Courbe étalon de l'acide gallique

2.2.1.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits et des fractions obtenus à partir de feuilles de *Nitraria retusa* a été calculée par la méthode décrite par Sokman et al. (2005). Cette méthode consiste à ajouter 0,5 mL d'une solution d'$AlCl_3$ (2% dans de l'éthanol absolu) à 0,5 mL d'échantillon. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm. La teneur en flavonoïdes totaux est calculée en terme d'équivalent quercétine par référence à la courbe étalon (figure 37).

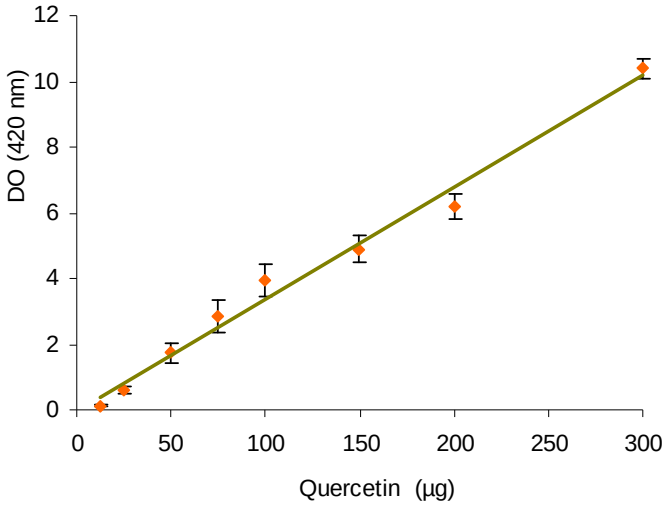


Figure 37:Courbe étalon de la quercétine

2.2.2. Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince

2.2.2.1. Identification des flavonoïdes dans les extraits

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant, ou mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend des différences d'affinité pour le solvant et pour la phase stationnaire.

Tous les extraits et les fractions obtenus à partir des feuilles de *N.retusa* ont été analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince. Les plaques de silice utilisées sont de dimensions 20 x 20 cm (Silica gel 60, Merck). Des dépôts de 10 µL de chaque extrait (à 10 g/l dans le méthanol) ont été effectués.

La plaque de silice est ensuite placée dans une cuve contenant l'éluant suivant : acétate d'éthyle/méthanol /eau (100 : 25 : 10 v/v/v). Après migration, le solvant est évaporé par séchage (à l'étuve ou à l'aide d'un sèche-cheveux). Les bandes correspondant aux flavonoïdes sont visualisées sous UV à 254 et 365 nm puis pulvérisées avec une solution de réactif de NEU (2 - aminoéthyldiphénylborate de sodium à 1 % dans le méthanol) qui permet la visualisation des flavonoïdes en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm. Les Rf

obtenus sont comparés au Rf obtenus pour des flavonoïdes standards utilisés comme références.

2.2.2.2.. Analyse des produits de synthèse enzymatique

La méthode décrite précédemment est appliquée à des prélèvements de milieux réactionnels. Des dépôts de 10 µL sont effectués.

Différents mélanges de solvants sont utilisés selon les molécules à séparer.

- éluant A : acétate d'éthyle/méthanol /eau (100 : 8 : 10 v/v/v) pour séparer l'isoquercitrine, la quercétine (produit de dégradation de l'isoquercitrine) et les dérivés acylés de l'isoquercitrine
- éluant B : chloroforme/acide acétique/méthanol (95: 0,5: 4,5 v/v/v) pour séparer l'isoquercitrine, l'acide glutamique éthyl ester et l'acide glutamique.
-éluant C : acétate d'éthyle/méthanol /eau (100 :8 :4 v/v/v) pour séparer l'isorhamnetine-3-O-glucoside et ses dérivés acylés.

En fonction de leur structure chimique, les composés sont révélés selon l'une des procédures suivantes :

- pulvérisation d'une solution méthanolique de réactif de NEU à 2% dans le méthanol qui permet de visualiser la plupart les flavonoïdes (Brasseur et Angenos, 1986).

- pulvérisation d'une solution éthanolique de ninhydrine à 2 % réagissant spécifiquement avec les fonctions amines primaires des composés et conduisant à l'apparition d'un chromophore violet (révélation destructive).

- pulvérisation d'une solution aqueuse de permanganate de potassium à 0,1 M réagissant de façon non spécifique avec tous les composés réducteurs et conduisant à l'apparition d'une coloration jaune (révélation destructive).

- exposition à des vapeurs saturées en iode, colorant spécifiquement les composés présentant des doubles liaisons (révélation non-destructive).

- les Rf obtenus sont comparés aux Rf des standards utilisés dans la réaction afin de détecter la présence de nouveaux produits.

2.2.3. Analyses par CLHP-SM

2.2.3.1. Identification des flavonoïdes dans les extraits

Les composés sont séparés en chromatographie d'interaction hydrophile. Ainsi, les composés sont d'autant plus fortement retenus qu'ils contiennent davantage de résidus hydrophiles, comme le glucose ou le rhamnose dans notre étude.

- **Matériel**

Colonne TSKGel Amide 80 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	Tosoh, France
Précolonne TSKGel Amide 80 (15 x 2,1 mm, 5 µm)	Tosoh, France
Système de chromatographie liquide haute performance	PerkinElmer, France
Détecteur UV/VIS série 200	PerkinElmer, France
Détecteur à barrette de diode	PerkinElmer, France
Spectromètre de masse SCIEX API 150EX	PerkinElmer, France

- **Méthode**

Les conditions opératoires sont les suivantes :

Eluant A : ACN/H_2O/TFA (99/1/0,1 - v/v/v), filtré sur 0,22 µm

Eluant B : ACN/H_2O/TFA (55/45/0,1 - v/v/v), filtré sur 0,22 µm

Solvant dégazé à l'hélium : 5 mL/mn

Débit de l'éluant : 0,2 mL/mn

Température de la colonne : 40 °C

Détection : U.V. à 214 nm et DAD

Volume injecté : 5 à 10 µL

Durée d'analyse : 90 mn

Un gradient linéaire du solvant: 100% A à 100% B en 75 mn est appliqué. La colonne est ensuite rééquilibrée avec le solvant A pendant 15 mn.

Des échantillons standards sont injectés : l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside à une concentration de 1g/l.

Le couplage avec le spectromètre de masse SCIEX API 150EX permet de détecter les molécules en mélange en donnant leurs masses.

Après avoir développé la méthode en CL-SM, les mêmes analyses ont été réalisées en CL-SM^n : système de chromatographie (Thermo Fisher Scientific, France) équipé d'un détecteur UV (214 nm) et couplé, lui-aussi à un spectromètre de masse, le LTQ (Thermo electron corporation®, USA). Les 2 spectromètres de masse utilisés sont équipés d'une source d'ionisation de type ESI (electrospray ionisation).

Le spectromètre de masse SCIEX API 150EX est un simple quadrupôle. La température du capillaire est fixée à 150 °C et la tension à 5 kV. Le balayage est effectué sur une gamme de masse m/z 100 à m/z 2000.

Le spectromètre de masse LTQ est un SM/SM. Il permet de fragmenter les molécules et il est ainsi possible d'identifier certaines molécules inconnues. Dans le cas des flavonoïdes contenus dans les extraits, la fragmentation permet de fragmenter les résidus « sucres » (glucose et rhamnose). Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz de collision dans la trappe d'ions : hélium ; dans la source, azote comme gaz vecteur (50), gaz de balayage (10) et gaz auxiliaire (10) ; mode positif d'ionisation par électrospray, température du capillaire 300 °C, tension de la source 5.0 kV.

2.2.3.2. Analyse des produits de synthèse enzymatique

La colonne Altima C18 amide permet de séparer des composés via des interactions hydrophobes et des interactions avec les groupes amides insérés dans la phase stationnaire. Cette colonne est adaptée pour la séparation de composés à caractère tensioactif. Elle permet aussi de retenir, malgré ses propriétés de phase inverse, les composés hydrophiles comme certains peptides et d'éviter les problèmes d'étalement rencontrés parfois lors de l'élution de composés tensioactifs (lipopeptides).

- **Matériel**

Colonne Altima C18 amide (150 x 2,1 mm, 5 µm)	Alltech, France
Précolonne Altima C18 amide (15 x 2,1 mm, 5 µm)	Alltech, France
Système de chromatographie Shimadzu LC 10 AD-VP	Shimadzu, France ,
Détecteur à barrette de diode SPD-M10A VP	Shimadzu, France

Détecteur évaporatif à diffusion de lumière ELSD – LT Shimadzu, France

- **Méthode**

Les conditions opératoires sont les suivantes :

Eluant A : MeOH/H_2O/TFA (40/60/0,1 - v/v/v), filtré sur 0,22 µm

Eluant B : MeOH/TFA (100/0,1 - v/v), filtré sur 0,22 µm

Solvant dégazé à l'hélium : 5 mL/mn

Débit de l'éluant : 0,2 mL/mn

Température de la colonne : 25 °C

Détection : U.V. à 214 nm

Volume injecté : 5 à 10 µL

Durée d'analyse : 34 mn

Gradient appliqué : 100% A pendant 1 mn, puis gradient de 100% A à 100% B en 15 mn, maintien de 100% B pendant 8 mn, gradient de 100% B à 100% A en 1 mn, et stabilisation avec 100% A pendant 9 mn.

Les échantillons ont été analysés par spectrométrie UV à 214 et à 254 nm. Les flavonoïdes et les produits de synthèse sont visibles à ces deux longueurs d'onde. Les esters éthyliques d'acides gras sont mieux détectés à 214 nm.

Ces conditions ont permis de séparer et de quantifier, dans les échantillons prélevés de milieu réactionnel au cours du temps, filtrés à 0.2 µm et dilués 10 fois avant injection, les composés suivants:

-les substrats flavonoïdes

-les substrats donneur d'acyle : les acides gras éthyles ester, les acides aminés.

-les produits de synthèses

-le témoin interne utilisé : 2, 6 diméthylphénol.

Les courbes de calibration de la quercétine, l'isoquercitrine et le 2,6 diméthylphénol sont présentées dans la figure 38.

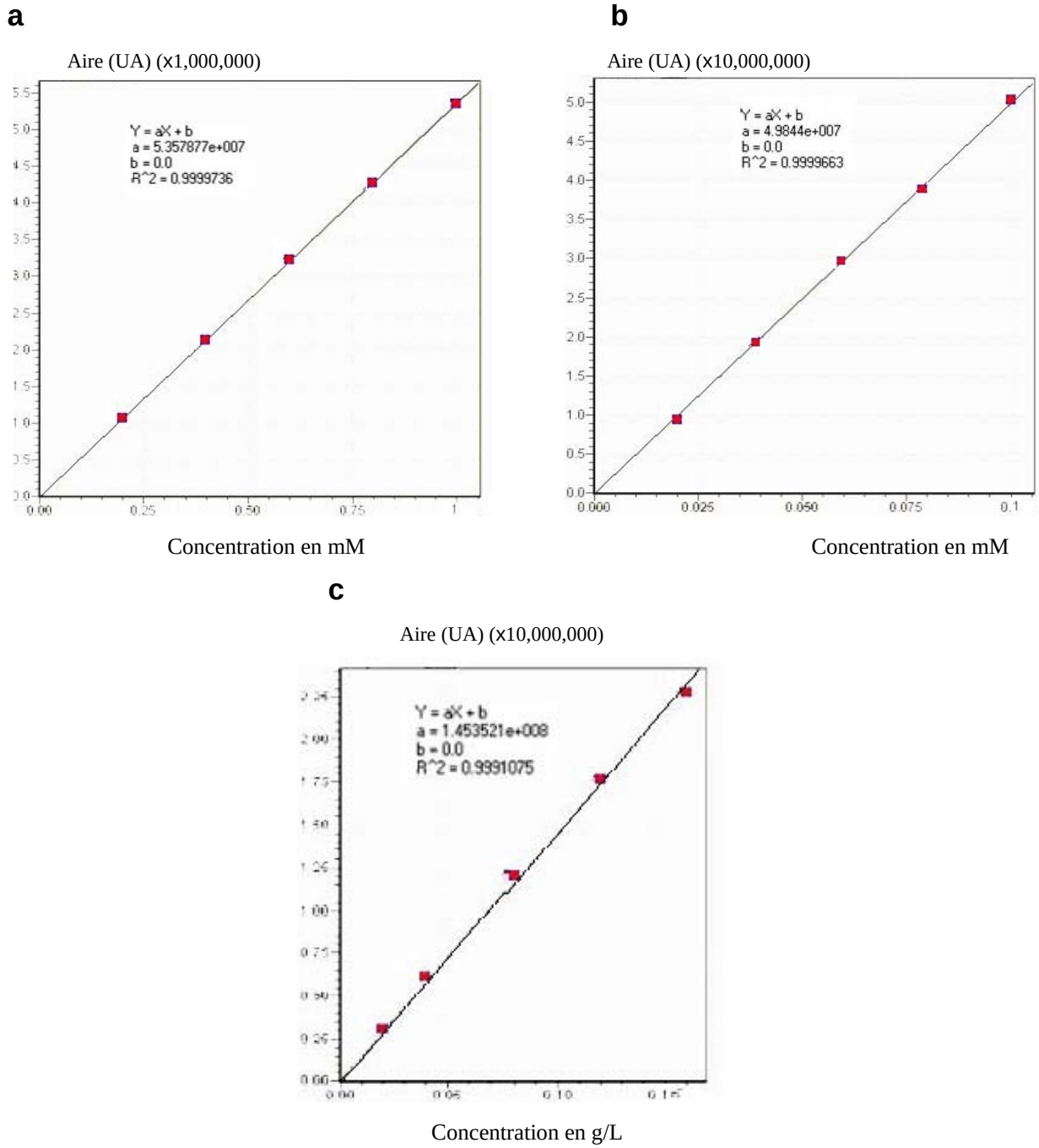


Figure 38: Courbes de calibration pour le dosage CLHP de l'isoquercitrine (a), de la quercétine (b) par spectrophotométrie UV à 254 nm et du 2,6 diméthylphenol (c) par spectrophotométrie UV à 214 nm.

2.3. Purification de flavonoïdes à partir de la fraction au butanol

La fraction au butanol étant la plus concentrée en flavonoïdes, elle a été fractionnée par injections successives sur une colonne Altima C18 Amide en utilisant une chaîne de

chromatographie semi-préparative. Les pics contenant les flavonoïdes désirés ont été collectés. Après regroupement des fractions d'intérêt, le solvant a été évaporé.

- **Matériel**

Colonne Altima C18 Amide (250 x 4,6 mm, 5 µm), Alltech, France
Précolonne Altima C18 Amide (15 x 4,6 mm, 5 µm), Alltech, France
Système de chromatographie Biocad®700 E, Applied Biosystems, USA
Injecteur collecteur automatique Cobra, Applied Biosystems, USA

- **Méthode :**

Les conditions opératoires sont les suivantes :

Eluant A : MeOH/H_2O/TFA (40/60/0,1 - v/v/v), filtré sur 0,22 µm
Eluant B : MeOH /TFA (100/0,1 - v/v), filtré sur 0,22 µm
Solvant dégazé à l'hélium : 5 mL/mn
Débit de l'éluant : 1 mL/mn
Température de la colonne : 25 °C
Détection : U.V. à 214 nm
Volume injecté : 5 à 10 µL
Durée d'analyse : 34 mn
Gradient appliqué : 100% A pendant 1 mn, puis gradient de 100% A à 100% B en 15 mn, maintien de 100% B pendant 8 mn, gradient de 100% B à 100% A en 1 mn, et stabilisation avec 100% A pendant 9 mn.

2.4. Purification des produits de synthèse

2.4.1. Purification des esters d'isoquercitrine

2.4.1.1. Par chromatographie sur gel de silice

Les réactions d'acylation de l'isoquercitrine par l'oléate d'éthyle en solvant organique, M_2B_2, catalysées par Novozym 435® sont arrêtées après avoir atteint l'équilibre thermodynamique (à 72h). Les milieux réactionnels sont alors filtrés afin d'éliminer l'enzyme puis concentrés par évaporation, sous vide, non-totale du solvant.

L'échantillon résultant de ce traitement dilué dans un minimum de solvant d'élution (1mL) est alors déposé sur une colonne préparative contenant de la silice (Silica gel 60, Fluka). L'éluant utilisé est le même que celui utilisé pour l'analyse par CCM : acétate d'éthyle / méthanol / eau (100/8/10 v/v/v) pour la purification des esters d'isoquercitrine et acétate d'éthyle / méthanol / eau (100/8/4 v/v/v) pour la purification des esters d'isorhamnetine 3-O-glucoside. En sortie de colonne, les fractions sont collectées à un débit de 1 mL/min. Le système de purification est présenté figure 39.

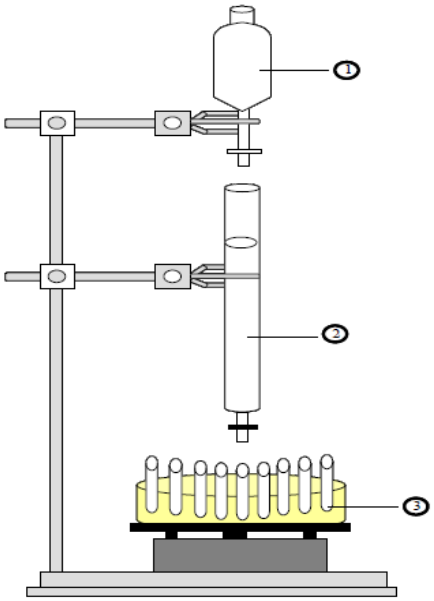


Figure 39: Dispositif expérimental utilisé pour la purification des esters d'isoquercitrine. 1. Réservoir de phase mobile (acétate d'éthyle-méthanol-eau 100/8/10 v/v/v). 2. Colonne de silice 300 x 2,5 mm. 3. Collecteur automatique de fractions.

Les fractions collectées sont analysées par CCM afin de déterminer les fractions d'intérêt. Ensuite, celles-ci sont regroupées et le solvant est éliminé par évaporation sous vide (40°C, 250 mbar). Le résidu sec est pesé.

2.4.1.2. Par CLHP semi préparative.

La purification des esters d'isoquercitrine à courtes chaines de C4 à C8 n'étaient pas réalisable sur gel de silice (mélange avec l'isoquercitrine). Ce mélange a été séparé sur une colonne Altima C18 Amide en utilisant une chaîne de chromatographie semi-préparative comme décrit dans le paragraphe 2.3. les séparations successives ont permis de collecter les esters purifiés purs.

2.4.2. Purification des esters d'isorhamnetine-3-O-glucoside par chromatographie sur couche mince.

Les réactions d'acylation de l'isorhamnetine-3-O-glucoside par le laurate d'éthyle et le butyrate d'éthyle catalysées par Novozym 435® sont mises en oeuvre pendant 72 h dans le 2-méthyl 2-butanol. Les milieux réactionnels sont ensuite filtrés afin d'éliminer l'enzyme puis concentrés partiellement par évaporation sous vide. Ils sont alors déposés sur une plaque de silice 20 x 20 cm (Silica gel 60, Merck). La plaque est développée à l'aide d'un éluant dans une cuve saturée à base d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (100/8/7 v/v/v). L'élution terminée, la plaque est mise à sécher. Une bande étroite de la plaque est révélée avec une solution de réactif de NEU (2% dans le méthanol) afin de localiser la zone de migration du composé d'intérêt. La silice contenant le produit d'intérêt est alors décollée du support puis le composé est désorbé dans du méthanol (10 mL/ g de silice), sous agitation (250 rpm) pendant 12 h. Le mélange est alors filtré puis évaporé à sec pour obtenir le composé purifié.

Le produit sec est alors pesé et identifié par analyse CLHP-SM.

2.5. Analyse par RMN

Les spectres RMN du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C ont été effectués pour les esters d'isoquercitrine. Avant analyse, les produits sont solubilisés soit dans du chloroforme deutéré ($CDCl_3$) soit du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO). Le spectromètre utilisé est un Brücker 300 MHz, 7,1 T (Allemagne).

2.6. Mise en oeuvre des réactions enzymatiques d'acylation

Différentes conditions de mise en œuvre des synthèses ont été utilisées au cours de cette étude.

2.6.1 Préparation des milieux de synthèse

Pour les réactions de synthèse des esters de flavonoïdes, la présence d'eau doit être évitée au maximum pour limiter les réactions d'hydrolyse. Pour cela, le matériel et les

produits utilisés doivent être parfaitement secs : les réacteurs et la verrerie sont séchés pendant 24h dans une étuve à 100°C. Les substrats et l'enzyme sont également séchées pendant au moins 4 jours dans un dessiccateur. Les solvants sont stockés sur tamis moléculaire (4 Å), au moins 4 jours avant utilisation. Les milieux de synthèse sont préparés en solubilisant les substrats dans le solvant choisi pendant une nuit, à 60 °C. Des volumes de 10 mL ou de 20 mL ont été choisis pour tous les milieux réactionnels. Les milieux de synthèse contiennent 10 mM d'isoquercitrine ou 4 mM d'isorhamnétine-3-O-glucoside et 10 équivalents molaires de donneur d'acyle. La réaction est initiée par l'ajout de CALB (30 g/L).

2.6.2. Synthèses enzymatiques sous pression atmosphérique

Les réactions sont menées à 60 °C, sous une agitation de 200 rpm, en réacteur de type Wheaton®. Elles sont initiées par l'ajout de l'enzyme immobilisée (30 g/L) et conduites jusqu'à ce que l'équilibre thermodynamique soit atteint.

Les réacteurs Wheaton® présentent une capacité de 50 mL et sont équipés d'un barreau aimanté suspendu qui évite l'érosion des billes d'enzyme au cours des synthèses. Leur chauffage est assuré par un bain d'huile thermostaté. Afin de limiter l'évaporation du solvant au cours des synthèses, le haut des réacteurs est équipé d'un dispositif de refroidissement (figure 40).

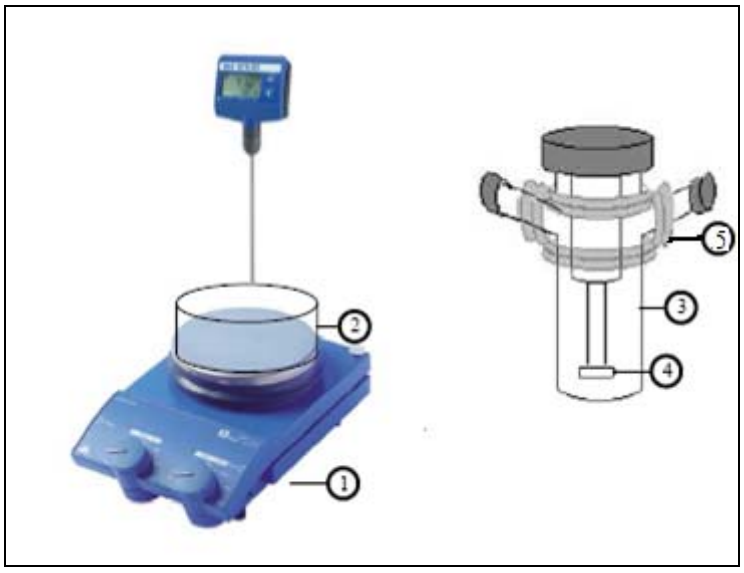


Figure 40: Schéma du réacteur Wheaton® utilisé pour la mise en oeuvre des réactions sous pression atmosphérique (1. plaque chauffante et d'agitation thermorégulée. 2. bain d'huile. 3. réacteur Wheaton®. 4. barreau aimanté suspendu. 5. système de refroidissement).

2.6.3. Synthèses enzymatiques sous pression réduite

Les synthèses sous pression réduite ont été menées à 60 °C, sous une pression de 500 mbar et une agitation de 150 rpm, avec des concentrations de réactifs et de catalyseur identiques à celles décrites précédemment. Dans ces conditions, le solvant est sujet à une évaporation partielle. Pour tenir compte des variations de volume pour la détermination des concentrations des substrats résiduels et des produits au cours des synthèses, un étalon interne a été ajouté aux milieux réactionnels. Il s'agit du 2,6 diméthylphénol. Celui-ci est inerte ; il est introduit dans les milieux à hauteur de 0,2 g/L juste avant l'ajout du catalyseur.

Les synthèses sous pression réduite ont été menées dans le ballon d'évaporation d'un évaporateur rotatif. (R-144 ou R-205 Büchi). Celui-ci comporte une pompe (KNF Neuberger Laboport ou Büchi Vac® V-500), un régulateur de pression (Switch-box B-745 ou V-800) et un bain thermostaté (Büchi Heating Bath B-490 ou Büchi Water Bath B-480) contenant de l'huile de silicone (Rhodorsil® 47V20) comme montré dans la figure 41.



Figure 41: Evaporateur rotatif utilisé pour les synthèses sous pression réduite

2.6.4. Réactions d'hydrolyse

Les réactions d'hydrolyse du glutamate d'éthyle et de l'oléate d'éthyle (10 mM) ont été menées dans 10 mL d'un mélange eau : M_2B_2 (50:50 v/v), à 60°C, sous pression atmosphérique. Après solubilisation du substrat, les réactions ont été initiées par l'ajout de 10 g/L de l'enzyme utilisée.

Ces réactions d'hydrolyse ont été réalisées en présence de différentes lipases soit en réacteur Wheaton® (figure 40) soit dans les réacteurs d'une plateforme de synthèse en parallèle (Syncore Polyvap Büchi) (figure 42). Celle-ci comporte une unité de base chauffante (de 25 °C à 100 °C) et présente un système d'agitation planaire hélicoïdale modulable pouvant aller jusqu'à 600 rpm.

24 réactions peuvent être menées simultanément dans des réacteurs de 30 mL (Duran Schott). Ceux-ci sont surmontés d'un couvercle chauffant (de 25 °C à 70 °C) équipé de 24 prises de vide. Ce dispositif est complèté par une pompe à vide (Büchi Vac® V-500), un condensateur et un récipient de récupération des solvants.



Figure 42: Station de synthèse en parallèle: Syncore Reactor (Büchi)

2.7. Evaluation des activités antioxydantes

2.7.1. Inhibition du système xanthine / xanthine oxydase

Plusieurs voies métaboliques interviennent dans la formation du superoxyde $O_2^{\cdot -}$ par exemple le catabolisme des purines où les composés puriques fournissent de la xanthine réagissant avec la xanthine oxydase pour former l'anion superoxyde et de l'acide urique (figure 43).

La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique impliqué dans la maladie de la goutte. Durant cette oxydation, l'oxygène moléculaire agit comme accepteur d'électrons produisant des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène selon les réactions suivantes (George et al., 2003) :

$$\text{Xanthine} + 2O_2 + H_2O \longrightarrow \text{Acide urique} + 2O_2^{\cdot -} + 2H^+$$

$$\text{Xanthine} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{Acide urique} + H_2O_2$$

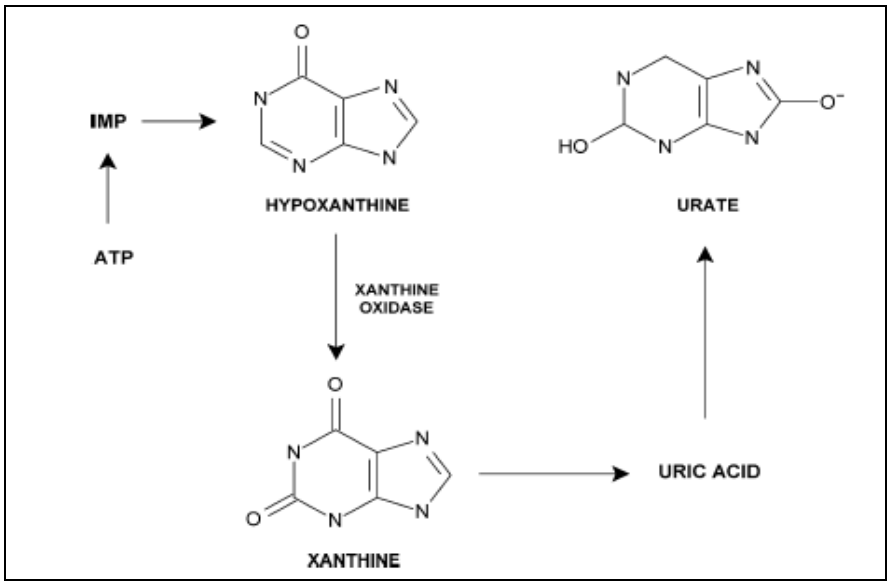


Figure 43: Cycle de production de l'acide urique par le système xanthine/xanthine oxydase

Par conséquent, le système xanthine/xanthine oxydase est considéré comme une source biologique importante de radicaux superoxydes.

L'oxydation de la xanthine, implique la production d'acide urique, molécule caractérisée par un maximum d'absorption à 290 nm (Yasuhiro et al., 2005; Da Silva et al.,

2004). Un inhibiteur de la xanthine oxydase dans le milieu réactionnel aura pour effet de diminuer la concentration en acide urique. La capacité de l'antioxydant à inhiber la xanthine oxydase est alors évaluée en mesurant la quantité d'acide urique formée. Cette mesure est assurée spectrophotométriquement (Mai, 2004 ; Cimanga et al., 1999).

L'étude de l'inhibition de la xanthine oxydase est effectuée selon la méthode décrite par Cos et al. (1998), légèrement modifiée. En effet, 400 µL de différentes concentrations des extraits à tester ont été mélangés avec une solution d'hydroxylamine (0,2 mM), xanthine (50 µM; pH 7,5), EDTA (0, 1 mM). La réaction est ensuite initiée par l'addition de l'enzyme xanthine oxydase (2,5 mU). Toutes les étapes doivent être effectuées dans la glace.

Ce milieu réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis la réaction est stoppée par ajout de HCl 0,58 M. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 290 nm contre un blanc qui contient tous les composants de l'essai à l'exception de la xanthine oxydase qui est remplacée par le tampon phosphate 0,2 mM, pH 7,5.

Le témoin positif de référence utilisé est l'Allopurinol, employé généralement pour le traitement de la maladie de la goutte. Ce médicament empêche l'accumulation de l'hypoxanthine et de la xanthine qui sont plus solubles et donc plus facilement excrétées que l'acide urique responsable de la maladie.

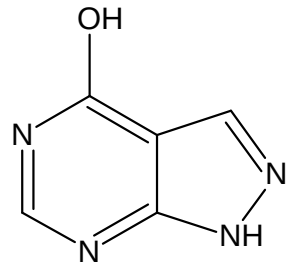


Figure 44: Structure de l'allopurinol

2.7.2. Inhibition de l'ion superoxyde

Afin d'évaluer le pouvoir piégeur des radicaux superoxyde de différentes substances testées déjà pour l'inhibition de la xanthine oxydase, un réactif de coloration composé de l'acide sulfanilique (300 µg/mL), de N-(1-naphthyle)-éthylenediamine dihydrochloride (5 µg/mL) et de l'acide acétique (16,7% v/v), a été ajouté après l'incubation. Le mélange de

réactif de coloration avec le milieu réactionnel donne une coloration rose plus ou moins intense, plus la couleur est intense plus il y a présence d'ions superoxydes. Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant 30 minutes, puis l'absorbance est lue à 550 nm (Oyanagui, 1984 ; Cos et al., 1998).

Enfin, l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase et l'activité antioxydante sont exprimées en pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante :

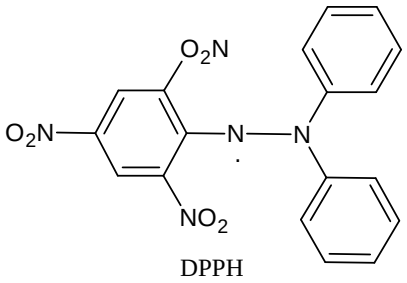
$$PI = (1 - DO_A / DO_B) \times 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition

DO $_A$: absorbance de la solution en présence de molécules testées

DO $_B$: absorbance de la solution en absence de molécules testées

2.7.3. Piégeage des radicaux DPPH$^{\bullet}$



DPPH

Figure 45: 1,1 diphényl-2-picryl hydrazil (DPPH)

Le potentiel antiradicalaire d'une substance peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tels que le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl appelé DPPH$^{\bullet}$ (figure 45).

En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH$^{\bullet}$ présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de la coloration violette.

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

(violet) (Incolore)

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par mesure colorimétrique à 517 nm. Elle rend, ainsi compte du pouvoir piégeur des composés étudiés *vis-à-vis* du DPPH$^{\bullet}$ (Lee et al., 2003).

Les substances à tester pour leur pouvoir antiradicalaire, sont solubilisées dans du méthanol à différentes concentrations. 50 µL de ces solutions sont mélangés avec 1950 µL d'une solution méthanolique de DPPH$^{\bullet}$ (6.10^{-5} M). Ce mélange est fortement agité pendant 30 secondes puis incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance du mélange réactionnel est ensuite mesurée à 517 nm contre un blanc constitué par du méthanol pur (Shimada et al., 1992). Le Trolox a été utilisé à titre comparatif (figure 46).

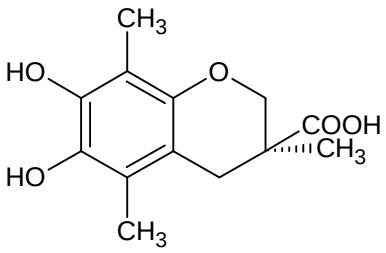


Figure 46: acide 6-hydroxyl-2,5,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, Trolox

Enfin, l'activité antiradicalaire des composés testés est évaluée par rapport à une solution méthanolique de radicaux DPPH$^{\bullet}$ qui représente le 100%.

Le pourcentage d'inhibition de formation des radicaux DPPH$^{\bullet}$ libres est calculé selon la formule suivante :

$$P1= (1-DO_{\text{Molécules à tester}} / DO_{100\%}) \times 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition
$DO_{\text{Molécules à tester}}$: absorbance de la solution des molécules à tester en présence du DPPH$^{\bullet}$.
$DO_{100\%}$: absorbance de la solution contenant uniquement la solution de DPPH$^{\bullet}$.

Les résultats sont exprimés en terme de CI50 (concentration de substrat qui inhibe 50% de radicaux DPPH$^{\bullet}$ présents dans le milieu réactionnel ou en terme de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). La valeur du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant

Capacity) correspond à la concentration molaire de trolox équivalent permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition qu'1 µM ou 1 g/L de produit et est déterminée à partir des courbes d'inhibition en fonction de la concentration.

2.7.4. Piégeage des radicaux ABTS$^{\bullet+}$

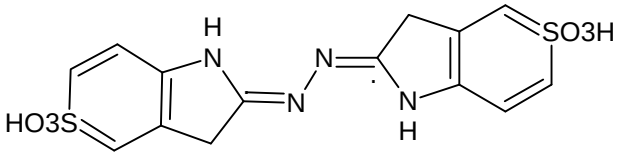


Figure 47: acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique) ABTS

Une deuxième méthode colorimétrique qui se base sur un essai de décoloration est rapportée afin de détecter le pouvoir antiradicalaire d'un composé donné. Le radical préformé 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS$^{\bullet+}$ est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium (Re et al., 1999). La formation de radical ABTS$^{\bullet+}$ se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un donneur de H$^{\bullet}$, le passage du radical ABTS$^{\bullet+}$ à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 734 nm. Cette décoloration résulte d'une réaction entre le radical ABTS$^{\bullet+}$ et un donneur de H$^{\bullet}$. Après 15 min d'incubation à 30°C, le résultat est donné par une mesure de la densité optique à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité anti-radicalaire des extraits, des flavonoïdes et des esters de flavonoïdes a été évaluée par le piégeage de radicaux ABTS$^{\bullet+}$ (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique). Le témoin positif de référence utilisé est le trolox (acide 6- hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E.

Une solution éthanolique ABTS$^{\bullet+}$ à 7 mM et des solutions éthanoliques de trolox à différentes concentrations entre 0,5 et 1,25 mM sont préparées. La solution d'ABTS$^{\bullet+}$ (7 mM) est diluée dans de l'éthanol afin d'obtenir une DO de 0,7±0,02 à 734 nm. A 1 mLde solution d'ABTS$^{\bullet+}$, 10 µL de solution de trolox sont ajoutés et après 15 min d'incubation à 30°C, on mesure la densité optique à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Re et al., 1999). Les substances à tester sont solubilisées dans de l'éthanol à différentes concentrations et analysées

de la même manière que le trolox. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{DO_{initiale} - DO_{finiale}}{DO_{finiale}} \times 100$$

DO $_{initiale}$ **:** DO de la solution de trolox préparée (0,7±0,02)

DO $_{finiale}$ **:** DO de la solution à tester en présence d'ABTS

Les résultats sont exprimés en terme de TEAC.

2.8. Etude de l'activité cytotoxique

2.8.1. Culture cellulaire

2.8.1.1. Lignée Caco2

Des cellules Caco2, lignée cancereuse humaine de colon au 30ème passage à une concentration initiale de 10^7 cellules/mL ont été données par l'**U**nité de **R**echerche **A**nimal et **F**onctionnalité des **P**roduits **A**nimaux (URAFPA, ENSAIA-INPL, NANCY). Les cellules ont été décongelées, et cultivées dans des fioles de Roux T75 (75 cm^2). Le milieu de culture employé est un milieu "Eagle" modifié par Dulbecco (DMEM) (Sigma) supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) source de facteurs de croissance indispensables (Eurobio), 2 mM glutamine, (Gibco, France) et 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France). Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, elles sont lavées avec du tampon phosphate PBS (9,6 g/L, pH 7,2) et détachées par trypsinisation (1 mL de solution de trypsine à 0,5 % /2,6 mM EDTA, Gibco, France) pendant 3 min dans un incubateur (37°C, 5% CO_2) (Sanyo, MCO-20AIC). L'action de la trypsine est stoppée par un ajout de milieu de culture contenant du serum de veau fœtal (10%); les cellules se retrouvent alors en solution. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 800 tours /min pendant 5 min et sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique (Zeiss, Allemagne). Ce comptage permet de déterminer le nombre de cellules afin d'effectuer le passage suivant. La suspension cellulaire sert à réensemencer d'autres flacons de culture à raison de 10^5 cellules/mL dans des fioles de 25 ou 75 cm^2 et servir pour les diverses expérimentations. Le nombre de passages ou repiquages des

cellules doit être comptabilisé, dans la mesure où il peut influencer le temps de multiplication des cellules et leurs capacités métaboliques : l'utilisation de cellules issues de nombreux repiquages successifs est évitée et est limitée à 60 dans le cas des cellules Caco2.

Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO_2. En vue d'assurer l'apport en nutriment aux cellules et d'éliminer les métabolites cellulaires susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire, un changement de milieu de culture est nécessaire toutes les 48 h. La croissance des cellules est mesurée quotidiennement à l'aide d'un microscope en phase inverse. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence où une concentration de $0,6 .10^5$ cellules/cm^2 au moins est atteinte. La suspention cellulaire est diluée afin d'ensemencer une microplaque à raison de 5.10^4 cellules/puits.

2.8.1.2. Lignée HUVEC

Les cellules HUVEC, cellules endothéliales humaines de veine ombilicale de cordons sains, proviennent de l'**E**uropean **C**ollection of **A**nimal **C**ell **C**ultures (ECACC, Salisbury, UK). Elles ont été décongelées à un passage P0 et ont été cultivées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO_2 dans des flacons de Roux T 25 (25 cm^2) contenant du milieu de croissance cellulaire endothéliale (ECGM, ECACC No. 06091509). Le milieu est préparé en ajoutant un supplément de croissance (15 mL) au milieu basal (milieu sans sérum ajouté, 485 mL). Les cellules HUVEC sont ensemencées à $1,5.10^5$ cellules/mL de milieu et elles sont cultivées pendant 3 jours ou jusqu'à la confluence. Un changement de milieu après 24h est effectué pour éliminer toute trace de DMSO (Fluka), puis régulièrement toutes les 24h jusqu'à 90% de confluence. Ensuite, le milieu est éliminé du flacon de culture par aspiration et les cellules sont lavées avec du PBS (pH=7,2) et décollées par trypsinisation (1 mL de trypsine 0,5%, 2,6 mM EDTA) à température ambiante. Après une minute, les cellules commencent à se décoller. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de 2 volumes de milieu DMEM à 20% de sérum de veau fœtal (SVF). Enfin, les cellules sont centrifugées à 800 rpm pendant 5 min et comptées sur une cellule de Thoma sous microscope optique. À confluence, la concentration cellulaire HUVEC est approximativement de 10^5 cellules/cm^2. Pour la réalisation des expériences, les cellules sont diluées avec du milieu ECGM (Milieu de Croissance Cellulaire Endothéliale) pour obtenir une concentration de $5. 10^4$ cellules/ mL pour être ensemencées sur microplaque.

Le nombre de passages est limité à 7 pour les cellules HUVEC et à 60 pour les Caco2 car il a été démontré que le nombre de passages peut influencer différentes activités et fonctions cellulaires (Lu et al., 1996 ; Briske-Anderson, 1997).

2.8.2. Conservation des cellules

2.8.2.1. Congélation

La congélation des cellules Caco2 et HUVEC dans l'azote liquide à -196°C, s'effectue sur une population cellulaire en phase exponentielle de croissance.

Toutes les étapes de la congélation sont effectuées dans la glace pour limiter l'effet cytotoxique du DMSO (diméthyl-sulfoxyde, Fluka). La suspension de cellules Caco2 ou HUVEC est centrifugée (5 min à 800 tours/min) et le culot est repris dans un volume de milieu de culture (DMEM pour les cellules Caco2 ou ECGM pour les cellules HUVEC) afin de congeler 7.10^6 cellules Caco2 et 5.10^5 cellules HUVEC par cryotube sachant que chaque cryotube contient 0,9 mL de milieu de culture, il est ajouté 0,1 mL de DMSO, agent cryoprotecteur goutte à goutte.

Une fois ces étapes réalisées, les cryotubes sont placés dans un récipient contenant de l'azote liquide (-196°C) et muni d'un ventilateur. Plusieurs paliers de ventilation sont réalisés pour congeler les cellules progressivement afin de limiter au maximum la mort cellulaire. Les cryotubes sont stockés par la suite dans une cuve d'azote liquide à -196°C.

2.8.2.2. Décongélation

Pour effectuer une culture cellulaire à partir d'un des cryotubes conservés dans l'azote liquide, on procède à sa décongélation rapide à 37°C dans un bain-marie pour éviter aux cellules un contact prolongé avec le DMSO fortement cytotoxique. La suspension décongelée est reprise dans 9 mL du milieu préchauffé, DMEM avec 10 % SVF pour les cellules Caco2 ou ECGM avec 10 % SVF pour les cellules HUVEC. Après centrifugation à 800 rpm pendant 5 minutes, le surnageant contenant le DMSO est éliminé et remplacé par du milieu de culture

frais. Après homogénéisation, les cellules sont remises en culture à 37°C. Le milieu de culture est périodiquement renouvelé jusqu'à la confluence des cellules.

2.8.3. Etude de l'activité antiproliférative

L'activité antiproliférative des molécules pures (flavonoïdes de *N. retusa*, flavonoïdes modèles et esters des flavonoïdes) a été évaluée vis-à-vis de la lignée cellulaire cancéreuse Caco2 et de la lignée normale HUVEC. Une gamme des concentrations entre 0 et 200 µM ont été testées. Les différentes concentrations ont été préparées dans du DMSO de façon à ne pas dépasser 1% de DMSO dans chaque puits

L'activité antiproliférative des extraits et des fractions obtenus à partir des feuilles de *N. retusa* a été évaluée vis-à-vis de cellules Caco2. Différentes concentrations entre 0 et 0,8 mg/mL de chaque extrait ou fraction ont été préparées dans du DMSO avec une concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne dépassant pas 1% (v/v) et diluées dans du milieu de culture.

2.8.3.1. Suivi de la croissance cellulaire à micro-échelle par le système cellscreen®

Le suivi de la croissance peut être determiné par des mesures effectuées en microplaques grâce au système Cellscreen® (Brinkmann M. et al, 2002). Le Cellscreen® est un système constitué d'un microscope couplé à un appareil photo qui permet de prendre des images des puits d'une microplaque positionnée sur un support motorisé. Les images sont analysées puits par puits par le processeur et traduites en représentation graphique (figure 48).

Dans le cas de culture de cellules adhérentes (Caco2 et HUVEC), c'est le pourcentage de recouvrement des cellules à la surface de chaque puits qui est déterminé. Dans le cas de cellules en suspension, le nombre total de cellules est déterminé.

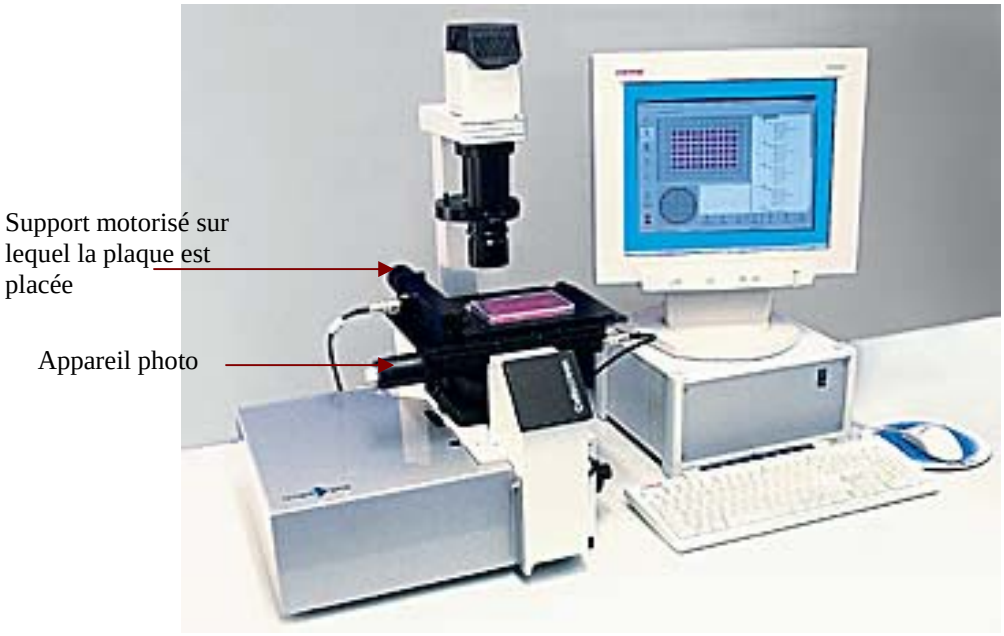


Figure 48: Système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire: Cellscreen® (Innovatis, Allemagne)

La croissance des tapis de cellules au fond des puits peut être mesurée par le système Cellscreen®. Ce système automatisé permet à partir d'un microscope et d'un appareil photo de prendre des photos de cellules et de déterminer par analyse d'images le pourcentage de recouvrement de la surface des puits.

Le suivi de la croissance par l'installation Cellscreen est basé sur la comparaison du pourcentage de recouvrement des puits « témoins » où les cellules sont placées dans un milieu dénué de la substance à tester et des puits où les cellules sont soumises à différentes concentrations de la molécule.

Le pourcentage de recouvrement en fonction du temps permet de réaliser des cinétiques de croissance cellulaire et d'évaluer l'effet potentiel de différentes molécules sur la croissance des cellules.

2.8.3.2. Test MTT

Un test de viabilité est appliqué permetant de déterminer le nombre de cellules vivantes en fin d'expérience. La quantité de cellules des puits « essais » soumis à la molécule est comparée aux puits « témoins» (sans molécule). Ainsi, il est possible de déterminer les effets des molécules sur la croissance (effet cytostatique) et sur la viabilité (effet cytotoxique)

et la concentration à laquelle la molécule est capable de diminuer de moitié le nombre de cellules vivantes (CI50).

La cytotoxicité des molécules étudiées vis-à-vis de cellules Caco-2 et de cellules HUVEC en culture est déterminée en utilisant le test MTT (3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl) -2,5 diphényl tétrazolium bromide qui permet d'évaluer l'activité mitochondriale des cellules (Chiba et al, 1998; Fotakis etTimbrell, 2006; Lobner, 2000). En effet, grâce à une enzyme la succinate déshydrogénase mitochondriale (Mosman, 1983), qui a la propriété de catalyser la réduction du succinate en fumarate dans le cycle de krebs, le sel de tétrazolium MTT de couleur jaune est réduit en cristaux bleus de formazan (figure 49). Cette réduction et par conséquent l'activité mitochondriale pourra être evaluée spectrophotométriquement à 540 nm.

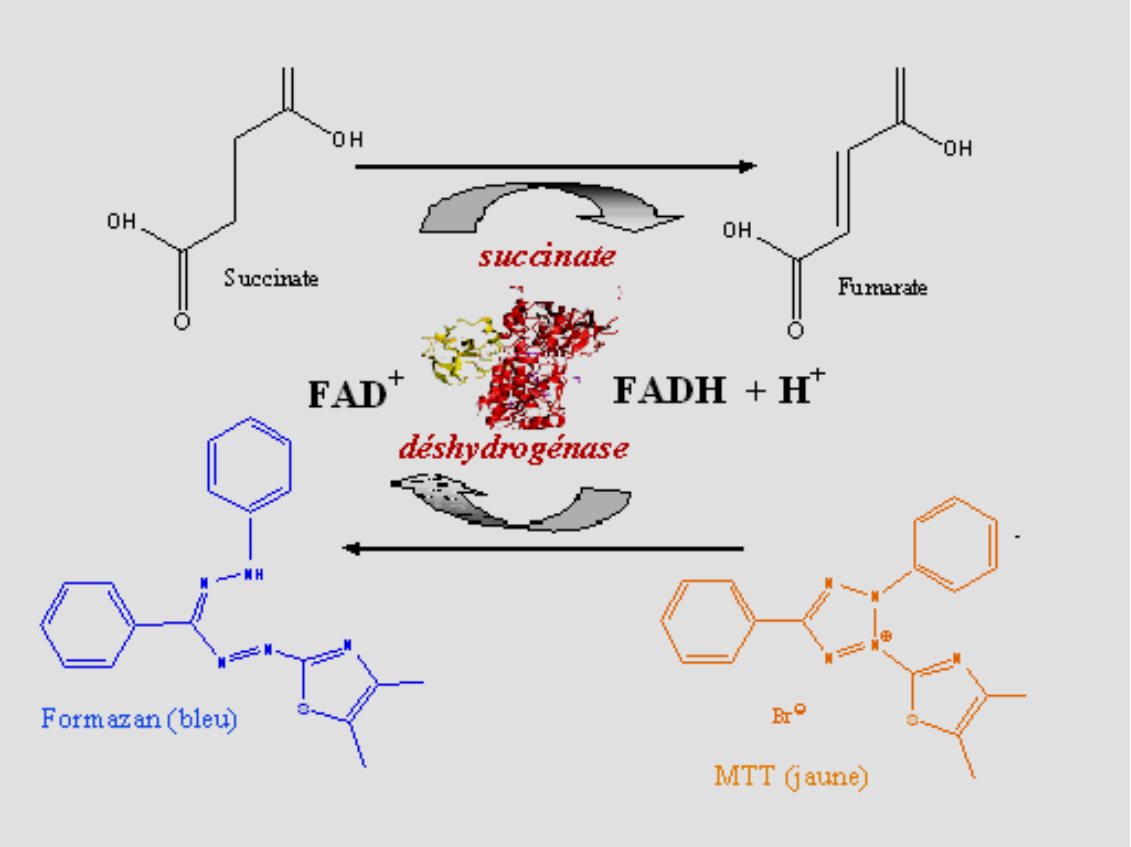


Figure 49: Réaction de transformation de MTT en formazan par la succinate déshydrogénase

En pratique, les cellules sont réparties sur une microplaque Nunc de 96 puits (8x12) à fond plat à raison de 5. 10^4 cellules dans 200 µL de milieu de culture/ puits. La microplaque est incubée à 37°C dans une atmosphère enrichie de 5% de CO_2 pendant 24h. Après 24h, un tapis

cellulaire adhérent est obtenu et les différentes concentrations de molécules sont ajoutées. La première colonne de la microplaque sert de référence (milieu sans cellules), la deuxième colonne sert de témoin (sans ajout de molécules testées) et la troisième colonne sert aussi de témoin pour tester l'influence du solvant utilisé pour la solubilisation des molécules (sans molécules testées). Les autres colonnes sont utilisées pour mesurer l'effet des différentes concentrations de molécules testées. Après 48h, les puits sont vidés, lavés au PBS, puis 200 µl de DMEM + 50 µL de MTT (à 2 g/L) sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 4h à 37°C et 5% de CO_2. Après incubation, les puits sont vidés, lavés au PBS et les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans 200 µL d'isopropanol. La plaque est agitée 15 min à l'air libre puis une lecture au Multiscan est réalisée (spectrophotomètre, Titertek, MCC/340) afin de mesurer l'absorbance, à 540 nm.

La mesure de l'activité mitochondriale des cellules après traitement par la dose choisie de molécules par rapport à l'activité mitochondriale des cellules non traitées, permet d'évaluer indirectement la cytotoxicité de ces molécules. Le pourcentage de mortalité est calculé d'après cette équation :

$$\% \text{ de mortalité cellulaire} = 1-(Abs_{Essai} / Abs_{Témoin}) \times 100$$

Avec $Abs_{Témoin}$ = absorbance de l'essai témoin non traité par les molécules

Abs_{Essai} = absorbance de l'essai traité par les molécules

CHAPITRE III. ETUDE PRELIMINAIRE : CARACTERISATION DES FLAVONOÏDES DE *N. RETUSA* ET MISE EN ŒUVRE DE LEUR ACYLATION

1. Etude chimique de *Nitraria retusa*

1.1. Introduction

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires présents dans les différentes parties de nombreuses plantes. Ces molécules présentent une structure de base commune incluant deux cycles aromatiques A et B (figure 50). Elles se répartissent en sous-classes en fonction du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) des cycles A et B et de la structure du motif reliant ces deux cycles. Dans la nature, les flavonoïdes se trouvent la plupart du temps sous forme de glycosides.

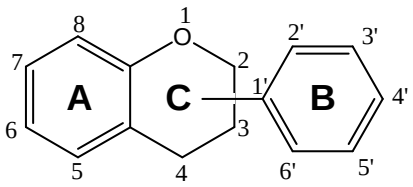


Figure 50: Structure de base des flavonoïdes

Nitraria retusa est une plante riche en flavonoïdes. Une étude effectuée en Egypte par Halim et al. (1995) a montré que les tiges et les feuilles de *Nitraria retusa* renferment au moins sept flavonoïdes: un flavonoïde aglycone, l'isorhamnétine et six flavonoïdes glycolysés, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, l'isorhamnétine-3-O-glucoside, l'isorhamnétine-3-O-galactoside, l'isorhamnétine-3-O-robinobioside, l'isorhamnétine-3-O-xylosyl-robinobioside et l'isorhamnétine-3-O-4^{Rhm} galactosyl-robinobioside.

Dans l'étude présentée ici, une première phase a consisté à identifier les flavonoïdes contenus dans les différents extraits préparés à partir des feuilles séchées de la plante *Nitraria retusa* cultivée dans la région de Monastir en Tunisie. Dans ce but, différentes méthodes d'analyse ont été développées:

- Une méthode de criblage préliminaire : méthode à la cyanidine
- La chromatographie sur couche mince avec différents modes de révélation
- La chromatographie liquide haute performance en phase inverse

- Le couplage de la chromatographie liquide haute performance et de la spectrométrie de masse

1.2. Etude chimique préliminaire

1.2.1. Préparation des extraits à partir de feuilles sèches de *N. retusa*

Différents extraits ont été préparés à partir des feuilles séchées réduites en poudre de *Nitraria retusa* selon la figure 51. Une extraction solide liquide a été effectuée grace à l'appareil de soxhlet en utilisant quatre solvants de polarité croissante afin d'épuiser la matière végétale progressivement. En fonction du solvant utilisé, quatre extraits ont été obtenus, à savoir: les extraits à l'hexane (EHex), au chloroforme ($ECHCl_3$), à l'acétate d'éthyle (EacOEt) et au méthanol (EMeOH). D'autre part, un extrait aqueux (Aq-ext) a été obtenu par décoction.

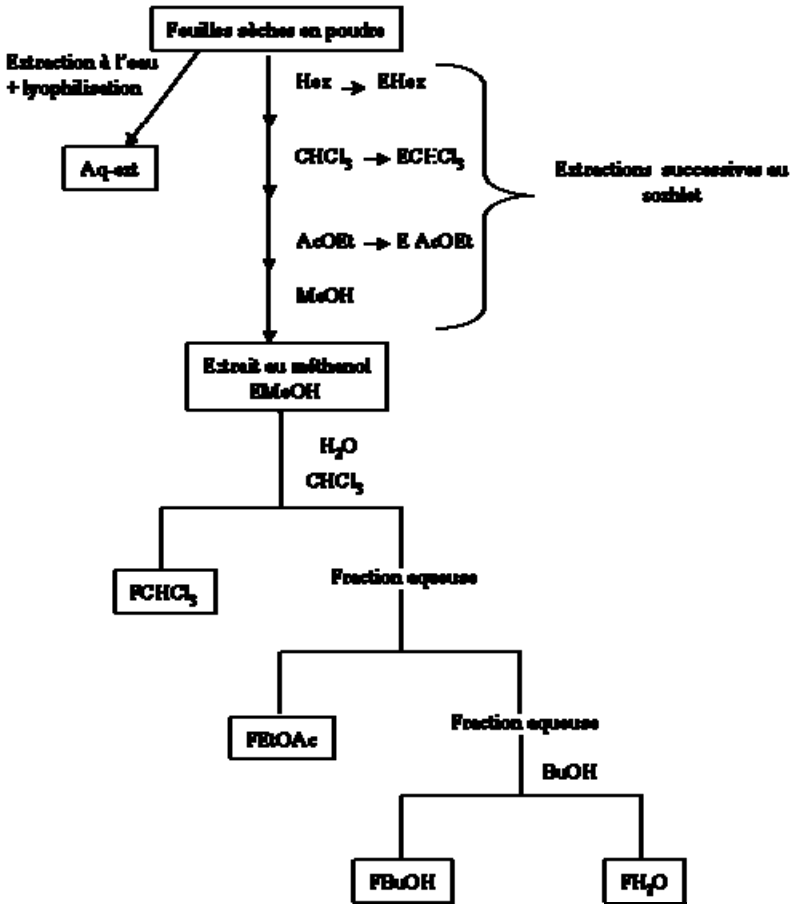


Figure 51: Préparation des extraits de N. retusa avec l'appareil de soxhlet et fractionnement de l'extrait au méthanol

Les rendements obtenus, exprimés par rapport à la masse de feuilles sèches mise au départ sont présentés dans le tableau 11

Tableau 11: rendements d'extraction des différents procédés appliqués aux feuilles sèches de *Nitraria retusa* : obtention des extraits EMeOH, EAcOEt, ECHCl3, EHex et Aq-Ext

Procédé d'extraction	Rendement d'extraction (%)
Extraction aqueuse (Aq-Ext)	18
Extraction à l'hexane (EHex)	3,5
Extraction au chloroforme ($ECHCl_3$)	2
Extraction à l'acétate d'éthyle (EAcOEt)	0,4
Extraction au méthanol (EMeOH)	19

Les résultats présentés dans le tableau 11 montrent que les extraits aqueux et au méthanol ont été obtenus avec des rendements similaires (18 et 19%). L'extraction à l'hexane, qui a pour but de délipider la matière végétale, a conduit à un rendement faible de 3,5%. Ce résultat rejoint ceux obtenus par d'autres auteurs. Ainsi, Saglam et al. (2007) ont préparé trois extraits, un à l'éthanol, un à l'hexane et un extrait aqueux à partir de feuilles et de fruits de *Vitex agnus-castus* et ont montré que l'extraction aqueuse de feuilles permettait d'atteindre un rendement de 38 % alors que l'extraction à l'hexane conduisait à un rendement limité de 3 %. D'autres études ont montré que l'extraction aqueuse de fruits de *Choerospondias axillaris* permettait l'obtention d'un rendement de 13,6 % (Wang et al., 2008). Anandharajan et al. (2006) ont effectué l'extraction progressive de poudres sèches d'*Aegles marmelos* et *Syzygium cumini* avec des solvants de polarité croissante hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol. Ces auteurs ont obtenu des rendements de l'ordre de 0,1 à 0,15 % pour les extractions à l'hexane et au dichlorométhane et de 2% pour les extractions au méthanol et à l'acétate d'ethyle. Dans notre cas, l'extraction à l'acétate d'éthyle a effectivement donné un

faible rendement (0.4%) par contre l'extraction au méthanol a été nettement meilleur que pour ces auteurs (19%). De même, Sokmen et al (2005) ont obtenu un rendement similaire de 16% pour l'extraction méthanolique, aprés délipidation à l'hexane de racines aériennes de *Geranium sanguineum L*. Plus récemment, Ozsoy et al. (2008) ont obtenu des rendements de 33,9% et 10% respectivement pour les extraction aqueuse et à l'acétate d'éthyle de la plante *Smilax excelsa.*

Ainsi, les rendements d'extraction varient en fonction du végétal étudié et de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notamment leur polarité. En effet, la solubilité des substances contenues dans la matière végétale dans un solvant donné dépend de ces propriétés. Il s'ensuit que les rendements d'extraction et la composition des extraits varient d'un solvant à l'autre et d'un végétal à l'autre.

1.2.2. Analyse des flavonoïdes présents dans les extraits de feuilles de *N.retusa*

1.2.2.1. Réaction à la cyanidine

La réaction à la cyanidine est une réaction de caractérisation préliminaire qualitative des flavonoïdes. La présence d'une coloration rouge après ajout de quelques gouttes d'HCl concentré et de tournures de magnésium révèle la présence de flavonoïdes dans l'extrait.

L'extrait au méthanol (EMeOH), l'extrait à l'acétate d'éthyle (EAcOEt) et l'extrait aqueux ont conduit à une réaction positive et par conséquent contiennent des flavonoïdes (tableau 12). Les extraits au chloroforme ($ECHCl_3$) et à l'hexane (EHex), quant à eux, donnent une réaction négative.

Tableau 12: Mise en évidence de la présence de flavonoïdes dans les différents extraits de *N. Retusa* par la méthode à la cyanidine

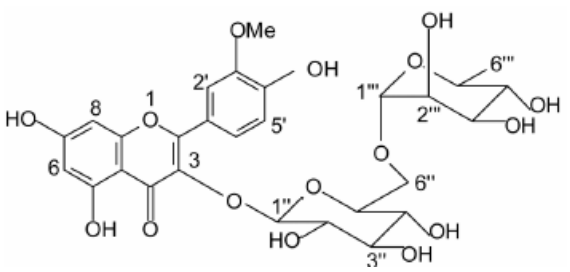
Extraits	Réaction à la cyanidine
Aq-Ext	+
EHex	-
$ECHCl_3$	-
EAcOEt	+
EMeOH	+

Les résultats de la réaction à la cyanidine ont montré que les extraits obtenus avec les solvants les plus polaires sont les plus riches en flavonoïdes. Ces observations ont été confirmées avec d'autres méthodes d'analyses qualitatives et quantitatives des flavonoïdes.

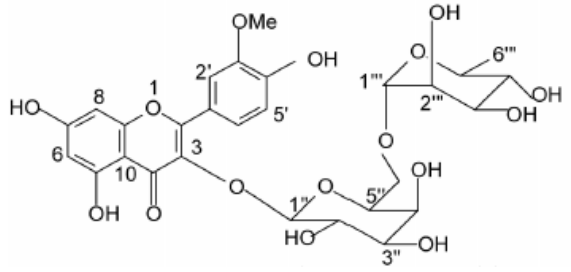
1.2.2.2. Analyse des extraits de N. retusa par chromatographie sur couche mince

Dans le présent travail il s'agit d'identifier et de purifier les flavonoïdes à partir d'extraits de feuilles de *N. Retusa*

Les différents extraits obtenus à partir de feuilles de *Nitraria retusa* ont été analysés par chromatographie sur couche mince afin d'identifier les flavonoïdes présents. Seuls trois flavonoïdes standards sont disponibles et ont été utilisés pour l'identification: l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Cependant, Halim et al., 1995 ont montré que *Nitraria retusa* contient un autre flavonoïde non disponible, l'isorhamnétine-3-O-robinobioside, qui est un isomére de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Ces deux composés seront donc difficilement séparables par méthode chromatographique.



Isorhamnétine-3-O-rutinoside



Isorhamnétine-3-O-robinobioside

Figure 52: Structures des deux isomères, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et l'isorhamnétine-3-O-robinobioside

Par ailleurs deux modes de révélation ont été appliqués: détection UV et révélation au réactif de NEU spécifique des flavonoïdes (figures 53 et 54).

Dans la suite de cette étude, le composé contenu dans les correspondant au Rf de l'isorhamnétine-rutinoside sera noté isorhamnétine-3-rutinoside/l'isorhamnétine-3-robinobioside (mélange de deux isomères). La precision de l'analyse n'étant pas suffisante pour distinguer les deux isomères.

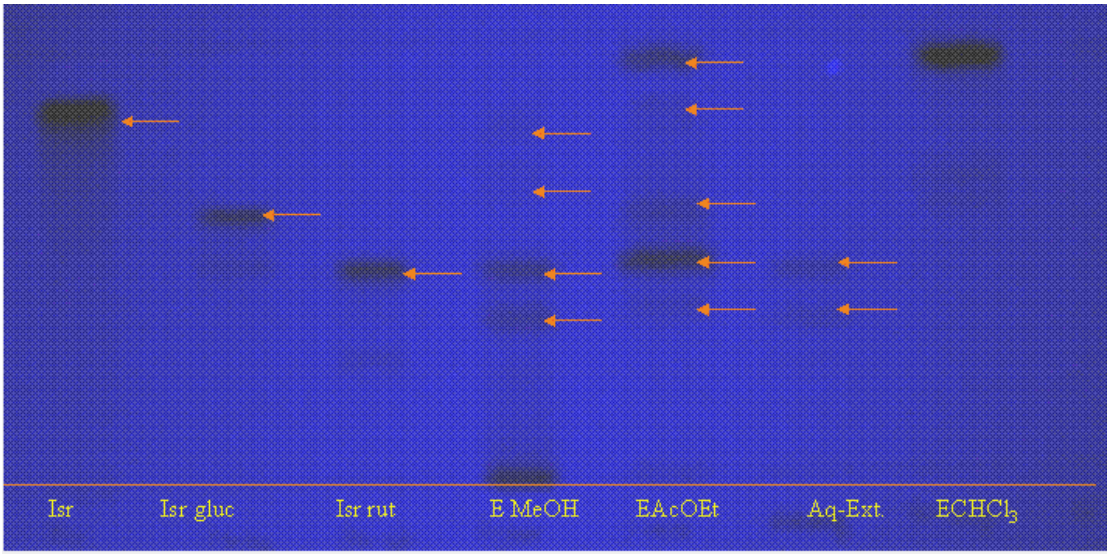


Figure 53: Chromatographie sur couche mince de silice des différents extraits issus de feuilles de Nitraria retusa développée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/25/10 v/v/v) et révélée sous UV à une longueur d'onde de 254 nm. Les standards utilisés sont l'isorhamnétine (Isr), l'isorhamnétine-3-O-glucoside (Isr gluc) et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (Isr rut).

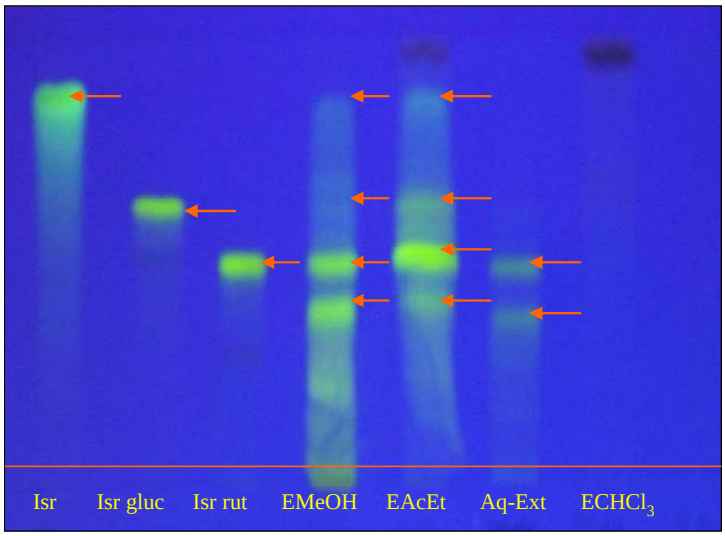


Figure 54: Chromatographie sur couche mince de silice des différents extraits issus de feuilles de Nitraria retusa développée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/25/10 v/v/v), révélée au réactif de NEU puis sous UV à une longueur d'onde de 254 nm. Les standards utilisés sont l'isorhamnétine (Isr), l'isorhamnétine-3-O-glucoside (Isr gluc) et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (Isr rut).

Les résultats obtenus confirment que ce sont les extraits EMeOH, EAcOEt et Aq-ext qui contiennent des flavonoïdes dont les Rf sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Rf des flavonoïdes présents dans les extraits de feuilles de *Nitraria retusa*

		Rf *
Flavonoïdes standards	Isorhamnétine	**0,88**
	Isorhamnétine-3-O-glucoside	**0,61**
	Isorhamnétine-3-O-rutinoside	**0,48**
Extraits	EMeOH	0,88 0,69 0,61 0,48 0,38
	EAcOEt	0,88 0,69 0,61 0,48 0,38
	Aq-Ext	0,48 0,38
	$ECHCl_3$	Les bandes observables sous UV disparaissent après révélation au réactif NEU

*Les Rf correspondant aux Rf des flavonoïdes standards utilisés sont soulignés.

Comme attendu, l'analyse par CCM montre que les extraits EMeOH et EAcOEt contiennent tous deux des flavonoïdes dont l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine-3-rutinoside/isorhamnétine-3-robinobioside mais dans des proportions différentes comme l'indique l'intensité variable des bandes. En effet la révélation au réactif de NEU montre que la bande correspondant à l'isorhamnétine-3-O-glucoside est de couleur peu intense dans le cas de l'extrait au méthanol ; elle est beaucoup plus intense dans le cas de l'extrait à l'acétate d'éthyle. Ces deux extraits et notamment celui obtenu avec l'acétate d'éthyle sont riches en isorhamnétine-3-O-rutinoside/ isorhamnétine-3-O-robinobioside. L'analyse de l'extrait au méthanol semble indiquer la présence d'un autre flavonoïde

présentant un Rf de 0,38 mais ce dernier n'a pas été identifié (absence de standard). La bande spécifique de l'isorhamnétine est faible dans les deux extraits.

En ce qui concerne l'Aq-Ext, celui-ci est moins riche en flavonoïdes que l' EMeOH et l'EAcOEt. Son analyse par CCM donne deux bandes majeures: l'une correspond à l'isorhamnétine-3-O-rutinoside/isorhamnétine-3-O-robinobioside et l'autre, présentant un Rf de 0,38 correspond à un flavonoïde non identifié.

L'ECHCl_3 est celui qui est le moins riche en flavonoïdes et présente deux bandes claires sous UV qui disparaissent après révélation au réactif de NEU. On en conclut que cet extrait ne contient pas de flavonoïdes. Par ailleurs, une autre bande située au front de migration de l'extrait au chloroforme est observée. Celle-ci prend une coloration rouge sous UV : il s'agit probablement de chlorophylle.

Ces flavonoïdes ont déjà été mis en évidence et purifiés à partir de différents végétaux. Par exemple, Lee et al (2005) ont montré la présence d'isorhamnétine-3-O-glucoside lors de la préparation d'extraits au méthanol de la plante *Salicornia herbacea*. Afin d'identifier le contenu en flavonoïdes des pommes, Schieber et al. (2002) ont réalisé une extraction à l'acétone de broyats de pommes. Après centrifugation de l'extrait obtenu le culot a été repris dans l'eau. La solution aqueuse ainsi obtenue a ensuite été extraite à l'acétate d'éthyle dans lequel la présence d'isorhamnétine-3-O-glucoside et d'autres flavonoïdes a pu être mise en évidence. Une autre étude a montré la présence de l'isorhamnétine-3-O-glucoside dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de la plante *Amyena scandens* (Gariboldi et al., 1998). Zhang et al. (2007) ont effectué une extraction au méthanol de feuilles de *Ginkgo biloba* afin de concentrer les flavonoïdes parmi lesquels ils ont pu identifier l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Rigano et al. (2007) ont identifié et purifié 11 flavonoïdes à partir de l'extrait au méthanol de la plante *Marrubium globosum* dont l'isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Ces deux flavonoïdes ont été également identifiés et purifiés à partir de l'extrait au méthanol de *Melilotus neapolitana* par Fiorentino et al. (2007).

La combinaison des résultats de rendement d'extraction obtenus avec les différents solvants et le contenu des extraits correspondants en flavonoïdes nous a conduits à choisir de travailler avec EMeOH et l'extrait aqueux pour la suite de l'étude. Bien que les premiers résultats obtenus par CCM montrent que l'EAcOEt est le plus riche en isorhamnétine et ses

dérivés glycosylés, le trop faible rendement d'extraction obtenu avec ce solvant (0,4 %) nous a dissuadés de l'utiliser pour la préparation ultérieure d'extraits de *Nitraria retusa.*

La suite du travail a pour objectif de concentrer les flavonoïdes contenus dans l'extrait aqueux et l'extrait au méthanol.

1.2.3. Extraction des flavonoïdes présents dans la fraction aqueuse

Afin de concentrer les flavonoïdes contenus dans l'extrait aqueux, une extraction au méthanol a été réalisée selon deux protocoles: une extraction au soxhlet et une macération directe sous reflux de méthanol.

L'extraction au soxhlet a permis de préparer l'extrait Sox MAE avec un rendement de 50 %. Par macération, le rendement d'extraction a été évalué à 40 % (obtention de l'extrait MMAE).

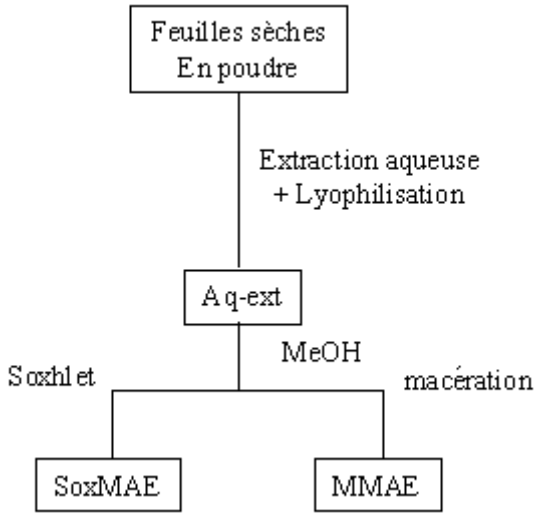


Figure 55: Préparation d'extraits au méthanol à partir de l'extrait aqueux

La différence de rendements d'extraction observée en utilisant le même solvant et la même matière végétale montre l'influence du procédé sur l'efficacité de l'extraction.

L'analyse par CCM des deux extraits a montré que ceux-ci contiennent les mêmes flavonoïdes que l'extrait aqueux dont ils dérivent (figure 56). Cependant, l'extrait obtenu par le procédé au soxhlet (SoxMAE) semble plus concentré en flavonoïdes que celui obtenu par macération (MMAE).

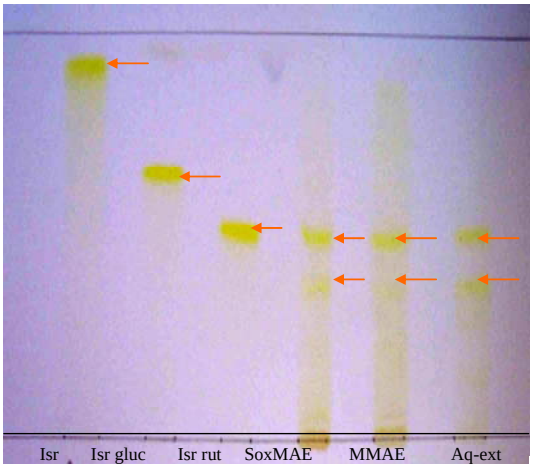


Figure 56: Chromatographie sur couche mince de silice de l'extrait aqueux et des extraits au méthanol, développée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100:25:10) et révélée sous UV à une longueur d'onde de 254 nm. Les standards utilisés sont l'isorhamnétine (Isr), l'isorhamnétine-3-O-glucoside (Isr gluc) et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (Isr rut).

L'efficacité de l'extraction au soxhlet est liée au fait que le solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage. Dans le cas de la macération, le solvant devant extraire la matière végétale peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé.

Les extraits obtenus ont été analysés par différentes méthodes chromatographiques et ceux qui se sont avérés riches en flavonoïdes ont été utilisés par la suite dans les tests d'activités biologiques et pour l'identification et la purification de flavonoïdes de *N. retusa*.

1.2.4. Fractionnement de l'extrait au méthanol (EMeOH)

D'après les premières analyses réalisées par CCM, l'extraction au méthanol en soxhlet de la poudre de feuilles sèches de *N. retusa* (EMeOH) s'est montrée efficace (extraction de 19 % de la masse sèche initiale). Par ailleurs l'extrait produit s'est révélé particulièrement riche en flavonoïdes. C'est pourquoi ce mode d'extraction (procédé présenté dans la figure 51) a été choisi pour la préparation d'extraits riches en flavonoïdes, destinés à être purifiés et caractérisés. Après solubilisation du résidu sec de EMeOH dans de l'eau, des extractions liquide/liquide successives ont été appliquées de manière à préparer 3 fractions : une fraction chloroforme ($FCHCl_3$), une fraction acétate d'éthyle (FEtOAc) et une fraction butanol

(FBuOH). Les rendements d'extraction obtenus lors de ces étapes de fractionnement sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Fractionnement de EMeOH par extractions liquide / liquide successives avec différents solvants.

Fraction	Rendement (en matière sèche, %)
$FCHCl_3$	3,5
FEtOAc	3,5
FBuOH	16,5

L'extraction de la solution aqueuse du résidu EMeOH a permis d'extraire 23,5 % (masse totale de 3 fractions) de la matière sèche. Le rendement d'extraction le plus élévé a été obtenu avec le butanol, Ce qui est en accord avec les résultats de Choi et al. (2007). En effet, ces auteurs ont fractionné l'extrait au méthanol de *Flos Lonicerae* après sa solubilisation dans l'eau et ont obtenu troix fractions, la fraction au dichlorométhane (13%), la fraction à l'acétate d'éthyle (6%) et la fraction au butanol (31%).

Les différentes fractions obtenues à partir de EMeOH ont été analysées par CCM. Les résultats sont présentés sur la figure 57.

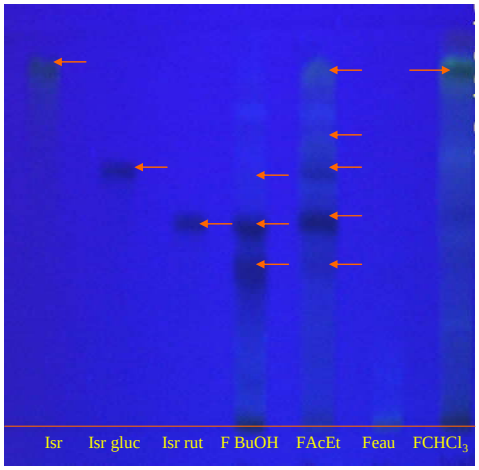


Figure 57: Chromatographies sur couche mince de silice des fractions obtenues à partir d'EMeOH, développée avec le mélange acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/25/10 v/v/v) et révélée sous UV à 254 nm. Les standards utilisés sont l'isorhamnétine (Isr), l'isorhamnétine-3-O-glucoside (Isr gluc) et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (Isr rut).

Cette analyse des différentes fractions par chromatographie sur couche mince de silice a montré que la fraction butanol présente trois flavonoïdes majoritaires. Les rapports frontaux montrent que l'un correspond à l'isorhamnétine-3-O-rutinoside/isorhamnétine-3-O-

robinobioside (Rf= 0,48) ; l'autre présentant un Rf de 0,38 n'a pu être identifié. La fraction acétate d'éthyle contient, quant à elle, plusieurs flavonoïdes: d'une part l'isorhamnétine-3-O-rutinoside/isorhamnétine-3-O-robinobioside, isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine et d'autre part d'autres flavonoïdes, à ce stade non identifiés. La fraction chloroforme est particulièrement riche en isorhamnétine, tandis que la fraction aqueuse restante ne semble plus contenir de flavonoïdes.

L'analyse CL-SM^n des fractions a été réalisée afin de confirmer les résultats obtenus par CCM, l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside l'isorhamnétine-3-O-glucoside ont été utilisés comme standards afin de chercher leur présence dans les différentes fractions. Une analyse des flavonoïdes standards a montré que l'isorhamnétine, très faiblement retenue par la colonne a un temps de rétention de 4 mn. Ensuite, l'isorhamnétine 3-glucoside est éluée à 18 mn et enfin le pic correspondant à l'isorhamnétine 3-rutinoside apparaît entre 27 et 28 mn.

Les différents chromatogrammes et spectres obtenus pour les fractions sont représentés dans les figures 58 et 59.

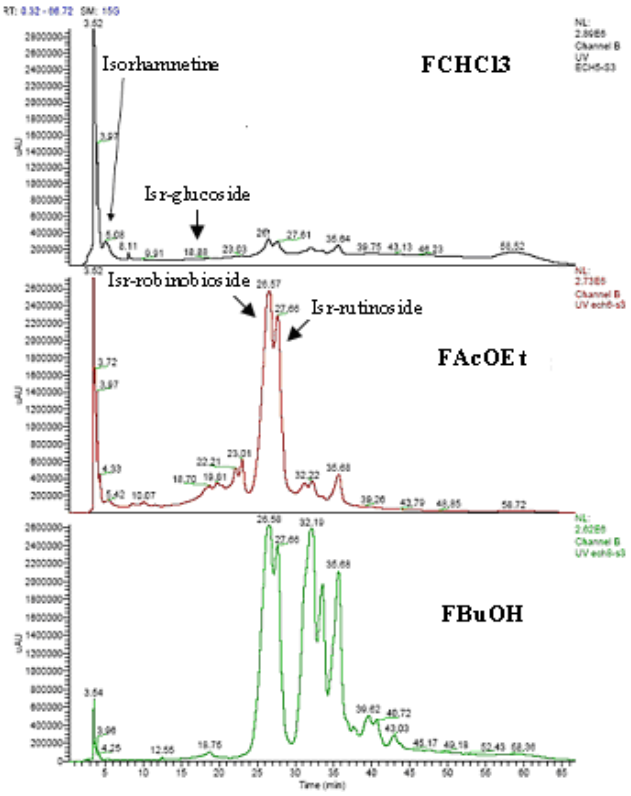


Figure 58: Chromatogramme des fractions au chloroforme (FCHCl3), à l'acétate d'éthyle (FAcOEt) et au butanol (FBuOH).

Sur la figure 58, l'analyse des fractions $FCHCl_3$, FAcOEt et FBuOH montre que:

- La fraction $FCHCl_3$ contient d'isorhamnétine, des traces d'isorhamnétine-3-O-rutinoside/isorhamnétine-3-O-robinobioside et ne contient pas d'isorhamnétine-3-O-glucoside.

- La fraction FAcOEt montre un double pic entre 26 et 28 min. Les masses détectées correspondent à celles de l'isorhamnétine-3-O-robinobiside et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside montrant qu'il s'agit de l'élution de deux isomères. Par comparaison avec le temps de rétention de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, il apparaît que l'isorhamnétine-3-O-robinobiside est éluée juste avant l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Cette fraction est donc riche en ces deux flavonoïdes. Elle contient une faible quantité l'isorhamnétine-3-O-glucoside et quasiment pas d'isorhamnétine.

La fraction FBuOH contient l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et l'isorhamnétine-3-O-robinobioside ainsi que 3 isomères d'une autre molécule élués sous forme d'un triple pic entre 32 et 35 mn. Cette molécule, de masse 756 g/mol, ne contient ni résidu glucose ni rhamnose.

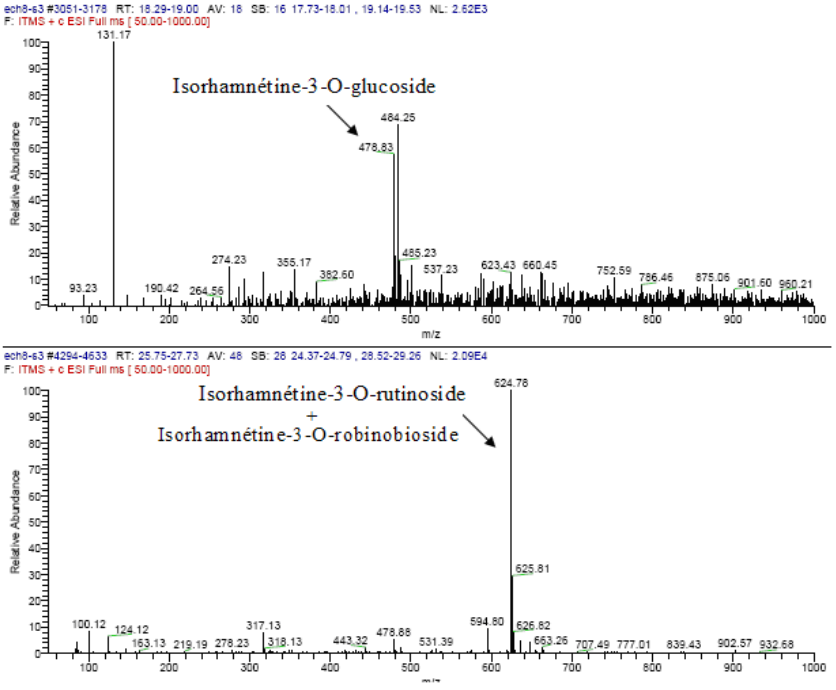


Figure 59: Spectre de masse des pics 18 mn (l'isorhamnétine-3-O-glucoside) et 26-28 min (l'isorhamnétine-3-O-rutinoside/ isorhamnétine-3-O-rutinoside) du chromatogramme de FBuOH.

Les spectres de masse présentés (figure 59) montrent bien que pour la fraction FBuOH, le pic à 18 mn correspond bien à l'isorhamnétine-3-O-glucoside, M+H=478 g/mol.

De plus il montre la pureté du double pic 26-28 min en une seule masse, M+H=625 g/mol et donc la présence d'isomères isorhamnétine-3-O-rutinoside/ isorhamnétine-3-O-robinobioside.

On a remarqué que l'isorhamnétine est présente essentiellement dans la fraction $FCHCl_3$ (CCM de la figure 57). Cette constatation a été confirmée par comparaison des aires de ce pic pour les différentes fractions : la fraction $FCHCl_3$ présente une forte teneur en isrhamnétine comparée à FAcOEtqui en contient un peu et FBuOH qui n'en contient pas.

Ces résultats seront utiles dans la suite afin d'expliquer les différences dans les activités biologiques de différentes fractions.

2. Synthèse enzymatique d'esters d'isoquercitrine et d'acides aminés/Etude préliminaire

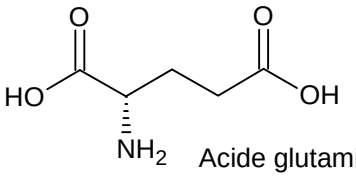
2.1. Introduction

Cette étude préliminaire avait pour objectif de vérifier la faisabilité de l'acylation d'un flavonoïde par un acide aminé pour ensuite tenter le greffage de petits peptides en vue de produire des molécules bifonctionnelles qui présenteraient potentiellement les propriétés du flavonoïde d'une part et celles du peptide choisi d'autre part. A notre connaissance, l'acylation des flavonoïdes avec des acides aminés n'a pas été étudiée auparavant. Cependant Villeneuve (2007) indique que la lipophilisation de l'acide aspartique, un deuxième acide aminée dicarboxilique peut avoir lieu en utilisant des alcools ou des amines gras.

Pour démarrer cette étude, le flavonoïde isoquercitrine a été choisi pour réaliser les premiers essais d'acylation. En effet, l'isoquercitrine est un flavonoïde glycosylé possédant un groupement hydroxyle primaire ce qui fait de lui un bon substrat pour les lipases et notamment la CALB. De plus ce flavonoïde est un analogue structural d'un flavonoïde moins disponible, présent dans les feuilles de *N. retusa*, l'isorhamnetine-3-O-glucoside, qui présente un groupement méthoxyle à la place de groupe OH du l'isoquercitrine à la position C3'.

L'acide glutamique a été choisi pour acyler l'isoquercitrine afin de déterminer les conditions de la réaction.

L'acide glutamique est l'un des 20 acides aminés naturels constituant les protéines. Sa chaîne latérale contient un résidu carboxyle, ce qui en fait un acide aminé "acide" dicarboxylique, polaire (figure 60). Cette structure permet d'envisager qu'il puisse jouer le rôle de donneur d'acyle dans des réactions d'acylation de flavonoïdes.



Acide glutamique

Figure 60: Structure chimique de l'acide glutamique

2.2. Choix du solvant pour la synthèse d'esters d'isoquercitrine et d'acide glutamique

Dans un procédé de biocatalyse, le choix du solvant est primordial dans la mesure où celui-ci joue un rôle sur la disponibilité des substrats, sur l'activité de l'enzyme et parfois aussi sur l'équilibre thermodynamique de la réaction. Des solvants organiques tels que le méthyl-2 butanol-2, l'acétone, l'acétonitrile, sont généralement utilisés dans les réactions d'estérification catalysées par des lipases (Ardhaoui et al., 2004 ; Chebil et al., 2007 ; Chebil et al., 2006; Kontogianni et al., 2001; Gao et al., 2001; Passicos et al., 2004 ; Nakajima et al., 1999). Parmi eux le méthyl-2-butanol-2 est un solvant de choix car il est inerte vis-à-vis de ces enzymes et ne peut intervenir en tant que substrat dans la réaction (alcool tertiaire). En outre, il présente la capacité de solubiliser aussi bien des composés plutôt hydrophiles comme des sucres que des composés hydrophobes comme des acides gras à longue chaîne. L'acétone et l'acétonitrile sont d'autres solvants potentiels pour l'acylation de flavonoïdes, catalysée par des lipases (Chebil et al., 2006 ; Chebil et al., 2007 ; Passicos et al.,2004).

Dans un premier temps, une réaction d'acylation de l'isoquercitrine (10 mM) a été mise en œuvre dans le méthyl-2-butanol-2, en présence de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435®, 20 g/L) et d'un excès de donneur d'acyle, acide glutamique ou glutamate d'éthyle (50 mM). En guise de témoin, une réaction en l'absence d'enzyme a été conduite en parallèle. La réaction a été mise en œuvre en réacteur Wheaton® à 55 °C, sous une agitation de 250 rpm.

Le suivi de la réaction a été effectué en analysant des échantillons prélevés directement dans le milieu réactionnel au cours du temps. Une première étape analytique qualitative a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) et a montré qu'aucun produit nouveau n'est formé, quel que soit le donneur d'acyle. De même, aucune synthèse n'a été mise en évidence ni dans l'acétone ni dans l'acétonitrile.

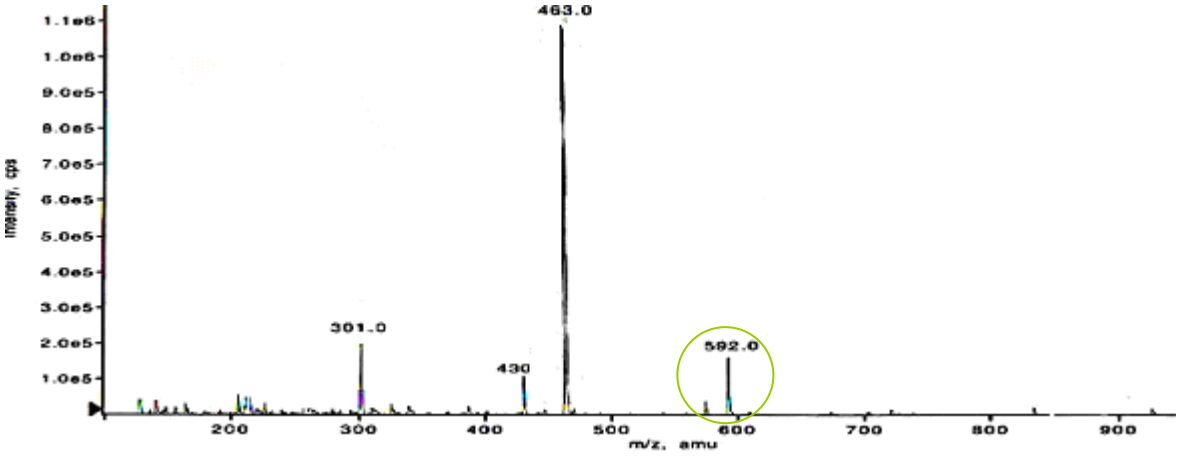
La très faible solubilité des deux donneurs d'acyle utilisés et en particulier celle de l'acide glutamique dans le méthyl-2-butanol-2 pourrait expliquer ces résultats. Pour vérifier cette hypothèse, d'autres milieux de synthèse ont été utilisés, constitués de méthyl-2-butanol-2 et de pyridine. La pyridine est couramment utilisée dans les procédés de synthèse chimique ou enzymatique. Elle présente l'avantage de solubiliser les composés très polaires tout en évitant la présence d'eau. Dans la littérature, en effet, l'ajout de pyridine dans les milieux de synthèse de dérivés acylés de flavonoïdes polaires s'est révélée efficace (Nakajima et al. 1999 ; Danieli et al., 1997). Les expériences ont été réalisées avec le glutamate d'éthyle celui-ci étant plus soluble que l'acide glutamique.

Différents pourcentages de pyridine on été ajoutés au méthyl-2-butanol-2 : 10, 20, 50%. Une réaction a également été menée dans la pyridine seule. La solubilité du glutamate d'éthyle paraît meilleure pour des quantités croissantes de pyridine.

Malgré cela, l'analyse des milieux de synthèse par CCM et CLHP révèle qu'aucun produit ne se forme quelles que soient les proportions relatives de pyridine et de méthyl-2-butanol-2.

Dans le cas de la synthèse mise en œuvre dans la pyridine seule, l'analyse par spectrométrie de masse du milieu indique la présence d'un composé de masse $M+H^+= 592$, pouvant correspondre au glutamate d'isoquercitrine. Cependant ce produit est déjà présent avant l'ajout de l'enzyme dans le milieu ; il est également détecté dans le milieu de synthèse témoin ne comportant pas d'enzyme (figure 61).

(a)



(b)

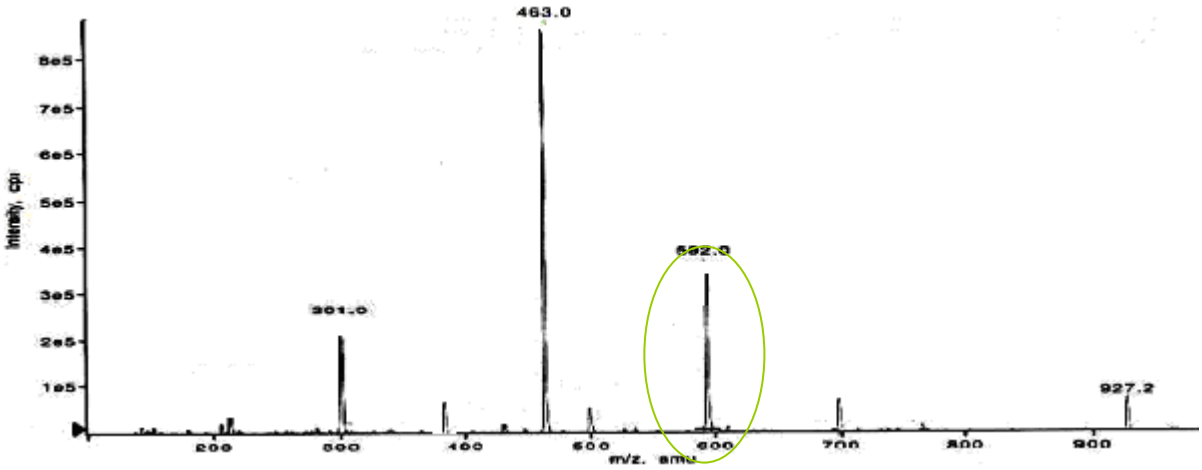


Figure 61: Spectre de masse d'un milieu de synthèse du glutamate d'isoquercitrine, dans la pyridine, en présence de la lipase B de Candida antarctica, à t=0 (a) et t=48h (b). Analyse en en mode négatif électrospray, par infusion directe de l'échantillon dilué dans un mélange eau/méthanol (50/50 v/v). M-H=301 (quercétine), M-H=463 (isoquercitrine), M-H=592 (glutamate d'isoquercitrine).

Ces résultats indiquent que la synthèse du glutamate d'isoquercitrine a lieu en milieu pyridine, même en l'absence d'enzyme. Ceci pourrait s'expliquer par une réaction d'acylation chimique favorisée par la présence de quantités importantes de pyridine. Celle-ci est en effet décrite dans la littérature comme étant un bon catalyseur basique pour les réactions d'acylation chimiques (Eissa et al., 2008; Waghmare et al., 2008 ; Ema et al., 2008 ; Wei et al., 2006; Chen et al., 2006 ; Yamada et al., 2006; Spivey et Arseniyadis, 2004).

La composition du milieu de synthèse évolue peu avec le temps ce qui révèle une cinétique réactionnelle très lente.

D'autres conditions réactionnelles, décrites dans la littérature comme étant susceptibles d'améliorer le rendement des réactions d'acylation des flavonoïdes ont été testées comme l'augmentation de la température jusqu'à 80°C et la réduction de la pression jusqu'à 300 mbar. Cependant, l'analyse des milieux de synthèse par CCM et CLHP révèle qu'aucun produit ne se forme. Ces résultats suggèrent l'incapacité de la CALB à catalyser l'acylation de l'isoquercitrine par le glutamate d'éthyle. Pour vérifier cette hypothèse de nouvelles synthèses ont été mises en œuvre en présence d'autres lipases.

2.3. *Effet de l'origine de la lipase sur la synthèse d'esters d'isoquercitrine et d'acide glutamique*

L'absence d'acylation enzymatique de l'isoquercitrine par le glutamate d'éthyle en présence de la lipase B de *Candida antarctica* dans toutes les conditions réactionnelles testées, nous a amenés à orienter l'étude sur l'utilisation d'un autre biocatalyseur, la lipase de *Pseudomonas cepacia*. En effet, dans la littérature, de nombreuses études relatent l'acylation de flavonoïdes par divers donneurs d'acyles, catalysée par différentes lipases (Chebil et al., 2007; Chebil et al., 2006). Par ailleurs, les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* sont largement décrites comme étant particulièrement efficaces pour catalyser l'acylation d'une grande diversité de substrats hydroxylés ou aminés par des donneurs d'acyle de structures extrêmement variées. En revanche, à notre connaissance, aucun travail n'a été publié concernant l'estérification enzymatique de l'acide glutamique, catalysée par une lipase.

De même que pour la lipase B de *Candida antarctica*, la réaction menée en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia*, dans les mêmes conditions, ne permet pas de synthétiser le glutamate d'isoquercitrine.

Ceci amène à la question suivante: l'acide glutamique peut-il être estérifié, par voie enzymatique, en présence d'une lipase ? Ou plus exactement, l'acide glutamique constitue-t'il un bon substrat pour ce type d'enzyme ?

Pour tenter d'y répondre, deux réactions supplémentaires ont été mises en œuvre : l'estérification de l'acide glutamique par un alcool primaire à courte chaîne, linéaire (*n*-butanol) et l'hydrolyse du glutamate d'éthyle.

2.4. *Etude de l'affinité de quelques lipases pour l'acide glutamique et son ester éthylique*

2.4.1. Estérification enzymatique du glutamate d'éthyle par le n-butanol

Une réaction d'acylation du *n*-butanol par le glutamate d'éthyle, en présence de Novozym 435® a été mise en œuvre en milieu méthyl-2-butanol-2 / pyridine (80/20) afin de vérifier la capacité du glutamate d'éthyle à être donneur de groupement acyle dans des réactions d'acylation enzymatique, catalysées par des lipases.

L'analyse du milieu réactionnel par CCM montre qu'aucun produit ne se forme même en utilisant un alcool simple comme accepteur de groupement acyle.

Ces résultats montrent donc que le glutamate d'éthyle n'est pas un bon substrat pour cette lipase ou qu'il est peut-être même inhibiteur de l'enzyme.

2.4.2. Hydrolyse du glutamate d'éthyle en présence de différentes enzymes

Pour compléter cette étude de l'affinité de différentes lipases couramment utilisées en biocatalyse pour l'acide glutamique et ses dérivés, l'hydrolyse (réaction inverse de l'acylation) du glutamate d'éthyle a été étudiée. L'hydrolyse de liaisons ester est la réaction naturellement catalysée par les lipases ou plus généralement par les hydrolases. Celle-ci sert souvent de référence pour mesurer l'activité d'une enzyme vis-à-vis de substrats spécifiques et par suite pour définir son spectre d'affinité. Par ailleurs elle se déroule en milieu aqueux ou organoaqueux, conduisant à la solubilisation totale du glutamate d'éthyle et permettant ainsi de s'affranchir des problèmes de solubilité rencontrés en milieu organique.

Plusieurs enzymes immobilisées ou non ont été testées, à une concentration de 10 g/l, pour catalyser cette réaction d'hydrolyse du glutamate d'éthyle (100 mM) dans un mélange eau/M_2B_2 (50/50) : la lipase B de *Candida antarctica*, la lipase de *Pseudomonas cepacia*, la

lipase de *Rhizomucor miehei*, l'estérase de foie de porc et l'acylase I d'*Aspergillus melleus*. Les réactions ont été réalisées à 60 °C, sous pression atmosphérique (figure 62).

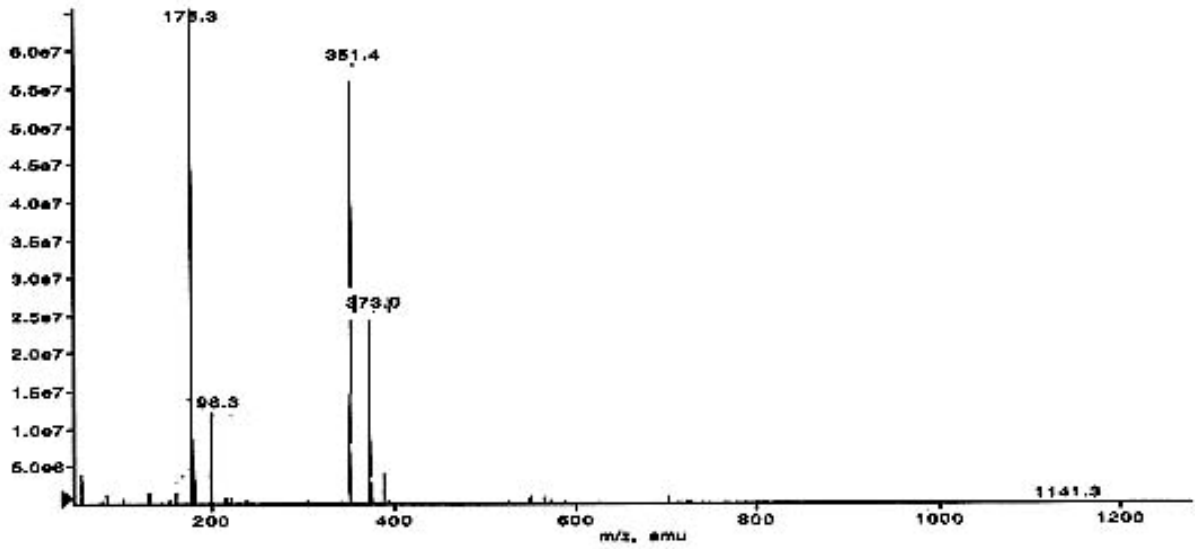


Figure 62: Spectres de masse du milieu d'hydrolyse du glutamate d'éthyle après 24h de réaction, en présence de différentes enzymes. Analyse effectuée en mode positif électrospray, par infusion directe de l'échantillon dilué dans un mélange eau/méthanol (50/50 v/v).
176 g.mol-1 : M + H+ (glutamate d'éthyle), 198 g.mol-1 : M + Na+(glutamate d'éthyle), 351 g.mol-1 : 2M+H+ (glutamate d'éthyle), 373 g.mol-1 : 2M+Na+ (glutamate d'éthyle)

Après 24 h de réaction, le spectre de masse des différents milieux réactionnels montre l'absence d'acide glutamique (146 gmol-1), et la présence unique d'un pic correspondant au glutamate d'éthyle. Aucune des enzymes testées n'a donc pu catalyser l'hydrolyse du glutamate d'éthyle.

Ces résultats pourraient expliquer l'absence de réaction d'acylation de l'isoquercitrine en présence de glutamate d'éthyle ou d'acide glutamique comme donneur d'acyle.

Deux hypothèses se présentent : la première est l'absence d'affinité des enzymes testées pour le glutamate ou l'acide glutamique, la deuxième est que ces donneurs d'acyle inhibent les enzymes. Pour vérifier cette dernière hypothèse, des essais d'hydrolyse du glutamate d'éthyle seul et de glutamate d'éthyle en présence de l'oléate d'éthyle, déjà prouvé être un bon substrat pour les lipases, ont été réalisés.

2.4.3. Etude de l'inhibition de la lipase B de *Candida antarctica* par le glutamate d'éthyle

Pour vérifier si le glutamate d'éthyle peut inhiber la lipase B de *Candida antarctica*, une réaction d'hydrolyse de l'oléate d'éthyle (100 mM), catalysée par Novozym 435® a été réalisée dans un milieu eau/ M_2B_2 (50 / 50 v/v), à 60°C, sous pression atmosphérique, en présence de différentes concentrations de glutamate d'éthyle : un équivalent molaire d'oléate d'éthyle (100 mM) ou deux équivalents molaires (200 mM) et (10 g/l). Les résultats sont présentés dansla figure 63.

a b

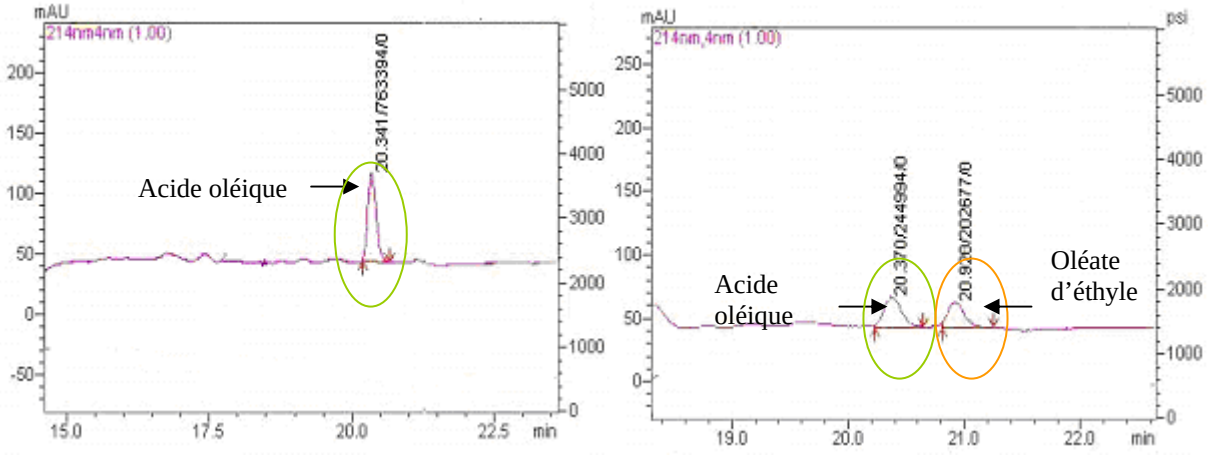


Figure 63: Analyse CLHP (détection UV à 214 nm) après 16 h de réaction d'un milieu d'hydrolyse de l'oléate d'éthyle en présence de glutamate d'éthyle (1x) (a) et d'un milieu d'hydrolyse de l'oléate d'éthyle en présence de glutamate d'éthyle (2x) (b).

L'analyse CLHP des milieux d'hydrolyse après 16 heures de réaction indique l'hydrolyse totale de l'oléate d'éthyle en présence d'un équivalent molaire de glutamate d'éthyle. En revanche, en présence d'un excès de ce dernier, l'hydrolyse de l'oléate d'éthyle n'est que partielle, En effet le chromatogramme obtenu en UV présente deux pics qui correspondent à l'acide oléique et l'oléate d'éthyle, suggérant une baisse significative de l'activité catalytique.

3. Conclusion

Dans ce premier chapitre la préparation d'extraits de feuilles de *Nitraria retusa* par différentes méthodes a été abordée. Une première extraction de la poudre sèche de feuilles de *N. retusa* à l'aide de l'appareil de soxhlet en utilisant des solvants de polarité croissante a abouti à quatre extraits : un extrait à l'hexane, un extrait au chloroforme, un extrait à l'acétate d'éthyle et un extrait au méthanol. Des rendements variables ont été obtenus en fonction des solvants.

Les molécules d'intêret dans ce travail sont les flavonoïdes. c'est pourquoi une analyse qualitative par CCM a été réalisée dans un premier temps pour mettre en évidence la présence de ces métabolites dans les différents extraits. Les résultats obtenus ont montré que ce sont les extraits les plus polaires qui sont les plus riches en flavonoïdes. Les solvants apolaires ont permis d'éliminer des substances comme la chlorophylle qui est extraite par le chloroforme et des substances plus hydrophobes qui sont extraites par l'hexane. En analysant qualitativement l'intensité des bandes, il apparaît que c'est l'extrait à l'acétate d'éthyle qui présente le contenu le plus élévé en flavonoïdes, suivi de l'extrait au méthanol et l'extrait aqueux. Cependant, son faible rendement nous a amenés à prévilégier les extraits au méthanol et aqueux (rendement de l'ordre de 20 %) pour la suite de ce travail. Ces deux extraits ont été fractionnés afin de concentrer davantage leur contenu en flavonoïdes en vue d'une purification.

Ces premiers résultats ont été complétés dans la suite du travail par des dosages de flavonoïdes totaux et de polyphénols (analyses CLHP et CLSM) dans les différents extraits et fractions. Les résultats obtenus sont détaillés dans la troisième partie de cette étude.

Dans la seconde partie de ce chapitre, il a été montré que la réaction d'acylation de l'isoquercitrine avec un acide aminé, le glutamate d'éthyle, n'a pu être catalysée par les deux lipases les plus classiquement utilisées pour l'acylation de flavonoïdes, la CALB et la PCL. Cette absence de synthèse ne peut s'expliquer uniquement par la faible solubilité du donneur d'acyle dans les milieux réactionnels. La réaction réverse de la synthèse, c'est-à-dire l'hydrolyse du glutamate d'éthyle en milieu aqueux n'a pu être réalisée, quelle que soit l'enzyme utilisée. De plus il a été montré que ce substrat peut inhiber l'activité catalytique de

la CALB. En effet, un excès de celui-ci a induit une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme se traduisant par une hydrolyse limitée de l'oléate d'éthyle.

L'objectif principal de notre étude étant d'évaluer l'impact de l'acylation de flavonoïdes sur leurs activités, le travail a été poursuivi avec d'autres donneurs d'acyle de type ester éthylique d'acides gras de longueur de chaîne variable. En effet, ces composés ont été rapportés comme étant de bons substrats pour les lipases.

CHAPITRE IV: EFFET DE LA LONGUEUR DE LA CHAINE DE CARBONE DU DONNEUR D'ACYLE SUR L'ACYLATION DE L'ISOQUERCITRINE ET SUR LES ACTIVITES DES ESTERS

1. Introduction

Les flavonoïdes sont des molécules naturelles largement distribuées dans les végétaux. Ces molécules ont fait l'objet de nombreux travaux concernant leur extraction, leur identification, leur fonctionnalisation et l'étude de leurs propriétés. L'intérêt porté à ces composés se justifie par les nombreux effets biologiques qu'on leur attribue, tels que leur rôle protecteur contre les inflammations, les allergies, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les infections bactériennes et virales, et leur rôle dans la stimulation du système immunitaire. Certains de ces effets sont liés à leur pouvoir antioxydant et inhibiteur d'enzymes (hydrolases, oxydoréductases, kinases et isomérases).

Aujourd'hui plusieurs flavonoïdes comme la quercetine, la rutine, etc. sont commercialisés et utilisés dans des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Cependant, la formulation de ces molécules dans diverses préparations est parfois rendue difficile par leur faible solubilité et stabilité. De plus, après ingestion, leur biodisponibilité peut être limité par un faible transfert à travers les membranes biologiques des cellules du tractus grastro-intestinal.

Afin de contourner ces difficultés, différentes réactions de fonctionnalisation des flavonoïdes peuvent être envisagées. Parmi les réactions les plus décrites dans la littérature, l'acylation s'est avérée être une voie particulièrement intéressante et prometteuse.

L'étude qui suit est présentée sous forme d'une publication acceptée au journal *Process Biochemistry* en 2009. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'acylation de l'isoquercitrine par voie enzymatique. Après avoir vérifié la faisabilité de l'acylation enzymatique de l'isoquercitrine par divers acides gras, en présence de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB), en solvant organique, il semblait pertinent d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne du groupement acyle sur la performance de la réaction. Ainsi, 8

donneurs d'acyle ont été utilisés : butyrate d'éthyle (C4 :0), caproate d'éthyle (C6 :0), caprylate d'éthyle (C8 :0), décanoate d'éthyle (C10 :0), laurate d'éthyle (C12 :0), palmitate d'éthyle (C16 :0), stéarate d'éthyle (C18 :0) et oléate d'éthyle (C18 :1). Les taux de conversion des substrats à l'équilibre et les vitesses réactionnelles ont été comparés.

Si la synthèse d'esters de flavonoïdes a fait l'objet d'un nombre important d'études, très peu de travaux ont été consacrés à l'étude des propriétés des esters synthétisés, afin d'évaluer l'impact de l'acylation sur les propriétés des flavonoïdes. Ceci nous a incités à étudier certaines propriétés des esters de flavonoïdes produits et à les comparer à celles des molécules naturelles. Ainsi, les activités antioxydantes des esters d'isoquercitrine et de l'isoquercitrine ont été évaluées en utilisant différentes méthodes :

* test d'inhibition de la xanthine oxydase
*test de piégeage du radical superoxide
*test de piégeage du radical $DPPH^{\cdot -}$
*test de piégeage du radical $ABTS^{\cdot +}$

Par ailleurs, l'activité antiproliferative des esters synthétisés a été évaluée d'une part vis-à-vis d'une lignée cellulaire cancéreuse humaine, les cellules Caco2 et d'autre part vis-à-vis de cellules humaines normales HUVEC, afin de mettre en évidence une éventuelle sélectivité de ces molécules vis-à-vis des cellules cancéreuses.

2. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters

Jamila Hadj Salem[a], Catherine Humeau[b*], Isabelle Chevalot[a], Christelle Harscoat[a], Régis Vanderesse[c], Fabrice Blanchard[a], Michel Fick[a]

LSGC, Nancy Université, CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[b]
LIBIO, Nancy Université, 2 avenue de la forêt de Haye-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[c]
LCPM, Nancy Université, 1 rue Grandville, BP45 -54000 Nancy, France

Publication acceptée dans Process Biochemistry

Abstract

The enzymatic acylation of isoquercitrin with fatty acid esters of various carbon chain lengths was carried out in 2-methyl-2-butanol using Novozym 435®. The conversion yield and the initial rate decreased from 66 to 38 % and from 17.7 to 10.1 µmol/h respectively, as the carbon chain of the acyl donor increased from C4 to C18. Isoquercitrin acylated derivatives showed higher xanthine oxidase inhibition activities than isoquercitrin. This property increased with the lipophilicity of the derivative esters. The scavenging activity of isoquercitrin esters against ABTS and DPPH radicals decreased with the acyl chain length. Conversely, for esters from C6 to C18, a linear growing relationship can be established between the chain length and the superoxide radical scavenging activity. Furthermore, an improved antiproliferative effect on Caco2 cancer cells was induced by addition of isoquercitrin esters comparing with the activity of isoquercitrin.

KEYWORDS: isoquercitrin; enzymatic acylation; *Candida antarctica* lipase B; flavonoid esters; antioxidant activity; antiproliferative activity.

* Corresponding author. Tel.: + 33 3 83 59 57 84; Fax: + 33 3 83 59 58 04

E-mail address: catherine.humeau@ensaia.inpl-nancy.fr

1. Introduction

Free radicals like reactive oxygen species (ROS) which are implicated in many human degenerative diseases can cause DNA lesions [1, 2], loss of enzymatic activities [3, 4], increase of cell permeability [5, 6] and eventually necrotic cell death. Damages induced by these species are often suggested to play a role in the patho-physiology of various diseases, including diabetes [7], cancer [8] and lung diseases [9-12]. Search for new efficient radical inhibitors from natural sources constitutes an expanding field to prevent the risks and effects of acute and chronic free radical induced pathologies.

In this context, antioxidants in human diets are of great interest as possible protective agents to reduce oxidative damages. Many natural antioxidants have already been isolated from different plant materials such as seeds, cereal crops, vegetables, fruits, leaves, roots, spices, and herbs [13, 14]. Among them, flavonoids that are low molecular weight substances found in all vascular plants present various beneficial effects towards human health. Numerous studies have been already performed to determine their mechanism of action. Flavonoid antioxidant properties include the chelation of trace elements (free iron or copper) which are potential enhancers of free radicals formation, the stabilisation of free radicals involved in oxidative processes by complexing with them [15] and the inhibition of enzymes which lead to the formation of reactive oxygen species [16]. In addition, some flavonoids have been found to exert specific cytotoxic activities towards cancer cells which has generated an expanding interest in developing flavonoid-based cytostatics for anti-cancer therapy [17]. In order to predict the cytotoxic potential of a given flavonoid and to facilitate the search for effective candidates for cancer therapy, structure-activity relationships have to be established.

However, flavonoids can exhibit very low solubility and stability in lipophilic and/or hydrophobic media [18-21], thus limiting their use in oil based foods and cosmetics.

To improve these properties several authors have studied the modification of flavonoid structures by chemical, enzymatic or chemo-enzymatic reactions. Two reactions, the acylation, and the glycosylation have received particular attention. Glycosylation allowed reinforcing the hydrophilic character of some flavonoids by adding sugars while their hydrophobicity can be enhanced by chemical or enzymatic acylation by fatty acids.

Chemical and enzymatic acylation of phenolic compounds with various acyl donors has been already reported by several authors. However, chemical processes are not regioselective and

lead to the functionalization of phenolic groups that may be responsible for their antioxidant activity [22- 24]. The enzymatic acylation of flavonoids was shown to be more regioselective and to enhance not only flavonoids solubility in various media, but also their stability and their antioxidant activity [25- 27]. In addition, flavonoids derivatives are expected to exhibit a higher affinity for phospholipidic membranes and could be useful to establish structure-activity relationships relating their amphiphilic and lipophilic properties to their ability to be transferred. For instance, studies showed that acylation of mono- and diglycosylated chrysoeriol enhanced their protective effect against human LDL and serum oxidation as well as their antioxidant activity in oils and their xanthine oxidase inhibition property [28, 29]. Rao et al. showed that acylated mesquitol derivatives displayed xanthine oxidase inhibitory potential increasing with the acyl chain length [29]. Other exemples of phenolic esters used in food and cosmetic preparations were reported in the literature. Different esters of gallic acid [propyl (E310), octyl (E311), and dodecyl (E312) gallates] are widely used as food antioxidant additives [30-32]. Octyl gallate possesses a broad antimicrobial spectrum, and is an efficient antifungal [33,34]. Vercauteren et al. [35] developed a process for the chemical esterification of the phenolic functions of flavanols with saturated or unsaturated fatty acids to incorporate them in cosmetic preparations. In addition, some authors showed that the lipophilicity of acylated derivatives may increase their ability to interact with the cell membrane and to transfer through it [28, 36, 37].

Various enzymes have been tested to catalyse the acylation of flavonoids, such as proteases, acyl transferases and lipases, in particular the lipase B of *Candida antarctica* (CALB) which showed a strong selectivity for flavonoids glycosides presenting a primary or a secondary aliphatic hydroxyl group on their sugar moiety [38, 39]. However, studies about the alcohol donor effect showed that substrates with a primary hydroxyl group were easier to acylate than those exhibiting secondary hydroxyl groups [40- 42].

Among flavonoids, isoquercitrin, a widely spread compound, has been reported to exhibit many biological activities, such as ABTS, DPPH and superoxide radicals scavenging [43-45]. Isoquercitrin was shown to be a good substrate for the CALB. Danieli et al [41] used this enzyme to catalyze the acylation of isoquercitrin in the presence of vinyl acetate as acyl donor and pyridine/acetone (1/9) as solvent and showed a regioselectivity in favour of the primary 6˝-OH group of isoquercitrin. Similar results were obtained by Nakajima et al. [46] when synthesizing isoquercitrin aromatic esters (isoquercitrin 6”-cinnamate). Gao et al. [47] showed that the acylation of isoquercitrin with aromatic acid vinyl esters took also place at the primary hydroxyl group of the glucose moiety. Chebil et al. [48] studied the effect of the

origin of the lipase on the regioselectivity of isoquercitrin acylation by vinyl acetate by *Candida antarctica* and *Pseudomonas cepacia* lipases. Two products were formed when *Candida antarctica* lipase B was used, isoquercitrin 3″,6″-diacetate and isoquercitrin 2″,3″,6″-triacetate and three products were synthesized when *Pseudomonas cepacia* lipase was used, isoquercitrin 6″-acetate, isoquercitrin 4′,6″-diacetate and another product that was not identified. Ishihara et al. [49] showed that the enzymatic synthesis of acylated isoquercitrin was accomplished by a lipase-catalyzed transesterification with carboxylic acid vinyl esters as acyl donors in acetone or acetonitrile as solvent. These authors found that acylation occurred on the primary OH of the sugar moiety and indicated that the introduction of an acyl group onto isoquercitrin structure improved its thermostability and light-stability.

In the present work, the enzymatic synthesis of fatty acid derivatives of isoquercitrin was studied. Then, a systematic study concerning the effect of the structure of isoquercitrin derivatives on their antioxidant properties and antiproliferative activity towards Caco2 cancer cells was investigated in vitro. Particularly, the influence of the acyl donor carbon chain length on the performances of isoquercitrin acylation and derivatives properties was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ethyl decanoate (> 99%), ethyl caprylate (> 98%), ethyl caproate (> 99%) and ethyl butyrate (> 98%) were purchased from Fluka (Switzerland). Ethyl laurate (99%), ethyl stearate (99%) and ethyl palmitate (99%) were from Sigma (Germany) and ethyl oleate (98%) was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). 2-Methyl-2-butanol, hexane, acetic acid, methanol, chloroform and trifluoroacetic acid (TFA) with 99 % of purity were acquired from Carlo Erba (Spain). Ethyl acetate was from Fisher scientific (UK).

2.2. Synthesis of isoquercitrin esters

The enzymatic synthesis of isoquercitrin esters was performed in the glass device of a rotary evaporator equipped with a vacuum controller. The reaction medium was maintained at 65 °C and stirred at 150 rpm under vacuum (700 mbar). Each reaction was performed using isoquercitrin (10 mM) (Extrasynthèse, France) in 10 mL of 2-methyl-2-butanol previously dried on 4Å molecular sieves and 100 mM acyl donor: ethyl oleate, ethyl stearate, ethyl palmitate, ethyl laurate, ethyl decanoate, ethyl caprylate, ethyl caproate or ethyl butyrate.

After complete dissolution of the substrates (65°C, under stirring overnight), the esterification reaction was started by adding 30 g/L of Novozym 435®, lipase B from *Candida antarctica* (CALB lipase) immobilized on an acrylic resin. This enzyme presents a propyl laurate synthesis activity of 7000 propyl laurate units (PLU).g^{-1} and a protein grade of [1-10 %], (Novo Nordisk A/S, Denmark). To evaluate the evaporation of the solvent during reactions, an internal inert standard was used (2, 6- dimethylphenol at 0.2 g/L) [50]**.** The reaction was stopped after 72 h by filtration to remove the enzyme.

2.3. Thin layer chromatography

Qualitative analyses of reaction mixtures were performed by TLC on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany) using a solvent mixture system: ethyl acetate/methanol/water (100/8/10, v/v/v). The products were detected by spraying a methanol solution of 2-aminoethyldiphenylborinate and revealed under UV light (254 nm).

2.4. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

The time course of each reaction was monitored at 214 nm using HPLC (LC 10 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with an UV detector and a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France). The column was a C18 amide 2.1-125 mm (Altima®, Altech, France) maintained at 25 °C. The mobile phases (0.2 mL/min flow rate) consisted of water/methanol/TFA (60/40/0.1 v/v/v) (phase A) and methanol/TFA (100/0.1 v/v) (phase B). The gradient applied was: 0-1 min: 100 % A; 1-16 min: 0-100 % B;16-24 min: 100% B; 24-25 min: 0-100 % A; 25-34 min: 100 % A. Calibrations were performed using standard substrates and purified products. The substrate conversion yield at the thermodynamic equilibrium was determined applying the following equation:

$$Y\ (\%) = (1 - (\ [\text{substrate}]_{\text{equilibrium}} / [\text{substrate}]_{\text{initial}})\ ) \times 100 \quad (1)$$

Initial specific reaction rates were estimated as the slope of the linear approximation during the first two hours of reaction. The variation coefficient of reproducibility for both substrate conversion rates and initial reaction rates was found to be inferior to 10%.

2.5. Purification of acylated products

After filtration of the reaction medium to remove the enzyme and partial evaporation of the solvent, the residue was applied to a silica gel column (Silica Gel 60, 230-400 mesh, Merck,

Germany) and eluted with ethyl acetate/methanol/water (100/8/10 v/v/v). Fractions were collected then analyzed. The fractions containing the product were pooled together and the solvent was evaporated under vacuum.

2.6. LC-MS characterization of isoquercitrin esters

After dilution of the reaction medium in the mobile phase and filtration, samples were analyzed using a HPLC system (Thermo Fisher Scientific, France) equipped with a UV detector (214 nm) coupled to a mass spectrometer with electron spray (ES) ionization source (LTQ, Thermo electron corporation®, USA). The HPLC method was the one described above. MS measurements were carried out with helium as the collision gas in the ion trap and nitrogen as sheath (50), sweep (10) and auxiliary (10) gas in the source. MS parameters were tuned as follows: electrospray positive ionization mode, capillary temperature of 300 °C, source voltage at 5.0 kV.

2.7. Nuclear magnetic resonance

The chemical structure of the acylated products was determined by ^{13}C NMR and ^{1}H NMR spectroscopic analysis in $CDCl_3$ on a Brücker Avance 300 spectrometer (Germany). The following notations were used: s: singlet, t: triplet, m: multiplet, br: broad.

Isoquercitrin: ^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 300 Hz) δ: 12.63 (s, 1H, OH5), 7.58 (m, 2H, H6',H2'), 6.84 (d, *J*=9.0Hz, 1H, H5'), 6.40 (d, *J*=2.0Hz, 1H, H8), 6.20 (d, *J*=2.0Hz, 1H, H6), 5.45 (d, *J*=7.4Hz, 1H, H1"), **3.58, 3.34 (ABX, J_{AB} = 11.4 Hz, J_{AX} = 1.4 Hz, J_{BX} = 5.4 Hz, 2 H,** H6**"),** 3.24 (m, 2H, H2", H4"), 3.09 (m, 2H, H3", H5").

^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$): δ: 177.43 (C4), 164.08(C7), 161.23 (C9), 156.30(C5), 156.16 (C2), 148.43 (C4'), 144.78 (C3'), 133.432 (C3), 121.58 (C1'), 121.16 (C6'), 116.19 (C5'), 115.19 (C2'), 103.97 (C10), 100.87 (C1"), 98.63 (C6), 93.47 (C8), 77.54 (C5"), 76.50 (C3"), 74.08 (C2"), 69.93 (C4"), **60.97 (C6")**.

Isoquercitrin butyrate: ^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 300 Hz) δ: 12.61 (s, 1H, OH5), 7.53 (ps, 2H, H6',H2'), 6.82 (d, *J*=9.0Hz, 1H, H5'), 6.38 (d, *J*=1.8Hz, 1H, H8), 6.18 (d, *J*=1.8Hz, 1H, H6), 5.43 (d, *J*=7.1Hz, 1H, H1"), **4.15, 3.95 (ABX, J_{AB} = 10.9 Hz, J_{AX} = 4.4 Hz, J_{BX} = 5.9 Hz, 2 H, H6"),** 3.67 (m, 2H, H2", H4"), 3.28 (m, 2H, H3", H5"), 1.96 (m, 2H, Hb), 1.25 (m, 2H, Hc) 0.65 (t , *J*=4.3Hz, 3h, Hd).

^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$): δ: 177.28 (C4), 172.18 (Ca), 164.09 (C7), 161.19 (C9), 156.25 (C5,C2), 148.42 (C4'), 144.71 (C3'), 132.90 (C3), 121.41 (C1'), 120.99 (C6'), 116.01 (C5'),

115.05 (C2'), 103.79 (C10), 100.52 (C1"), 98.58 (C6), 93.40 (C8), 76.22 (C5"), 74.53 (C3"), 74.42 (C2"), 70.01 (C4"), **62.84 (C6"),** 35.14 (Cb), 17.71 (Cc), 13.09 (Cd).

2.8. LogP evaluation

Theoretical logP of isoquercitrin and its acylated derivatives were determined using the Molinspiration program [51]. The efficiency of this program was tested by calculating the logP of some flavonoids already experimentally determined [52].

2.9. Xanthine oxidase inhibition assay

Xanthine oxidase inhibition activity was evaluated by the slightly modified method of Cos et al. [53], which consists in the spectrophotometric monitoring of the formation of uric acid from xanthine. Isoquercitrin and its acylated derivatives were first dissolved in a small amount of DMSO (5%). 2 mL reaction mixture containing 200 mM phosphate buffer pH 7.8, 0.2 mM hydroxylamine,HCl, 50 µM xanthine as the substrate, 0.1 mM EDTA (pH 7.0), isoquercitrin or its esters (0 – 200 µM) were prepared. The assay was initiated by adding the enzyme (2.5 mU/mL) to the reaction mixture. A negative control containing all reagents except the test sample was used. After incubation at 37 °C during 30 min, the reaction was stopped by adding 200 µL of 0.58 M HCl. The enzyme activity was evaluated by measuring uric acid formation at 290 nm. For each compound concentration tested, the percentage of xanthine oxidase inhibition (XOI) was calculated using the following equation:

$$XOI\ (\%) = (1 - Abs_{sample}/Abs_{control}) \times 100 \quad (2)$$

The extent of inhibition was expressed as the chemical concentration required to inhibit 50% of the enzyme activity (IC_{50}) using a second order polynomial model. Allopurinol was used as the reference compound. All tests were carried out in triplicate. Results were expressed as mean values with standard deviations (± SD).

2.10. Superoxide scavenging activity

To detect superoxide, the colouring reagent (300 µg/mL sulfanilic acid, 5 µg/mL of N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, and 16.7% (v/v) acetic acid) was added to the reaction medium of the xanthine oxidase inhibition test. The mixture stood in the dark at room temperature for 30 min, then the absorbance at 550 nm was measured. A solution without any tested compound was used as control. Antioxidant activity (AA) was expressed as an inhibition percentage of superoxide radical, and calculated using equation (2). For each compound, the half-maximal scavenging concentration (SC50) was calculated by linear

regression analysis [53]. All analyses were carried out in triplicate and results represented the mean values with standard deviation (± SD).

2.11. DPPH test

Determination of the antioxidant activity with the stable radical 2,2-diphenyl-l-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$) (Sigma, Germany) radical scavenging method was performed. The ability to scavenge the $DPPH^{\cdot}$ free radical was determined according to the method of Atoui et al. [54]. A methanolic solution (50 µL) of the compound to be tested was prepared at four different concentrations (between 0 and 40 µM) and added to 1.95 mL of DPPH solution ($6x10^{-5}$ M in methanol). The mixture was vigorously shaken with a vortex mixer and incubated for 30 min in the dark, then the decrease in the absorbance corresponding to the remaining $DPPH^{\cdot}$ was measured at 517 nm. Methanol was used as a blank solution and DPPH solution in methanol without any tested compound was used as control. The ability to scavenge DPPH radical was calculated using equation (2). The antioxidant activities of compounds were expressed as TEAC values. TEAC value is defined as the concentration of standard trolox (Fluka, Germany), a water-soluble vitamin E analogue that exhibited the same antioxidant capacity as a 1 mM solution of the antioxidant compound under investigation. All analyses were carried out in triplicate and results represented the mean values with standard deviation.

2.12. ABTS radicals scavenging activity

The evaluation of 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid ($ABTS^{\cdot+}$) radical scavenging activity is based on the ability of antioxidants to inhibit the long-life ABTS radical cation (Sigma, Germany), a blue/green chromophore with characteristic absorption at 734 nm, in comparison with that of trolox. ABTS radical cation was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate and allowing the mixture to stand in the dark, at room temperature, for 12 to 16 h before use.

For the study of the antiradical activity of isoquercitrin and its acylated derivatives, the $ABTS^{\cdot+}$ solution was diluted with ethanol at 30°C, in order to obtain an absorbance of 0.70 (±0.02) at 734 nm. After addition of 1.0 mL of diluted $ABTS^{\cdot+}$ solution to 10 µL of sample or trolox standard in ethanol (concentration between 0 and 16 µM), the absorbance was measured at 30°C exactly 6 min after initial mixing. Appropriate solvent blanks were run in each assay. All experiments were performed in triplicate. The extent of decolourization is calculated as the percentage reduction of ABTS absorbance. The antioxidant activities of compounds were expressed as TEAC values. TEAC value is defined as the concentration of

standard trolox with the same antioxidant capacity as a 1 mM concentration or 1mg/mL of the antioxidant compound under investigation [55].

2.13. Cell culture

Caco2 cells were kindly provided by the laboratory URAFPA (Nancy, France). These cells were used between passages 30 and 50 and were cultivated in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) with high glucose (4.5 g/L), (Sigma, Germany) and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), (EuroBio, France), 2 mM L-glutamine and 1% nonessential aminoacids (GIBCO, USA). The cells were usually split when reaching confluence (5-7 days). They were first rinsed with Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium (DPBS) (Sigma, Germany) and then trypsinized with a solution containing 0.25% trypsin and 1 mM EDTA (GIBCO, USA). For maintenance of the cell line, cells were seeded at $2x10^4$ cells/cm^2 in flasks.

2.14. Antiproliferative activity

Caco2 cells were seeded into 96-well microplates at $4x10^4$ cells per well in 200 µL of DMEM medium supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine and 1% non essential amino acids. After 24 h, cells were exposed to various concentrations of the compounds solubilized in DMSO and incubated for 48 h at 37°C, under 5% CO_2 atmosphere. The cytotoxicity of isoquercitrin and its esters was determined using the colorimetric methylthiazoletetrazolium method based on the reduction of the tetrazolium salt, 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-y)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Germany) into a crystalline blue formazan product by the mitochondrial oxidoreductases of viable cells [56]. 50 µL of MTT solution (2 g/L) was added to each well. After incubation for 4h at 37°C, the formazan crystals produced by active reductases were dissolved in 150 µL isopropanol. The product was quantified spectrophotometrically by absorbance measurement at 540 nm using a microplate reader. Each test was carried out in quadruplicate, and each experiment was repeated twice. The cell viability was calculated according to the following equation:

Cell viability (%) = $(1 - Abs_{treated\ cells}/Abs_{control}) \times 100$

Results were expressed as mean values with the standard deviations.

3. Results and discussion

3.1. Enzymatic acylation of isoquercitrin

Isoquercitrin was acylated by fatty acid ethyl esters using the lipase B of *Candida antarctica* (figure 1) in 2-methyl-2-butanol which allowed the complete solubilisation of both substrates at the concentrations used in the present study. A molar ratio of 1/10 (flavonoid / acyl donor) was chosen as it was previously demonstrated to be optimal in terms of acylation rate [42].

The temperature was kept at 65°C and a pressure of 700 mbar was applied to favour the alcohol by-product evaporation. No product was detected when fatty acid esters and isoquercitrin were incubated in the absence of enzyme. For all the acyl donors, only one major product was identified by TLC, HPLC and LC-MS analyses, which indicated that the reaction was regioselective. The regioselectivity was confirmed by LC-MS and 1HNMR analyses of the purified isoquercitrin esters. LC-MS results showed that only monoacylated esters were synthesized (figure 1): isoquercitrin butyrate (C4:0) ($M+H^+$=535 g/mol), isoquercitrin caproate (C6:0) ($M+H^+$=563 g/mol), isoquercitrin caprylate (C8:0) ($M+H^+$=591 g/mol), isoquercitrin decanoate (C10:0) ($M+H^+$=619 g/mol), isoquercitrin laurate (C12:0) ($M+H^+$=647 g/mol), isoquercitrin palmitate (C16:0) ($M+H^+$=703 g/mol), isoquercitrin stearate (C18: 0) ($M+H^+$=731 g/mol) isoquercitrin oleate (C18:1) ($M+H^+$= 729 g/mol).

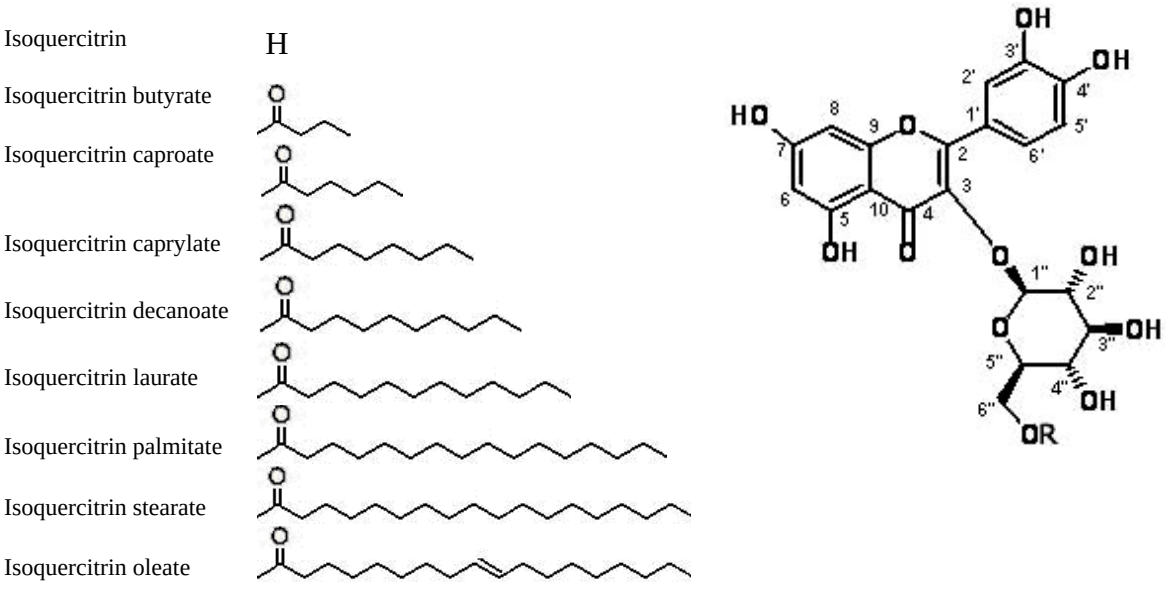


Figure 1: Chemical structure of isoquercitrin and its esters

To confirm the acylation site, ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of isoquercitrin and isoquercitrin butyrate were recorded in DMSO-d6. Comparison of these spectra showed that acylation took place at the 6”-OH of the sugar moity.

The acylation of isoquercitrin affected only the two hydrogen H6” (in bold in the data). For the “free” isoquercitrin, the ABX system presented two signals at 3.58 and 3.34 ppm, whereas these two H6” atoms assumed higher values at 4.15 and 3.95 ppm for the ester, indicating the deshielding effect of the butyrate moiety on the chemical shifts of these two protons.

Similarly, the chemical shift of C6” was 60.97 ppm for the “free” isoquercitrin and slightly downfield for the ester (62.84 ppm), all the other values being rather similar.

This result is in accordance with other studies concerning the ability of CALB to catalyze the esterification of isoquercitrin. Nakajima et al. [46] and Stevenson et al. [38] indicated that the acylation of isoquercitrin with vinyl cinnamate or 2-hydroxy-phenylpropionic acid led to the synthesis of the sole isoquercitrin 6″-ester. However, Chebil et al. [48] indicated that the acetylation of isoquercitrin in acetone at 50°C with CALB led to two products, isoquercitrin 3″,6″-diacetate ester and isoquercitrin 2″, 3″,6″-triacetate, when vinyl acetate was used as acyl donor. Danieli et al. [41] obtained only the diacetylated product, isoquercitrin 3″,6″-diacetate after isoquercitrin acetylation with vinyl acetate catalysed by CALB using a mixture of acetone / pyridin as solvent, at 45°C. In our case, neither diester nor triester was obtained.

3.2. Effect of the acyl donor structure on acylation reaction efficiency

The effect of the carbon-chain length of the acyl donor on the reaction efficiency was studied using eight fatty acids with carbon chain length varying from 4 to 18. Both the conversion yields of isoquercitrin and the initial rates of reaction for the eight fatty acids are given in figures 2a and 2b. All reactions reached their thermodynamic equilibrium between 48 h and 72 h. The total conversion yield of isoquercitrin depended on the carbon chain length of the fatty acyl donor used. It decreased from 66 % for ethyl butyrate to 38 % for ethyl stearate. Katsoura et al. [57] reported a similar trend during the acylation of naringin and rutin with CALB lipase using free fatty acids and their vinyl esters in ionic liquids. In their study, the higher conversion yield, about 65%, was observed for short chain length acyl donors. Kontogianni et al. [58] showed that no relationship can be established between the acyl donor chain length and the conversion yield of esterification of rutin and naringin by fatty acids (C8, C10 and C12), catalyzed by the CALB lipase in various solvent systems. Another trend was reported by Ardhaoui et al [59], who studied rutin acylation reactions with CALB using free fatty acids with carbon chain length varying from 6 to 18 as acyl donors. They showed that

for carbon chain lengths between C6 and C12, the performance of the reaction increased with the fatty acid chain length, whereas for higher carbon-chain length, no significant effect was observed.

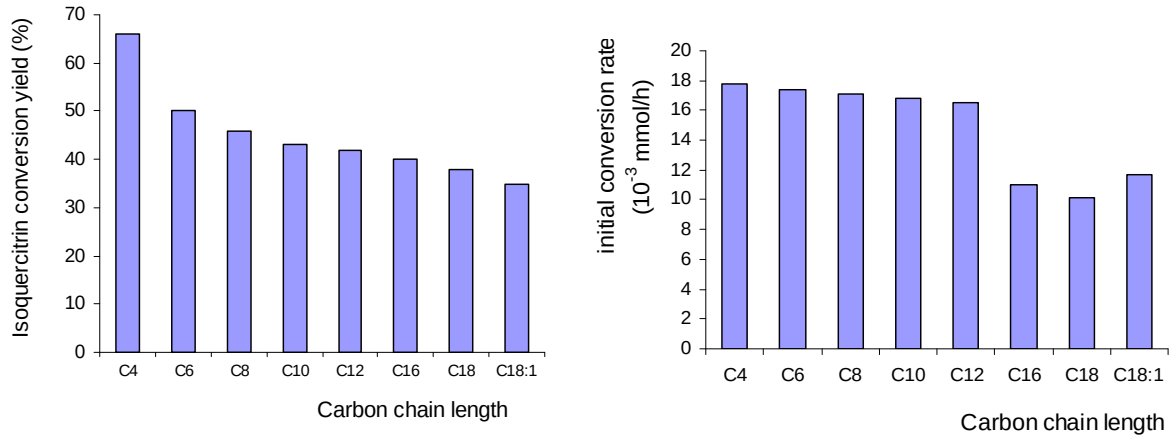


Figure 2: Effect of acyl donor structure on the conversion yields (after 72h of reaction) (A) and the initial rates of isoquercitrin (10 mM) acylation reactions (B) with different ethyl ester fatty acids (100 mM) in 2-methyl-2 butanol catalysed by the lipase B of *Candida Antarctica*. Reaction was carried out at 60°C under vacuum (700 mbar). The molar ratio of acyl donor to flavonoid was 10. The variation coefficient was found to be inferior to 10% for all results.

The influence of the acyl donor chain length on the kinetics of isoquercitrin acylation was also studied. For chain lengths from C4 to C12, similar initial rates of reaction were observed (around $17x10^{-3}$ mmol/h) independently of the fatty acid esters used. For esters longer than C16 the initial rate stood around $10x10^{-3}$ mmol/h. This latter result is similar to that reported by Mellou et al. [28] who showed that the carbon chain length of the acyl donor did not affect the reaction rate of naringin acylation by fatty acids or their vinyl esters.

In the present study, conversion yields of stearic and oleic acid ethyl esters were 38 % and 35 % respectively, and similar reaction rates were obtained showing that the presence of an unsaturation did not influence the kinetic of the reaction. This result is in accordance with those reported by other authors about rutin acylation with oleic, linoleic and γ-linolenic acids and with stearic and oleic ethyl esters [36, 59].

All isoquercitrin esters were purified in order to study their antioxidant and antiproliferative activities and to compare them with isoquercitrin activities.

3.3. Xanthine oxidase inhibition

The XO catalyzes the oxidation of hypoxanthine and xanthine producing uric acid, superoxide radical and hydrogen peroxide. Consequently, XO is considered as an important biological source of superoxide radicals.

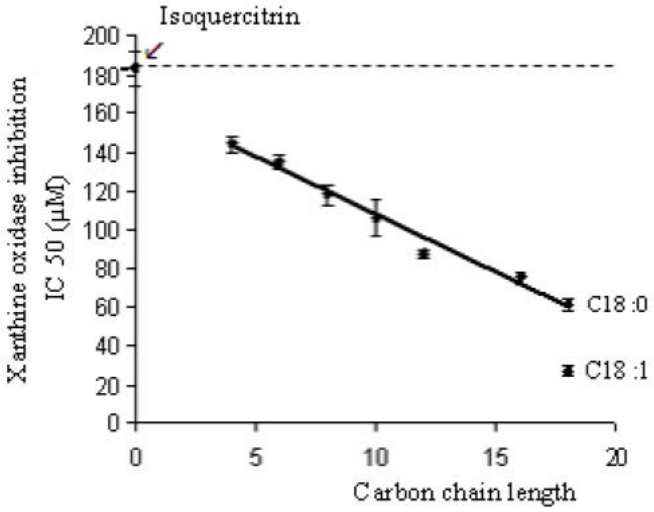


Figure 3: Xanthine oxidase inhibitory potential of isoquercitrin and its esters depending on acyl chain length, expressed as IC50 values (µM).

In the present study, inhibition of XO by isoquercitrin and its acylated derivatives was evaluated (figure 3). Allopurinol, routinely used as XO inhibitor, constituted the reference molecule with an IC50 value of 2.4 µM. Isoquercitrin did not display an important xanthine oxidase inhibitory activity with an IC 50 value of 183 µM. The acylation of this molecule significantly enhanced its xanthine oxidase inhibitory potential. Indeed, all isoquercitrin esters showed a higher XO inhibition activity than isoquercitrin. For saturated esters, IC50 values increased when decreasing the carbon chain length, from 61 µM to 144 µM for isoquercitrin stearate and isoquercitrin butyrate respectively. As shown in figure 3, a linear relationship could be established between the IC50 value and the acyl chain length. Isoquercitrin oleate (C18:1) which presents an unsaturation in the acyl group exhibited a higher activity (IC50 value of 27 µM) than that of its saturated analogue (IC50 value of 61 µM). These results are in accordance with those described by Rao et al. [29] who found a linear relationship between the log IC50 of mesquitol esters and their acyl chain length. This result can be explained by the improvement of the lipophilicity of the molecule allowing a better accessibility to the active site of XO.

3.4. Superoxide radical scavenging activity

A molecule is considered as a superoxide scavenger when its IC50 value for reduction of the superoxide radical is lower than that found for XO inhibition [53].

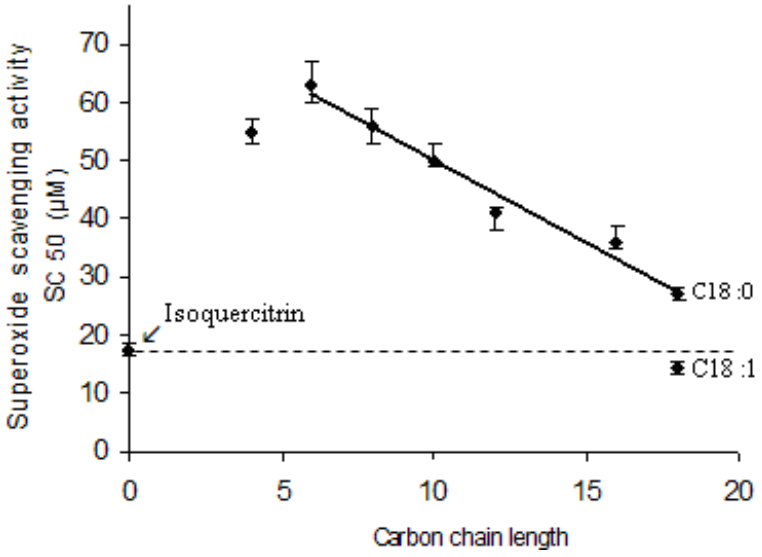


Figure 4: Superoxide scavenging potential of isoquercitrin and its esters depending on acyl chain length, expressed as SC50 values (µM).

Isoquercitrin and its acylated derivatives respected this condition as isoquercitrin saturated esters presented IC50 values from 63 µM for isoquercitrin caproate to 27 µM for isoquercitrin stearate. These esters were then less active than isoquercitrin (IC50 value =17 µM). Isoquercitrin oleate exhibited a scavenging activity (IC50 value =14 µM) similar to that of isoquercitrin.

Except for isoquercitrin butyrate (C4) that showed a higher activity than isoquercitrin caproate (C6), a linear relationship between IC50 values and the esters carbon chain length was established (figure 4).

3.5. DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging ability of isoquercitrin and its derivatives was assessed and trolox was used as reference molecule. This activity was expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

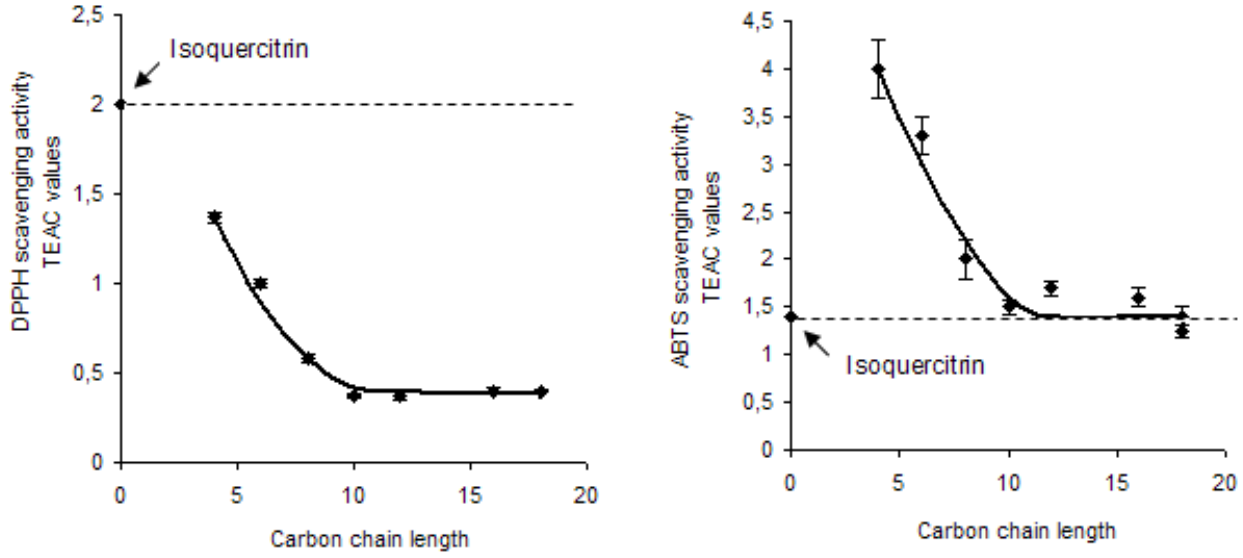


Figure 5: Antioxidant activities of isoquercitrin esters of various chain lengths against $DPPH^{\cdot}$ (A) and $ABTS^{\cdot+}$ (B) radicals (expressed as TEAC values) .

Esters were found to exhibit a lower radical scavenging activity than isoquercitrin (TEAC value of 2.0) (figure 5A). For esters from C4 to C10, the antiradical activity decreased when increasing carbon chain length. Isoquercitrin butyrate (C4) exhibited the highest antiradical activity (TEAC value of 1.37). TEAC values decreased with the carbon chain length to reach 0.37 for isoquercitrin decanoate (C10). Rather similar antiradical activities were observed for esters with chain lengths higher than 10 carbon atoms (TEAC value around 0.37).

Some authors studied the DPPH antiradical activity of phenolic esters and showed that this activity was independent of the acyl chain length [60]. Takahashi et al. [61] showed similar results in the case of alkylaminophenols of various alkyl chain lengths.

3.6. ABTS radical scavenging activity

The ABTS radical-scavenging activity method is based on the ability of molecules to quench the ABTS radical cation, in comparison with that of trolox. The ABTS radical-scavenging activities of isoquercitrin and its esters, expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), are given in figure 5B.

All isoquercitrin esters were shown to be effective antiradical agents compared to the trolox (TEAC values higher than 1). They displayed similar or higher free radical scavenging activities than isoquercitrin (TEAC= 1.4). In fact, TEAC values decreased from 4 to 1.5 when the acyl chain length increased from C4 (isoquercitrin butyrate) to C10 (isoquercitrin

decanoate). Esters with longer acyl chain (C10-C18) showed antiradical activities similar to that of isoquercitrin with TEAC values of 1.4 for isoquercitrin stearate and 1.7 for isoquercitrin laurate. These results are in accordance with those of Torres de Pinedo et al. [62], who showed that the acyl chain length affected the radical scavenging activity. They reported that palmitoyl esters of phenolic acids were more effective ABTS radical scavengers than stearoyl or oleyl esters.

The variation of ABTS antiradical activity versus the acyl chain length followed a similar trend to that of the DPPH scavenging activity (figures 5A and 5B).

3.7. Antiproliferative activity

Several studies reported that flavonoids may exhibit cytotoxic activities towards cancer cells [63-68]. In the present work, the effect of isoquercitrin and its fatty acid esters on tumoral Caco2 cells growth was investigated. At a concentration of 200 µM, isoquercitrin led to an antiproliferative activity of 42 % referring to the growth of Caco2 cells without isoquercitrin.

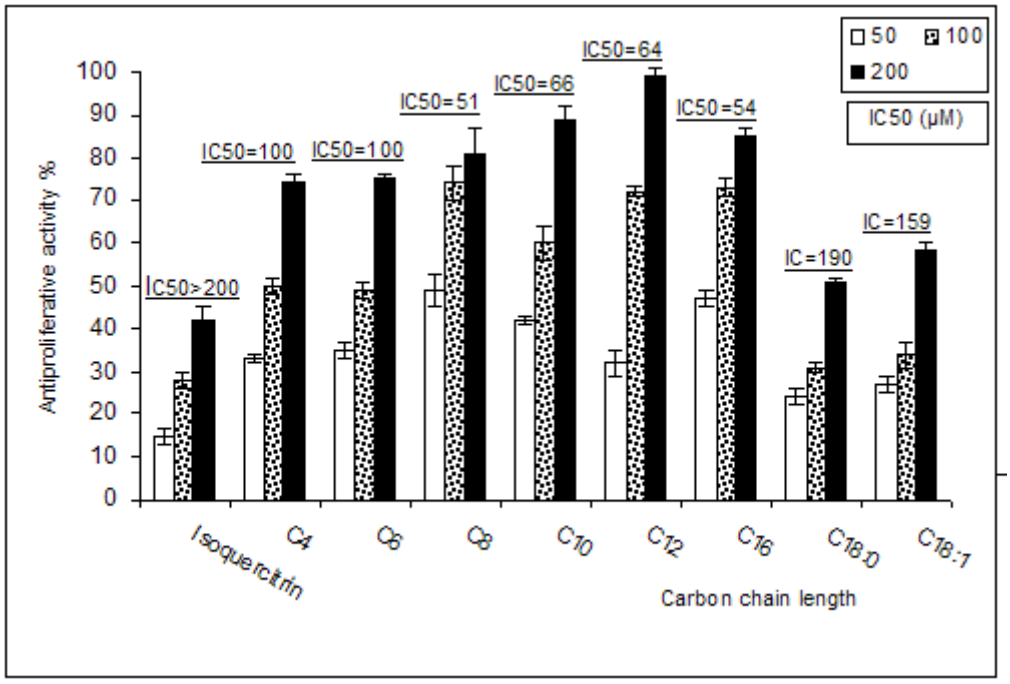


Figure 6: Antiproliferative effect of isoquercitrin esters of various chain length against Caco2 cancer cells at 50, 100 and 200µM and their IC50.

All isoquercitrin esters exhibited a dose dependent antiproliferative activity on Caco2 cells and were shown to be more active than isoquercitrin. Esters with acyl chain lengths from C8 to C16 showed the highest activities with IC50 values comprised between 51 and 66 μM. C4, C6 and C18 esters were less effective with IC50 values over 100 μM.

The enzymatic acylation of flavonoids was expected to increase their lipophilicity and consequently their ability to interact with the cell membrane and their transfer through it [28, 36, 69]. However, no relationship between the acyl chain length and cytotoxic activity on Caco2 cells could be established. The activity of a compound in a biological system does not only depend on its interaction with cell membranes due to its lipophilicity but also on its affinity for specific cell receptors. For instance, Dasgupta et al. [70] showed that in human breast cancer cells, the receptor affinity of somatostatin analogue was not affected by its acylation with palmitic acid, whereas this affinity was reduced when the peptide was acylated with stearic or butyric acids.

4. Conclusion

The present work focused on a systematic study concerning the influence of the chain length of acyl donors on the efficiency of isoquercitrin enzymatic acylation. Then, the influence of the structure of corresponding esters on their antioxidant and cytotoxic activities on cancer cells was evaluated.

The results indicated that the efficiency of the synthesis depended on the length of the acyl donor. *C. antarctica* lipase B exhibited a high activity towards short and medium chain length acyl donors and was less active towards long chain substrates.

For the first time, the effect of acyl donor chain length on isoquercitrin esters antioxidant properties and antiproliferative activity towards tumor cells was systematically studied. Isoquercitrin esters were shown to exhibit an antioxidant activity that depended on the acyl chain length. First, the XO inhibition property of isoquercitrin esters was shown to increase with their lipophilicity. The acylation reaction enhanced the scavenging activity of isoquercitrin against ABTS radicals but decreased it against DPPH and superoxide radicals. A structure-activity relationship could be established between isoquercitrin esters activities and corresponding acyl chain length. Although acylated derivatives of isoquercitrin presented a lower antiradical activity than isoquercitrin, their improved solubility in lipidic phases can lead to a good compromise for their use in food or cosmetic formulations.

The antiproliferative activity of isoquercitrin esters seemed to depend not only on their lipophilicity but also on their chemical structure that may influence their affinity for membrane receptors. In the present study, evidence was pointed out that although the parental molecule isoquercitrin was rather inactive towards Caco2 human colon cancer cells, its synthesized esters exhibited higher antiproliferative activities, indicating that these novel compounds might possess improved anti-tumor properties. Esters from C8 to C16 showed the highest antiproliferative activity. To explain these results, studies are in progress to evaluate interaction of these derivatives with cell membrane mimetic systems.

Acknowledgments:

Cedric Paris is highly acknowledged for his technical support in LC-MS analyses.

References

[1] Knaapen AM, Seiler F, Schilderman PAEL, Nehls P, Bruch J, Schins RPF, Borm PJA. Neutrophilis cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. Free Radical Biol Med 1999; 27: 234-240.

[2] Waris G, Ahsan H, Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. J Carcinog 2006; 5: 14.

[3] Haenen GRMM, Tai Tin Tsoi JNL, Vermeulen NPE, Timmerman H, Bast A. 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal stimulates microsomal lipid peroxidation by reducing the glutathione-dependent protection. Arch Biochem Biophys 1987; 259: 449-456.

[4] Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. IUBMB Life 2000; 49: 427-435.

[5] Yorimitsu M, Muranaka S, Sato EF, Fujita H, Abe K, Yasuda T, Inoue M, Utsumi K. Role of alpha-tocopherol in the regulation of mitochondrial permeability transition. Physiol Chem Phys Med NMR 2004; 36: 95-107.

[6] Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. Am J Pathol 2006; 208: 319-326.

[7] Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK, Molavi B. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38: 794-803.

[8] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 2006; 160: 1-40.

[9] Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J Suppl 2003; 46: 14s-27s.

[10] MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airway diseases. Eur J Pharmacol 2001; 429: 195-207.

[11] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2002; 30: 620-650.

[12] Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, Greening A, MacNee W. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary ibrosis. Free Radical Biol Med 1999; 27: 60-68.

[13] Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M, Satayavivad J. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. Food Chem Toxicol 2007; 45: 328-336.

[14] Souri E, Amin G, Farsam H, Barazandeh Tehrani M. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. DARU 2008; 2: 83-87.

[15] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 2000; 63: 1035-1042.

[16] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol Med 1996; 20: 933-956.

[17] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. Med Res Rev 2003; 23: 519–534.

[18] Kitao S, Ariga T, Matsudo T, Sekine H. The synthesis of catechin glucosides by transglycosylation with Leuconostoc mesenteroides sucrose phosphorylase. Biosci Biotech Biochem 1993;57:2010–5.

[19] Miyake T, Suzuki K, Yoneyama, M. 4G-alfa-D-glucopyranosyl rutin, and its preparation and uses. EP 0420376. 1991.

[20] Sakai M, Suzuki M, Nanjo F, Hara, Y. 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP 0618203. 1994.

[21] Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabro ML, Stancanelli R, Ficarra P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. J Pharmaceut Biomed Anal 2004; 35: 379–87.

[22] Bok S-H, Jeong T-S, Lee S-K, Kim J-R, Moon S-S, Choi M-S.. Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same. US 20010006978A1. 2001.

[23] Perrier E, Mariotte AM, Boumendjel A, Bresson-Rival D. Nouveaux esters de flavonoïdes, leur utilisation en cosmétique, dermopharmacie, en pharmacie et en agro alimentaire. FR 2778663-A1. 1998.

[24] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol Med 1996; 20: 933-56.

[25] Fossen T, Cabrita L, Andersen OM. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. Food Chem 1998; 63: 435-40.

[26] Ishihara K, Nakajima N. Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. J Mol Catal B: Enzym 2003; 23: 411-417.

[27] Tamura H, Yamagami A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. J Agric Food Chem 1994; 42: 1612–5.

[28] Mellou F, Lazari D, Skaltsa H, Tselepis AD, Kolisis F.N, Stamatis H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and ntimicrobial activity. J Biotechnol 2005; 116: 295-304.

[29] Rao RJ, Tiwari A K, Kumar U S, Reddy SV, Alib AZ, Raoa JM. Novel 3-O Acyl Mesquitol Analogues as Free-Radical Scavengers and Enzyme Inhibitors: Synthesis,

Biological Evaluation and Structure–Activity Relationship. Bioorg Med Chem Lett 2003; 13: 2777-2780.

[30] Moll M, Moll N. Additifs Alimentaires et Auxiliaires Technologiques, 2nd edno.; Dunod: Paris, France, 1998; p 218.

[31] Aruoma, OI, Murcia A, Butler J. Halliwell, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. J Agric Food Chem 1993; 41: 1880-1885.

[32] Kubo I, Masuoka N, Xiao P, Haraguchi H. Antioxidantactivity of dodecyl gallate. J Agric Food Chem. 2002; 50: 3533-3539.

[33] Fujita K, Kubo I. Antifungal activity of octyl gallate. Int J Food Microbiol 2002; 79: 193-201.

[34] Kubo I, Xiao P, Fujita K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action Bioorg Med Chem. Lett 2001; 11: 347-350.

[35] Vercauteren J, Weber J-F, Bisson J-L, Bignon J. Polyphenol derivative compositions and preparation thereof. Patent. FR 2706478. 94. 12. 23.

[36] Mellou F, Loutrari H, Stamatis H, Roussos C, Kolisis FN. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. Process Biochem 2006; 41: 2029-2034.

[37] Torres de Pinedo C, Peñalver AP, Pérez-Victoria I, Rondón D, Morales JC. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. Food Chem 2007; 105: 657-665.

[38] Stevenson DE, Wibisono R, Jensen DJ, Stanley RA, Cooney JM. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435®). Enzyme Microb Technol 2006; 39: 1236-1241.

[39] Katsoura MH, Polydera AC, Katapodis P, Kolisis FN, Stamatis H. Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. Process Biochem 2007; 42: 1326-1334.

[40] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. J Mol Catal B: Enzym 2004; 29: 63-67.

[41] Danieli B, Luisetti M, Sampognaro G, Carrea G, Riva S. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. J Mol Catal B: Enzym 1997; 3: 193-201.

[42] Chebil L, Humeau C, Falcimaigne A, Engasser JM, Ghoul M. Enzymatic acylation of flavonoids. Process Biochem 2006; 41: 2237-2251.

[43] Shibano M, Kakutani K, Taniguchi1 M, Yasuda M. and Baba K. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis L.*) and their α-glucosidase-inhibitory ctivity. J Nat Med 2008; 62: 349-353.

[44] Regasini LO, Vellosa JCR, Silva DHS, Furlan M, De Oliveira OMM, Khalil M, Brunetti IL, Young MC, Barreiro M J, Bolzani VS. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. Phytochemistry 2008; 69: 1739- 744.

[45] Masuoka N, Isobe T, Kubo I. Antioxidants from *Rabdosia japonica*. Phytotherapy Res 2006; 20: 206-213.

[46] Nakajima N, Ishihara K, Itoh T, Furuya T, Hamada H. Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. J Biosci Bioeng 1999; 87: 105-107.

[47] Gao C, Mayon O, MacManus DA, Vulfson EN. Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. Biotechnol Bioeng 2001; 7: 235-43.

[48] Chebil L, Anthoni J, Humeau C, Gerardin C, Engasser JM. Ghoul M. Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity. J Agric Food Chem 2007; 55: 9496-9502.

[49] Ishihara K, Nakajima N, Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. J Mol Catal B: Enzym. 2003; 23: 411-417.

[50] Husson E, Humeau C, Blanchard F, Framboisier X, Marc I, Chevalot I. Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. J Mol Catal B: Enzym 2008; 55: 110-117.

[51] Su L, Yang J, Wang YQ, Wang GJ. Introduction and comparison of softwares used in calculating lipid/water partition coefficient of compounds. J China Pharm Univ 2008; 39 178-182.

[52] Rothwell JA, Day AJ, Morgan MRA. Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. J Agric Food Chem 2005; 53: 4355-4360.

[53] Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine-oxidase and superoxide scavengers. J Nat Prod. 1998; 61: 71-76.

[54] Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chem 2005; 89: 27-36.

[55] Maisuthisakul P, Pongsawatmanit R, Gordon MH. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum Dyer*). Food Chem 2007; 100: 1620-1629

[56] Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. Biochem Pharmacol 2006; 71: 1289-1298.

[57] Katsoura MH, Polydera AC, Tsironis L, Tselepis AD, Stamatis H. Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparationof flavonoid derivatives with antioxidant potency. J Biotechnol 2006; 123: 491-503.

[58] Kontogianni, A, Skouridou, V, Sereti, V, Stamatis H, Kolisis FN. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. Eur J Lipid sci tech 2001; 103: 655-660.

[59] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Ognier S, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. J Biotechnol 2004; 110: 265-271.

[60] Figueroa-Espinoza M-C, Villeneuve P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. J Agric Food Chem 2005; 53: 2779-2787.

[61] Takahashi N, Tamagawa K, Kubo Y, Fukui T, Wakabayashi H, Honda, T. Enhancement of antioxidant activity of p-alkylaminophenols by alkyl chain elongation. Bioorg Med Chem 2003; 11: 3255-3260.

[62] Torres de Pinedo A, Peñalver P, Pérez-Victoria I, Rondón D, Morales JC. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. Food Chem 2007; 105: 657-665.

[63] Kuoa SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. Cancer Lett 1996 110: 41-48.

[64] Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids a review. Biomed Pharmacother 2002; 56: 296-301.

[65] Boyer J, Dan B, Rui Hai L. Uptake of Quercetin and Quercetin 3-Glucoside from Whole Onion and Apple Peel Extracts by Caco-2 Cell Monolayers. J Agric Food Chem 2004; 52: 7172-7179.

[66] Kosmider B, Osiecka R. Flavonoid Compounds: A Review of Anticancer Properties and Interactions with cis-Diamminedichloroplatinum(II). Drug Dev Res 2004; 63: 200-211.

[67] Plochmann K, Korte G, Koutsilieri E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P, Scheller C. Structure–activity relationships of favonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. Arch. Biochem. Biophys 2007; 460: 1-9.

[68] Susanti D, Sirat H M, Ahmad F, Ali RM, Aimi N, Kitajima M. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of Melastoma malabathricum L. Food Chem 2007; 103: 710-716.

[69] Kodelia G, Athanasiou K, Kolisis FN. Enzymatic synthesis of butyryl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture. Appl Biochem Biotechnol 1994; 44: 205-212.

[70] Dasgupta P, Singh A, Mukherjee R. N-Terminal Acylation of Somatostatin Analog with Long Chain Fatty acids Enhances Its Stability and Anti-Proliferative Activity in Human reast Adenocarcinoma Cells Biol Pharm Bull. 2002; 25: 29-36.

3. Contribution de l'article

Cette étude a démontré la stricte régiosélectivité de la réaction d'acylation de l'isoquercitrine en présence de la CALB. En effet les analyses CCM, CLHP et CLSM ont montré qu'un seul produit monoacylé majoritaire a été obtenu dans les huit réactions réalisées, quelle que soit la longueur de chaîne du donneur d'acyle utilisé. Ces produits sont le butyrate d'isoquercitrine, le caproate d'isoquercitrine, le caprylate d'isoquercitrine, le décanoate d'isoquercitrine, le laurate d'isoquercitrine, le palmitate d'isoquercitrine, le stéarate d'isoquercitrine et l'oléate d'isoquercitrine. L'analyse RMN de ces produits montre que l'acylation a lieu au niveau de l'hydroxyle primaire du groupement glucose de l'isoquercitrine.

D'autre part, il a été montré que la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle avait un effet sur la performance de la réaction (taux de conversion de l'isoquercitrine à l'équilibre, vitesse initiale de réaction). Ainsi, les réactions impliquant des donneurs d'acyle ayant une chaîne composée de 4 à 12 carbones présentent des vitesses initiales proches : 17,8 µmol/h pour le butyrate d'éthyle (C4) et 16.5 µM pour le laurate d'éthyle (C12). En revanche, les réactions menées avec des donneurs d'acyles plus longs (plus que 12 carbones) les vitesses initiales diminuent et atteignent une valeur de l'ordre de 11 µM pour le palmitate d'éthyle (C16), le stéarate d'éthyle (C18) et l'oléate d'éthyle (C18 :1). La variation du taux de conversion a suivi le même ordre d'évolution que celui des vitesses initiales. Ainsi, l'acylation au butyrate d'éthyle (C4) a permis un taux de conversion de l'isoquercitrine de 66% qui diminue inversement à la longueur de la chaîne pour atteindre seulement 38 % lors de l'acylation avec le stéarate d'éthyle (C18).

Une fois purifiés, les esters d'isoquercitrine ont été évalués pour leurs activités antioxydantes et activité antiproliférative, dans le but d'étudier l'influence de l'acylation de l'isoquercitrine sur ses propriétés biologiques. Dans un premier temps, le pouvoir inhibiteur de l'isoquercitrine et de ses dérivés acylés vis-à-vis de l'enzyme xanthine oxydase a été évalué. Tous les esters d'isoquercitrine ont montré une activité plus importante que la molécule d'origine, l'isoquercitrine. Une relation structure activité des esters a pu être établie : l'activité des esters exprimée en CI50 augmente de manière linéaire avec le nombre

de carbone du groupement acyle des esters. Ces résultats pourraient s'expliquer par une meilleure lipophilie des esters à longue chaîne, ce qui faciliterait l'accès de ces composés au site actif de l'enzyme xanthine oxydase. Par ailleurs, la présence d'une double liaison au niveau de la chaîne carbonée de l'oléate d'isoquercitrine semble conférer à cet ester une activité supérieure à celle de son homologue saturé, le stéarate d'isoquercitrine.

En ce qui concerne le piégeage du radical superoxyde, les esters d'isoquercitrine semblent moins efficaces que l'isoquercitrine, à l'exception de l'oléate d'isoquercitrine. Toutefois, tous les esters d'isoquercitrine peuvent être considérés comme capables de piéger le radical superoxyde puisqu' ils remplissent la condition citée par Cos et al. (1998), selon laquelle une substance est capable de piéger les radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase si celle-ci présente une CI50 plus faible pour cette activité que sa CI50 d'inhibition de la xanthine oxydase.

Les tests DPPH et ABTS ont été également mis en oeuvre dans cette étude pour compléter l'évaluation de l'activité antiradicalaire des esters d'isoquercitrine et tenter d'établir une relation entre la structure de ces molécules et leur activité. Les résultats obtenus avec le test DPPH montrent que les esters sont moins actifs que l'isoquercitrine dont ils dérivent. En revanche avec le test ABTS, les esters se sont révélés plus actifs que l'isoquercitrine. Concernant l'effet de la longueur de chaîne du groupement acyle des esters sur leurs activités, une tendance similaire a été observée pour les deux tests : ainsi, les esters à courte chaîne (de C4 à C8) se montrent les plus actifs vis-à-vis des radicaux ABTS et DPPH. Pour ces composés l'activité antiradicalaire est inversement proportionnelle au nombre de carbone. Les esters ayant des chaînes plus longues (de C10 à C18) présentent des activités similaires, plus faibles que leurs homologues à courte chaîne.

Enfin l'étude de l'activité antiproliférative de l'isoquercitrine et de ses esters a montré que l'acylation améliore d'une façon significative l'activité de l'isoquercitrine quel que soit le nombre de carbone de la chaîne acyle. Aucune relation n'a pu toutefois être établie entre la structure des esters et leur activité. Cette absence de corrélation peut s'expliquer par le fait que la lipophilie d'une molécule et donc sa capacité à être transférée à travers les membranes cellulaires, n'est pas un critère suffisant pour justifier son activité antiproliférative. D'autres facteurs doivent être pris en compte tels que l'affinité de la molécule avec les récepteurs membranaires.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que l'acylation de l'isoquercitrine peut être un moyen d'améliorer certaines de ses propriétés biologiques, tout en augmentant ses propriétés de solubilité et de stabilité. Ceci peut constituer une avancée prometteuse pour la découverte de nouvelles substances thérapeutiques ou cosmétiques.

4. Complément de résultats :

Activités antiprolifératives de l'isoquercitrine et de ses esters vis-à-vis de cellules normales HUVEC

Un des obstacles majeurs à la réussite d'un traitement contre le cancer réside dans la toxicité des molécules thérapeutiques à l'égard des tissus normaux. Il est nécessaire afin d'évaluer l'efficacité d'un médicament anticancéreux de déterminer si celui-ci présente une éventuelle toxicité sur les cellules normales.

Dans ce contexte, et étant donnée l'activité antiproliférative présentée par les différents flavonoïdes et esters de flavonoïdes utilisés dans cette étude vis-à-vis de cellules cancéreuses de colon humain (lignée Caco2), une étude complémentaire sur la toxicité de ces mêmes molécules vis-à-vis de cellules normales nous a parue importante afin d'évaluer leur sélectivité.

Afin de réaliser cette étude, des cellules saines de cordon ombilical humain, des cellules HUVEC, ont été utilisées. L'intérêt de mener des expériences sur ce type de cellules saines réside dans le fait que ce sont des cellules sanguines : par conséquent, celles-ci sont en contact permanent avec les molécules circulant dans le sang après passage de la barrière intestinale ou gastrique.

Les esters d'isoquercitrine ont montré une activité cytotoxique plus importante vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2 que celle de l'isoquercitrine. La cytotoxicité de ces mêmes esters a été évaluée vis-à-vis des cellules normales HUVEC et les résultats sont présentés dans la figure 64 et comparés avec ceux obtenus avec des cellules Caco2 (figure 65).

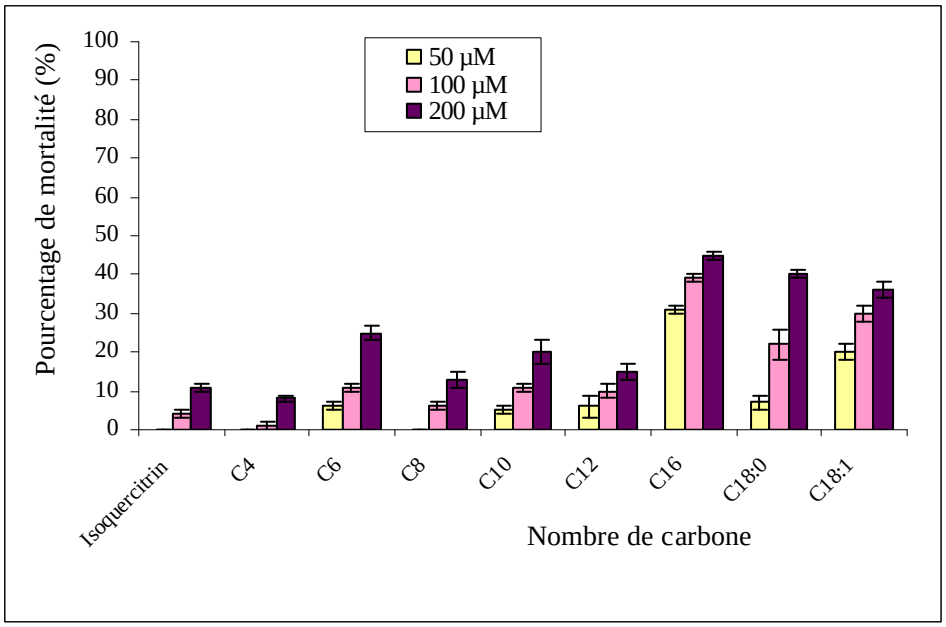


Figure 64: Pourcentage de mortalité de cellules HUVEC déterminé par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isoquercitrine et de ses esters : 50, 100 et 200 µM. Tous les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type (SD) (n=4)

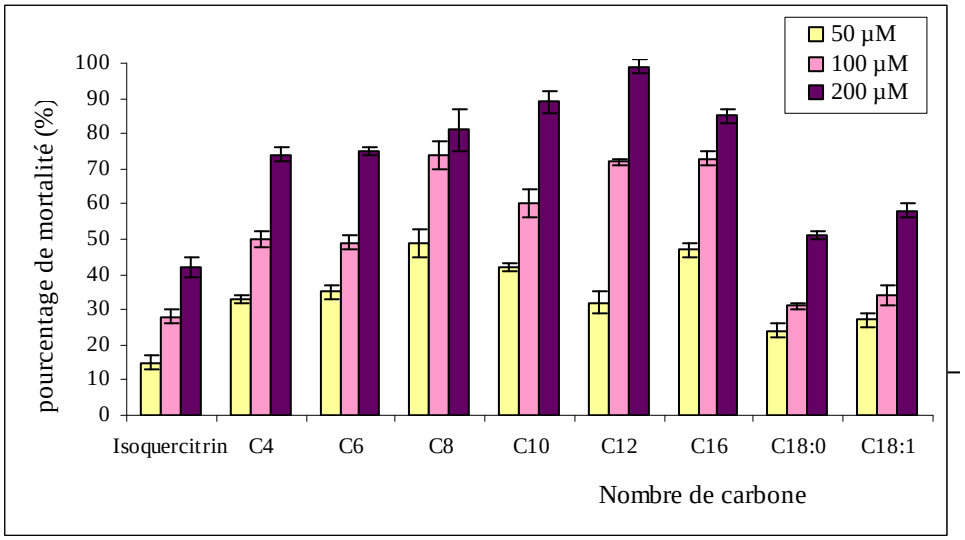


Figure 65: Pourcentage de mortalité de cellules Caco2 déterminé par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isoquercitrine et de ses esters : 50, 100 et 200 µM. Tous les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type (SD) (n=4)

Ces résultats montrent que l'isoquercitrine et ses dérivés esters présentent une activité antiproliférative dose dépendante vis-à-vis des cellules HUVEC.

Les esters à longue chaîne (C16, C18 :0 et C18 :1) sont les plus cytotoxiques vis-à-vis des cellules HUVEC. En effet, le palmitate d'isoquercitrine, l'oléate d'isoquercitrine et le stéarate d'isoquercitrine présentent des pourcentages de mortalité de 45, 39 et 31 % pour le

palmitate d'isoquercitrine, de 36, 30, et 20 % pour l'oléate d'isoquercitrine et de 40, 22 et 7 % pour le stéarate d'isoquercitrine aux doses de 200, 100 et 50 µM respectivement. Cependant, les esters en C18 sont les moins actifs vis-à-vis des cellules Caco2 avec des pourcentages de 58, 34 et 27 % pour l'oléate d'isoquercitrine et 51, 40 et 24 % pour le stéarate d'isoquercitrine à 200, 100 et 50 µM respectivement (figure 65). Le palmitate d'isoquercitrine, quant à lui, présente une activité antiproliférative similaire aux autres esters. Au vu des ces résultats, les dérivés à longue chaîne semblent peu intéressants d'un point de vue sélectivité.

Les esters à courte chaîne (C4 à C12), quant à eux, présentent une faible cytotoxicité, proche de celle de l'isoquercitrine vis-à-vis des cellules HUVEC. En revanche, leur activité antiproliférative est importante vis-à-vis des cellules Caco2 : ceci semble indiquer une probable sélectivité à l'égard des cellules cancéreuses.

En conclusion, les résultats préliminaires obtenus au cours de cette étude ne permettent pas d'établir une relation directe entre la longueur de chaîne des esters d'isoquercitrine et leur sélectivité vis-à-vis de cellules cancéreuses. Ces observations suggèrent l'existence probable d'autres facteurs inhérents à la molécule voire à la cellule (lipophilie de la molécule, structure membranaire et présence de récepteurs spécifiques…) pour expliquer les différentes activités constatées.

CHAPITRE V : VALORISATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOIDES DE *NITRARIA RETUSA* ET DE LEURS DERIVES ACYLES

1. Introduction

Notre étude vise à valoriser une espèce végétale qui pousse en Tunisie, *Nitraria retusa,* à déterminer les principes actifs présents dans cette plante et à évaluer certaines de leurs activités biologiques.

Dans ce but, différents extraits ont été préparés à partir de feuilles de cette plante et leur contenu en flavonoïdes a été déterminé, comme décrit dans le chapitre I. L'extrait aqueux et l'extrait au méthanol sont les plus riches en flavonoïdes. C'est pourquoi des extractions ou fractionnements complémentaires de ces deux extraits ont été réalisés et les flavonoïdes présents identifiés.

Une éventuelle corrélation entre les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux de ces extraits et fractions et leurs activités (antiradicalaires, inhibition de la xanthine oxydase et cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuse Caco2) a été recherchée. Une comparaison avec différents flavonoïdes standard, de structure analogue à ceux présents dans les extraits / fractions a été entreprise afin de rechercher des liens entre la structure des molécules et leurs activités.

En se basant sur les résultats du chapitre II, montrant l'efficacité de l'acylation de l'isoquercitrine pour accroître certaines activités biologiques (piégeage des radicaux DPPH, inhibition de la xanthine oxydase et activité antiproliférative), l'acylation enzymatique de l'isorhamnétine-3-O-glucoside, analogue structural de l'isoquercitrine présentant un groupement méthoxy en position C3', par la lipase B de *Candida antarctica* a été entreprise. Le laurate d'éthyle et le butyrate d'éthyle ont été choisis comme donneurs de groupement acyle : ce choix prend en compte l'efficacité de la réaction d'acylation favorisée par les plus courtes chaînes et les activités des esters qui sont meilleures pour les longues chaines. Parmi les esters à longue chaîne, le laurate présente le meilleur compromis entre une bonne activité biologique et une faible cytotoxicité vis-à-vis de cellules saines.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le projet de publication, dans food Chemistry, suivant :

2. Antioxidant and antitumoral activities of flavonoids from *Nitraria retusa* and their acylated derivatives

Hadj Salem J.[a], Chevalot I.[a], Harscoat C.[a], Paris C[b]., Fick M[a]., Humeau C.[b]

[a]*LSGC, Nancy Université, CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[b]
LIBIO, Nancy Université, 2 avenue de la forêt de Haye-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Projet de publication – Food chemistry

Abstract

The antioxidant, radical scavenging and antiproliferative towards Caco2 cells activities of water and methanol extracts/fractions from *N. retusa* were investigated. The total phenolic and flavonoid contents of the extracts/fractions were determined and the four major flavonoids were identified as isorhamnetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-robinobioside. Results showed a relationship between extracts/fractions activities and their flavonoid contents. Moreover, the chloroform extract which was enriched with the aglycone flavonoid isorhamnetin exhibited the highest activities. Activities of purified *N. retusa* flavonoids were compared to those of model flavonoids, quercetin, isoquercitrin and rutin. In all cases, aglycone compounds were more active than their glycosylated derivatives. Isorhamnetin-based flavonoids presented higher antiproliferative activities than quercetin-based ones, while similar antioxidant properties were observed. The enzymatic acylation of isorhamnetin-3-O-glucoside with ethyl laurate and ethyl butyrate enhanced its xanthine oxidase and antiproliferative activities but decreased its radical scavenging activities.

KEYWORDS: *Nitraria retusa* flavonoids; enzymatic acylation; flavonoid esters; antioxidant activity; antiproliferative activity

* Corresponding author. Tel.: + 33 3 83 59 57 84; Fax: + 33 3 83 59 58 04

E-mail address: catherine.humeau@ensaia.inpl-nancy.fr

1. Introduction

For several years, numerous studies reported the interest of natural substances exhibiting antioxidant properties that can be supplied as food additives or as specific preventive pharmaceuticals. Phenolic antioxidants which are commonly found in various fruits, vegetables and herbs as secondary metabolites have been shown to prevent and limit damages due to oxidative stress (Matkowski and Piotrowska, 2006). Many herbal infusions, frequently used as home medicines, exhibit antioxidative and some other biological activities related to the presence of phenolic compounds like flavonoids. The daily consumption of such compounds is expected to limit the risk factors to develop certain diseases, including cancers, cardio- and cerebro-vascular diseases (Martin, Andriambeloson, Takeda, and Andriantsitohaina, 2002). In fact most polyphenols are able not only to scavenge radicals thus inhibiting oxidative mechanisms initiation and breaking chain propagation reactions but also to limit the formation of free radicals by binding to metal ions, reducing hydrogen peroxide, and quenching superoxide and singlet oxygen. As radical species are many often involved in previously mentioned diseases, polyphenols may constitute potential therapeutic or preventive active compounds.

Many studies reported the potential anticancer effects such as antiproliferation, cell cycle arrest and/or apoptosis of individual polyphenols or crude extracts of plants on cancer cells (Loa, Chow and Zhang, 2009; Pierini Pierini, Gee, Belshaw and Johnson, 2008).

Due to their biological activities, the use of flavonoids in pharmaceutical and food preparations seems to be very attractive (Böhm, Boeing, Hempel, Raab and Kroke, 1998). However, the efficiency of these compounds can be strongly limited by their low solubility and stability in lipidic matrices or lipophilic media. Therefore, the preparation of lipophilic derivatives of flavonoids obtained by acylating some of their hydroxyl groups with aliphatic molecules can be used as a way to change their physicochemical properties and solubility in oil based systems and emulsions increasing their efficiency in stabilizing fats, oils and lipophilic formulations. Moreover, the regioselective acylation of these polyhydroxylated compounds is expected to improve some of their biological activities by enhancing their ability to be transferred through the cell membrane (Mellou, Lazari, Skaltsa, Tselepis, Kolisis and Stamatis, 2005).

Nitraria retusa is one of the native perennial species that belong to the botanical family *Nitrariaceae*. This salt-tolerant and drought-resistant shrub grows along shallow sand hummocks on saline grounds near the coastal areas and produces fleshy red fruits from which a tasty and refreshing juice may be extracted. This plant is also used in traditional medicine in Tunisia and other countries like Egypt. The dry leaves are used in decoction as a substitute to tea and to make cataplasms. Ashes of this plant have the property to withdraw liquids (blood, lymph) of the infected wounds (Shaltout, ,Sheded and and El-Kady and Al-Sodany, 2003).

In a previous chemosystematic investigation, the flavonoids contained in *N. retusa* leaves were studied and six isorhamnetin glycosides (isorhamnetin 3-robinobioside, isorhamnetin 3-rutinoside, isorhamnetin-3-O-galactoside, isorhamnetin-3-O- glucoside, isorhamnetin 3-xylosylrobinobioside and isorhamnetin-3-O-4Rham-galactosylrobinobioside) and free isorhamnetin were identified (Halim, Saad and Hashish, 1995).

In the present study, various processes of extraction and fractionation were performed on *Nitraria retusa* leaves in aqueous or organic solvents. Then the total polyphenols and flavonoids contents of extracts and fractions were determined and their antioxidant activities were evaluated through in vitro assays, including xanthine oxidase inhibition, superoxide radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging. Their antiproliferative activity against Caco2 cells was evaluated. Major flavonoids present in these extracts/fractions were identified as isorhamnetin-based flavonoids; their activities were determined and compared to those of widespread and highly available flavonoids.

In the second part of this work, the enzymatic synthesis of acylated derivatives of one particular flavonoid that was identified in leaves extracts/fractions was studied and the influence of their structure on their antioxidant and antiproliferative activities was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Nitraria retusa was collected from the saline of Sahline (Gouvernorat of Monastir) in the central Tunisia (Pottier-Alapetite, 1978).

The leaves were shade air-dried at 25°C for two weeks, powdered with a moulinex mixer for 15 min and kept in dry and dark storage conditions at 25°C.

2.2. Chemicals

Standards of flavonoids; quercetin, isoquercitrin, rutin, isorhamnetin, isorhamnetin-3-O glucoside and isorhamnetin-3-O-rutinoside were obtained from Extrasynthese (France). Ethyl laurate (99%) was purchased from Sigma (Germany). ethyl butyrate (> 98 %) was purchased from Fluka (Switzerland). 2-Methyl-2-butanol, hexane, acetic acid, methanol, chloroform, n-butanol, acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) with 99 % of purity were acquired from Carlo Erba (Spain). Ethyl acetate was from Fisher scientific (UK).

2.3. Preparation of plant extracts

2.3.1. Soxhlet apparatus extracts

The fresh aerial parts of *Nitraria retusa* were dried at room temperature and reduced to coarse powder. 100 g of the powder were extracted with a soxhlet apparatus through the sequential use of hexane, chloroform, ethyl acetate, and methanol as solvents. The yields were respectively 3% (w/w), 2% (w/w), 0.4% (w/w) and 19% (w/w). In this study only the MeOH extract (LME) was used for further experiments.

2.3.2. Aqueous extraction

The powdered aerial parts of *Nitraria retusa* were extracted with boiling water for 15 to 20 mn. After filtration the extract was freeze dried.

This aqueous extract was used to prepare two methanolic extracts. The first one was obtained by extraction for 8h with a soxhlet apparatus (soxMAE), using methanol as solvent. The second one was obtained by maceration of the aqueous extract in methanol (MMAE) for 2 h. Both extractions were released at 65°C.

2.3.3. Preparation of methanol fractions by liquid-liquid extraction

The dried methanol extract (LME), was dissolved in water and then successively exhausted with solvents of increasing polarity, chloroform, ethyl acetate and n-butanol. Then solvents were evaporated under vacuum and dried fractions were kept in a dry and dark place.

2.4. Determination of total phenolic compounds content in *N.retusa* extracts and fractions

Total phenolic compound contents were determined by the Folin-Ciocalteau method (Ordoñez, Gomez, Vattuone and Isla, 2006). The extract samples (0.5 mL) were mixed with 2.5 mL of 0.2 N Folin-Ciocalteau reagent (Sigma–Aldrich) for 5 min. Then 2.0 mL of a 75

g/L sodium carbonate solution were added. Absorbance was measured at 760 nm after 2 h of incubation at room temperature. Results were expressed as gallic acid equivalents.

2.5. Determination of total flavonoids compounds content in *N.retusa* extracts and fractions

Total flavonoids were estimated using the method of Ordoñez, Gomez, Vattuone and Isla, (2006). To 0.5 mLof sample, 0.5 mL of a 2% $AlCl_3$ ethanol solution was added. After 1 h at room temperature, absorbance was measured at 420 nm. Total flavonoid contents were calculated as quercetin equivalents from a calibration curve.

2.6. Identification of flavonoids of *Nitraria retusa* extracts/fractions by LC-ESI-MS^n.

After dilution of the reaction medium in the mobile phase and filtration, samples were analyzed using a HPLC system (Thermo Fisher Scientific, France) equipped with a UV detector (214 nm) coupled to a mass spectrometer with electron spray (ES) ionization source (LTQ, Thermo electron corporation®, USA). The column was a TSKGel Amide 80 newly developed C18 amide 125 x 2.1 mm – 5 µm (Altima®, Alltech, France) maintained at 25 °C. The mobile phase (0.2 mL/min flow rate) consisted initially in methanol/water/TFA (40/60/0.1 v/v/v). A linear elution gradient was applied to reach methanol/TFA (100/0.1 v/v) after 15 min. This methanol concentration was maintained for 8 minutes and decreased in 1 min to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (i.e. 34 min).

MS measurements were carried out with helium as the collision gas in the ion trap and nitrogen as sheath (50), sweep (10) and auxiliary (10) gas in the source. MS parameters were tuned as follows: electrospray positive ionization mode, capillary temperature of 300 °C, source voltage at 5.0 kV.

2.7. Synthesis of isorhamnetin-3-O-glucoside esters

The enzymatic synthesis of isorhamnetin-3-O-glucoside esters was performed in the glass device of a rotavapor equipped with a vacuum controller. The reaction medium was kept at 60°C and stirred at 150 rpm under vacuum (500 mbar). Each reaction was performed using isorhamnetin-3-O-glucoside (5 mM) (Extrasynthèse, France) in 5 mL of 2-methyl-2-butanol previously dried on 4Å molecular sieves and 50 mM acyl donor; ethyl laurate or ethyl butyrate. After complete dissolution of the substrates (65°C, under stirring overnight), the esterification reaction was started by adding 30 g/L of the lipase B from *Candida antarctica* immobilized on an acrylic resin (CALB, Novozym 435®). This enzyme presents a propyl

laurate synthesis activity of 7000 PLU.g^{-1} and a protein grade of [1-10 %] (Novo Nordisk A/S, Denmark). To evaluate the evaporation of the solvent during reactions, an internal inert standard was used (2, 6-dimethylphenol at 0.2 g/L) (35)**.** Reactions were stopped after 72 h by removing the enzyme by filtration.

The time course of each reaction was monitored by HPLC (LC 10 AD – VP, Shimadzu, France). Residual substrates and products were detected with an UV detector (254 nm) and a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France). The conditions used were as described before in 2.7 section but with a flow rate of 0.2 mL/min. Calibrations were performed using standard substrates. The substrate conversion yield at the thermodynamic equilibrium was determined using the following equation:

$$Y\ (\%) = (1 - ([substrate]_{equilibrium} / [substrate]_{initial})) \times 100$$

Initial specific reaction rates were estimated as the slope of the linear approximation during the two first hours of reaction. The variation coefficient of reproducibility for both substrate conversion rates and initial reaction rates was found to be inferior to 10%.

2.8. Purification and identification of acylated products

After elimination of the enzyme, the reaction medium was concentrated by the partial evaporation of the solvent and then deposited on a TLC plate coated with Kieselgel 60. The mixture was developed with ethyl acetate/ methanol/ water (100:8:7, v/v/v). A short portion of the migration band containing the isorhamnetin-3-O-glucoside esters was detected by spraying a NEU reagent solution. The silica was collected and products were solubilized in methanol. Silica was eliminated by filtration and methanol was evaporated under reduced pressure.

The presence of esters was checked by mass spectrometry with ESI source (SCIEX API 150EX, Perkin Elmer, France) in the infusion mode.

2.9. Biological activities of *N. retusa* flavonoids

2.9.1. Xanthine oxidase inhibition assay

Xanthine oxidase inhibition activity was evaluated by the slightly modified method of Cos et al. (1998), which consists in the spectrophotometric monitoring of the formation of uric acid from xanthine. Sample was dissolved in a small amount of DMSO (5%) and diluted with buffer (200 mM, pH 7.8). Test solutions were prepared by adding xanthine (50 µM) (Sigma, Germany), hydroxylamine (0.2 mM), EDTA (0.1 mM), and sample in various concentrations. The reaction was started by adding 2.5 mU/mLxanthine oxidase (Sigma, Germany) in a

phosphate buffer solution (pH 7.8, 200 mM). The mixture (2 mL) was incubated for 30 min, at 37 °C, and then the reaction was stopped by adding 0.2 mL of HCl (0.58 M). The absorbance of the mixture was measured at 290 nm. The uric acid production was calculated from the differential absorbance with a blank solution without xanthine oxidase. A test mixture containing no sample was prepared to determine the total uric acid production. Allopurinol was used as standard for comparison. All tests were carried out in triplicate. Results were expressed as mean values with standard deviations (± SD).

2.9.2. Superoxide scavenging activity

To evaluate the superoxide scavenging activity of the extracts, the colouring reagent (300 µg/mL sulfanilic acid, 5 µg/mL N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride and 16.7% (v/v) acetic acid) was added to the reaction medium used for the determination of the xanthine oxidase inhibition activity. The mixture stood for 30 min at 25 °C then the absorbance at 550 nm was measured. The test was performed for various concentrations sample used in the xanthine and then the half-maximal scavenging concentrations (SC50), for each compound, were calculated by linear regression analysis (Cos et al.,1998).

2.9.3. DPPH test

Determination of the antioxidant activity with the stable radical 2,2-diphenyl-l-picrylhydrazyl (DPPH.-) (Sigma, Germany) radical scavenging method was performed.

The ability to scavenge the DPPH.- free radical was determined according to the method of Atoui, Mansouri, Boskou and Kefalas (2005). A methanolic solution (50 µL) of the compound to be tested was prepared at four different concentrations and added to 1.95 mL of DPPH solution (6x10-5 M in methanol). The mixture was vigorously shacked with a vortex mixer and incubated for 30 min in obscurity, then the decrease in the absorbance corresponding to the remaining DPPH.- was measured at 517 nm. Methanol was used as a blank solution. DPPH solution in methanol without any tested compound was used as control. All analyses were carried out in triplicate and results represented the mean values with standard deviation. The antioxidant activities of compounds were expressed as SC50.

2.9.4. Antiproliferative activity

2.9.4.1. Cell culture

Caco2 cells were kindly provided by the laboratory URAFPA (Nancy, France). These cells were used between passages 30 and 50 and were cultivated in Dulbecco’s modified eagle

medium (DMEM) with high glucose (4.5 g/L), (Sigma, Germany) and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), (EuroBio, France), 2 mM L-glutamine and 1% nonessential aminoacids (GIBCO, USA). The cells were usually split when reaching confluence (5-7 days). They were first rinsed with Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium (D-PBS) (Sigma, Germany) and then trypsinized with a solution containing 0.25% trypsin and 1 mM EDTA (GIBCO, USA). For maintenance of the cell line, cells were seeded at 2x104 cells/cm2 in flasks.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK) and cultivated in Endothelial Basal Medium (Sigma, Germany). The medium was prepared by addition of the growth supplement. HUVEC cells were cultivated between passages 1 and 5.

2.9.4.2. MTT test

Caco2 or HUVEC cells were seeded into 96-well microplates at 104 cells per well in 200 µL of appropriate culture medium. After 24 h, cells were exposed to various concentrations of the compounds solubilized in DMSO (final concentration of DMSO did not exceed 1 %) and incubated for 48 h at 37°C, under 5% CO2 atmosphere. The cytotoxicity of isoquercitrin and its esters was determined using the colorimetric methylthiazoletetrazolium method based on the reduction of the tetrazolium salt, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-y)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Germany) into a crystalline blue formazan product by the mitochondrial oxidoreductases of viable cells. 50 µL of MTT solution (2g/L) was added to each well. After incubation for 4h at 37°C, the formazan crystals produced by active reductase were dissolved in 150 µL isopropanol. The product was quantified spectrophotometrically by absorbance measurement at 540 nm using a microplate reader. Each test was carried out in quadruplicate, and each experiment was repeated twice. Results were expressed as IC50 mean values with the standard deviations. IC50 was defined as the concentration of a molecule leading to 50 % cell mortality.

3. Results and discussion

3.1 Extraction and extracts/fractions analyses

The different methods used for *Nitraria retusa* dry leave extractions are presented in figure 1.

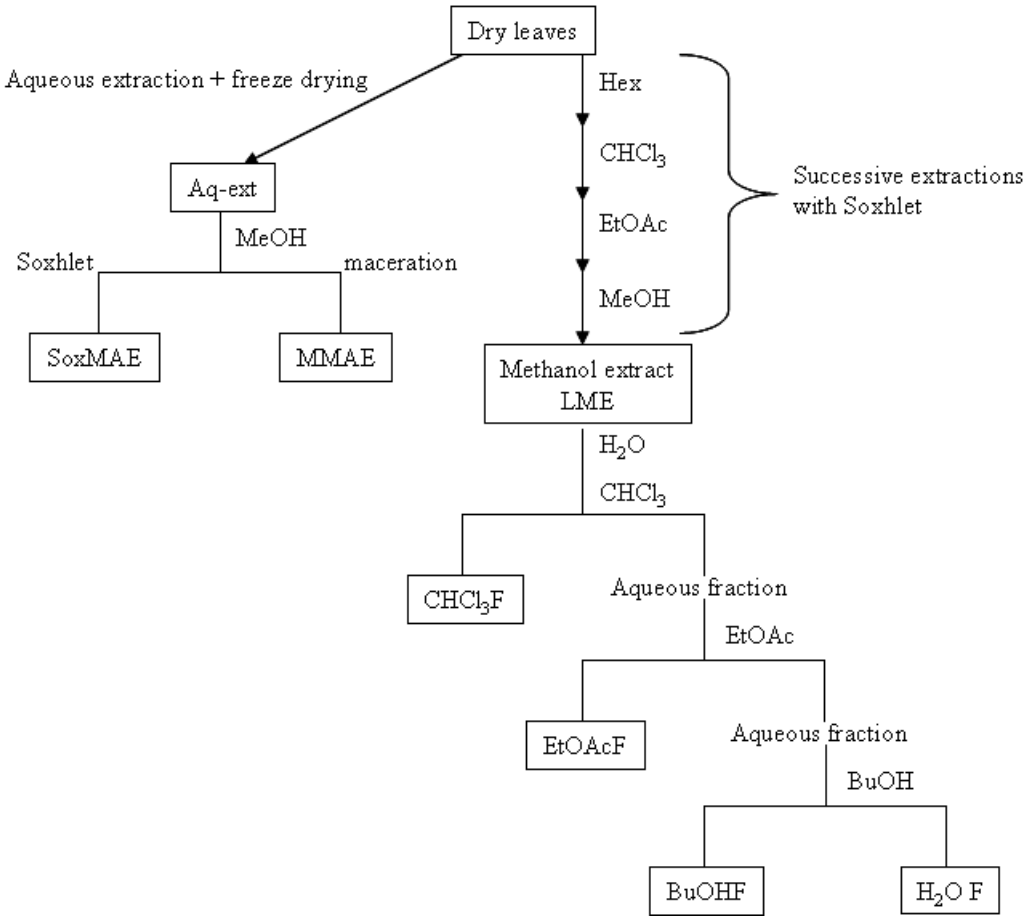


Figure 1: Preparation of extracts and fractions of *N. retusa*

Decoction was used to prepare aqueous extract. Four extractions were performed with Soxhlet apparatus using increasing polarity solvents: hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Extraction yields, phenols and flavonoids content are presented in table 1. Water extraction led to the highest extract yield (19 % of dry leaves weight). The methanol extract was obtained with the highest efficiency (18% of dry leaves weight). TLC and HPLC analyses showed that less polar solvents chloroform and hexane did not allow flavonoids extraction (data not shown). Only methanol and ethyl acetate extracts exhibited significant flavonoids content. As low extraction yield was obtained with ethyl acetate solvent (0.4%), methanol extract (LME) and aqueous extract were used for further extractions.

Fractionation of LME led to four fractions: CHCl3F, EtOAcF, BuOHF and H_2O fractions with 0.6, 0.6, 3 and 16 % of dry leaves weight respectively. Dry aqueous extract was extracted with methanol using two methods: soxhlet extraction (SoxMAE) and maceration (MMAE) to compare the extraction efficiency of polyphenols and flavonoids. The SoxMAE

was obtained with a slight higher yield of 9.5 % in comparison with MMAE (7.6 % of dry leaves weight).

Table 1: Extraction yields, total flavonoid and phenolic compound contents of extracts and fractions of *N. retusa.*

	Extraction yields	Total flavonoids	Total phenolic compounds
	(% of dry leaves weight)	mg equivalent quercetin / g dry matter	mg equivalent gallic acid / g dry matter
Aq-ext	19	11	30
MMAE	7.6	15	43
SoxMAE	9.5	19	48
LME	18	29	46
BuOHF	3	53	140
EtOAcF	0.6	60	170
$CHCl_3F$	0.6	18	100
H_2OF	14	5	20

As most antioxidant activities from plant sources derive from phenolic-type compounds (Bravo, 1998), extracts were analyzed for total phenolic and flavonoid content (table 1). LME extract exhibited the most important quantity of flavonoids compounds followed by SoxMAE, MMAE and aq-ext extracts. The highest content of total polyphenol compounds was recorded in the SoxMAE with 48 mg equivalent gallic acid/g of dry matter whereas polyphenol compound contents of LME, MMAE and aq-ext were 46, 43 and 30 mg equivalent gallic acid/g of dry matter respectively.

Among LME fractions, EtOAcF showed the highest flavonoids and polyphenolic compounds contents with 60 mg equivalent quercetin and 170 mg equivalent gallic acid/ g of dry matter. H_2OF that was successively exhausted by three solvents (chloroform, ethyl acetate, butanol) exhibited the lowest flavonoid and polyphenolic compounds with 5 mg equivalent quercetin and 20 mg equivalent gallic acid/ g of dry matter.

To our knowledge, this study is the first one to determine the total flavonoid and polyphenol contents of specie from *Nitraria* genus.

3.2. Biological activities of *N. retusa* extracts and fractions

Extracts and fractions from leaves of *N. retusa* were investigated for their antioxidant and antiproliferative activities.

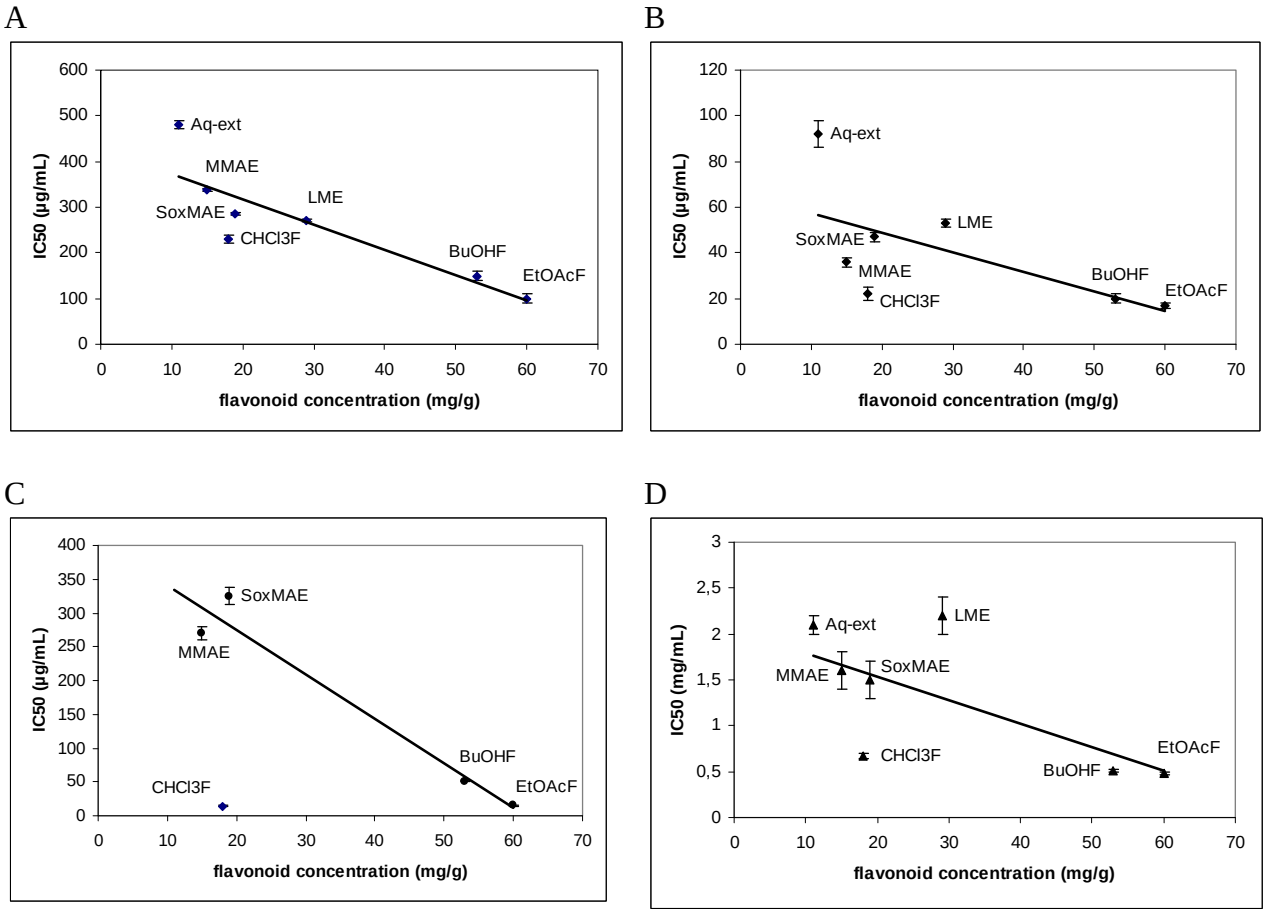


Figure 2: Correlation between total flavonoid content and DPPH IC50 (A), superoxide IC50 (B), xanthine oxidase IC50 (C) and antiproliferative IC50 (D).

3.2.1. Xanthine oxidase inhibition

The ability of the various extracts and fractions to inhibit xanthine oxidase has been evaluated. Results were expressed in terms of IC 50. Some IC50 values could not be determined, since the highest concentrations tested did not lead to inhibitions as high as 50%. Thus, leaves methanol extract (LME) and aqueous extract (Aq-ext) presented IC50 values over 400 µg/mL and, for H_2O fraction, it was higher than 100 µg/mL. For the other extracts/fractions, the IC50 values were plotted versus the flavonoid content. As can be seen

in figure 2C, the rough trend of that plotting is: the higher the flavonoid content, the lower the IC 50 value. That trend was based on results of SoxMAE, MMAE, BuOHF and EtOAcF. Indeed, for SoxMAE and MMAE which contained few flavonoids (15-19 mg eq. quercetin/g dry matter), IC 50 values were close to 300 µg/mL, whereas for BuOHF and EtOAcF (53-60 mg eq. quercetin/g dry matter), IC 50 values were 51 and 15 µg/mL respectively. Fractions exhibiting high phenolic compounds contents (table 1) were the most active; however, this explanation was not sufficient to explain the high $CHCl_3F$ activity that could be due to its high content in a particular aglycone flavonoid, isorhamnetin. Indeed, few studies already reported that a higher activity was observed for aglycone flavonoids compared with their glycosylated derivatives (Cos et al.,1998, Nagao., Seki & Kobayashi, 1999).

Figure 2 C shows that the xanthine oxidase inhibition activity could be linked not only to the flavonoid and phenolic compound contents of the sample, but also to the nature of these compounds, and eventually to the presence of other type of molecules. In fact, some authors reported the possible synergism between polyphenolic compounds and other components present in an extract, may contribute to its overall antioxidant activity (Shahidi, Wanasundara and Amarowicz, 1994, Ordoñez, Gomez, Vattuone and Isla, 2006).

3.2.2. Superoxide scavenging activity

A substance can be considered as a superoxide scavenger when its IC50 value for reduction of the superoxide radical is lower than its IC50 value determined for XO inhibition (Cos et al., 1998).

The ability of the various extracts and fractions of *Nitraria retusa* to inhibit the superoxide radicals generated by xanthine oxidase was studied. All extracts were shown to be more efficient scavengers of superoxide than xanthine oxidase inhibitors. Indeed, the IC50 values of superoxide scavenging activity were significantly lower than the IC50 of xanthine oxidase inhibition, ranging from 36 µg/mL for SoxMAE to 92 µg/mL for aqueous extract. LME and MMAE extracts showed intermediate IC50 values of 53 and 47 µg/mL. Concerning the various fractions, only BuOHF exhibited a scavenging activity toward superoxide radicals generated by xanthine oxidase with IC50 values of 20 µg/mL. Ethyl acetate and chloroform fractions inhibited xanthine oxidase but did not show additional superoxide scavenging activity. When these IC50 values were plotted versus the flavonoid concentration of the various samples (figure 2B), a global trend could be pointed out: the IC50 value decreased when this concentration increased. The low activity of the Aq-ext may be due to the presence

of numerous compounds depleted in antioxidant activity. The two different extractions with methanol from this extract led to the concentration of active molecules.

The relation between superoxide scavenging activity and polyphenol contents was demonstrated by many authors in the case of others plants. Hsu, Houng, Chang, Wu, Chang and Wu (2005) showed that scavenging activity of *Glossogyne tenuifolia* fractions depended on their polyphenol contents. Ethyl acetate fraction was the most efficient to scavenge superoxide radical with an IC50 value of 25.4 µg/mL that was similar to the IC50 value determined in the present study.

Radical scavenging activities of *Bidens pilosa* extracts were studied by Chiang, Chuang, Wang, Kuo, Tsai and Shyur (2004). These authors found the following order of activities: butanol fraction (IC50=11.43 µg/mL) > ethyl acetate fraction (IC50=59.73 µg/mL) > total crude extract (IC50=98.25 µg/mL) and water fraction (IC50>100 µg/mL).

3.2.3. DPPH scavenging activity

N. retusa extracts and fractions were further evaluated for their ability to quentch the DPPH stable free radical. Concerning the extracts, the IC50 values ranged from 271 to 481 µg/ mL and the highest scavenging activity (271 µg/mL) was found for LME. Then, all fractions from LME were more active with IC50 values between 100 and 230 µg/mL. EtOAcF was found to be the most active fraction (IC50 = 100 µM). Figure 2.A. presents the evolution of IC50 values versus the flavonoid contents of extracts and fractions. It shows that the radical scavenging activity of extracts and fractions of *Nitraria retusa* depended on their flavonoid compounds concentration. These results were in accordance with that found by several authors who reported a correlation between polyphenols contents and extracts radical scavenging activity and a higher activity for the ethyl acetate fraction (Hsu, Houng, Chang, Wu, Chang and Wu , 2005; Ordonez et al.,2006).

3.2.4. Antiproliferative activity

Antiproliferative activity of *N. retusa* extracts and fractions towards Caco2 cells was screened. All extracts reduced growth of Caco2 cells with similar IC50 values (1.5 mg/ mL to 2.2 mg/mL).

LME organic solvents fractions were shown to be four time more active than this extract. The fractions activities were dependent on total flavonoid and polyphenol compound contents: EtOAcF showed the lowest IC50 value (0.48 mg/mL) followed by BuOHF and $CHCl_3F$ that presented IC50 values of 0.51 and 0.67 mg/mL, respectively. These values were plotted

versus the total flavonoid contents of the various extracts/fractions (figure 2.D.). A good correlation between antiproliferative activities of Aq-ext, SoxMAE, MMAE, EtOAcF and BuOHF and their flavonoid compounds contents could be established. The most concentrated extracts/fractions were the most active. However, that trend was not followed by $CHCl_3F$ which exhibited a higher activity than other extracts of similar flavonoid content. Once more, this result can be explained by its high content of phenols and/or isorhamnetin. Conversely, LME was less active than expected considering its flavonoid content.

Other studies also reported that EtOAc fractions from various plants exhibited the highest antiproliferative activities towards different cell lines (Yu, Chen and Chen, 2007; Hsu, Houng, Chang, Wu, Cang & Wu, 2005).

3.3. Identification of flavonoids of *Nitraria retusa* active fractions

The most active fractions were analysed by LC-MS^n to identify their flavonoid content. Four major flavonoids were identified as isorhamnetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-robinobioside. Isorhamnetin was only present in a significant amount in $CHCl_3F$ which contained a very low quantities of isorhamnetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-robinobioside (these two isomers were detected as a double peak in chromatography). On the contrary, EtOAcF and BuOHF presented high isorhamnetin-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-robinobioside contents, few isorhamnetin-3-O-glucoside and no isorhamnetin.

This result is consistent with that of Halim, Saad, Hashish (1995), who identified seven isorhamnetin-based flavonoids in *Nitraria retusa.*

3.4. Biological activities of *N. retusa* flavonoids

Major flavonoids present in active fraction/extracts were identified as isorhamnetin and three glycosylated flavonoids derivatives corresponding to isorhamnetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-robinobioside. Their antioxidant, radical scavenging and antiproliferative activities against Caco2 cancer cells were determined and compared with those of other model flavonoids

Table 2: IC50 values of *N. retusa* flavonoids, structural analogues and reference molecules for DPPH and superoxide scavenging, xanthine oxidase inhibition and antiproliferative activity.

	DPPH scavenging	Superoxide scavenging	Xanthine oxidase inhibition	Antiproliferative activity
	IC 50 ± SD (µM)	IC50 ± SD (µM)	IC50 ± SD (µM)	IC50 ± SD (µM)
Quercetin	5.3 ± 0.04	3.0 ± 0.2	5.3 ± 0.1	80 ± 2
Rutin	5.5 ± 0.02	20 ± 2.0	129.0 ± 11.0	> 200
Isoquercitrin	5.6 ± 0.02	17.5 ± 0.7	183.0 ± 9.0	> 200
Isorhamnetin	12.1 ± 0.40	3.0 ± 0.3	6.0 ± 0.3	47 ± 1
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	21.3 ± 1.00	24 ± 1.0	102.0 ± 4.0	70 ± 2
Isorhamnetin-3-O-glucoside	31.3 ± 0.70	41 ± 3.0	174.0 ± 6.0	162 ± 5
Trolox	11.2 ± 0.25	-	-	-
Allopurinol	-	3.3 ± 0.3	2.4 ± 0.1	-

Quercetin, isoquercitrin and rutin were chosen as references as they exhibit high structural similarities with isorhamnetin and its both glycosylated derivatives, the sole difference consisting in the presence of a methoxyl group instead of a hydroxyl group at the 3' position.

3.4.1. Xanthine oxidase inhibition

The results concerning the xanthine oxidase inhibition effect of flavonoids are reported in Table 2. Aglycone molecules as isorhamnetin and quercetin were the most active flavonoids, exhibiting IC50 values of 5.3 and 6.0 µM respectively that were close to that of the reference molecule allopurinol (2.4 µM). The presence of a methoxy group at C3' on isorhamnetin B-ring did not influence this antioxidant activity. However, the inhibitory effect greatly decreased when the C3 hydroxyl group was glycosylated. In fact, isoquercitrin and rutin were less active than quercetin and in the same way, isorhamnetin-3-O-glucoside and isorhamnetin-3-O-rutinoside were less active than isorhamnetin. These results are in accordance with that of Cos et al. (1998), showing that flavonoids glycosylation can affect their xanthine oxidase inhibition activity.

3.4.2. Superoxide scavenging activity

A molecule is considered as a superoxide scavenger when its IC50 value for reduction of the superoxide radical is lower than that found for the XO inhibition (Cos et al., 1998).

The scavenging activity of tested flavonoids against enzymatic-generated superoxide anion in a xanthine–xanthine oxidase system is shown in Table 2. All tested flavonoids respected this condition: quercetin and isorhamnetin exhibited similar scavenging activities with an IC50 value of 3 µM. These two aglycones were both efficient inhibitors of the xanthine oxidase and scavengers of the superoxide anion. Glycosylated flavonoids, rutin, isoquercitrin, isorhamnetin-3-O-glucoside and isorhamnetin-3-O-rutinoside were shown to be efficient to scavenge the superoxide anion radical but poor inhibitors of the xanthine oxidase. In fact their scavenging superoxide IC50 values of 20, 17.5, 41 and 24 µM respectively, were inferior to their xanthine oxidase inhibition IC50 values of 129, 183, 174 and 102 µM respectively.

3.4.3. DPPH scavenging activity

The DPPH scavenging activity of tested flavonoids is illustrated in Table 2. Quercetin and its glycosylated flavonoids showed a same antiradical capacity with IC 50 of 5 µM. Its antioxidant activity in scavenging DPPH overmatched trolox (IC 50 = 11 µM). These results were in accordance with Regasini et al. (2008) who reported that O-glycosylation at C-3 had a slight negative influence on this activity.

Isorhamnetin, a 3’ methoxy derivative of quercetin is twice less active then quercetin and presented an IC50 of 12 µM. Kim, Kim and Chung (2005) showed that at a concentration of 10 ppm, quercetin exhibited a DPPH scavenging percentage of 88% versus 55% for isorhamnetin. Then, the 3’ position in the B ring of flavonols is important to confer an antiradical activity.

At the opposite of quercetin and its glycosylated derivatives, the presence of a sugar residue at C3 position resulted in a decrease of antioxidant activity of isorhamnetin, as was found for isorhamnetin-3-O-glucoside and isorhamnetin-3-O-rutinoside that showed IC 50 values of 21 and 31 µM, respectively. The association of the methoxylation at C3’ position and the glycosylation at the C3 position significantly decreased the antiradical activity of flavonoids.

3.4.4. Antiproliferative activity

To investigate whether the *N. retusa* flavonoids and their structural analogues affected the cell viability, the MTT assay was used to evaluate the mitochondrial activity and, indirectly, the cell viability of cells treated with different flavonoids during 48h.

The rutin and isoquercitrin with IC50 values $\geq$ 200 µM were less effective than their aglycone, quercetin (IC50=80 µM). This result was in accordance with that of Zielińska, Gülden and Seibert, (2003) who showed that quercetin was more active on rat C6 glioma cells

than rutin and isoquercitrin. Kuo, (1996) studied the effect of quercetin and rutin on Caco2, HT29 and IEC-6 cells and showed that after 48 h of treatment, quercetin exhibited a growth inhibition of all cells lines studied with IC 50 values between 30 and 40 µM. However, treatment with rutin did not effect cell proliferation. These authors indicated that treatment of cells with 50 µM quercetin affected the transepithelial resistance of Caco2 cells. While treatment with 100 µM of rutin did not lead to any changes in transepithelial resistance of Caco 2 cells. Other studies showed that a single treatment with quercetin (5.5 µM) activated both apoptosis and differentiation programs in K562 human leukemia cells (Csokay, Prajda, Weber and Olah, 1997). Boyer, Brown and Rui, (2004) showed that quercetin aglycone was absorbed by the Caco2 cells in higher concentrations than isoquercitrin.

In the present study, *Nitraria retusa* flavonoids, isorhamnetin and isorhamnetin-3-O-rutinoside exhibited a higher antiproliferative activity on Caco2 cells, with IC50 values of 47 and 70 respectively, than quercetin, one of the most thoroughly investigated plant flavonoids for antiproliferative and anticancer activities (Zielińska, Gülden and Seibert, 2003). These results are in accordance with that of Teng, Lu, Wang, Tao and Wei, (2006), who studied the cytotoxic effect of isorhamnetin on human hepatocellular carcinoma cells (BEL-7402). These authors demonstrated that this flavonoid caused a cytotoxicity effect on BEL-7402 with a IC50 value of 74.4 µg/mL after 72h of treatment.

Isorhamnetin-3-O-glucoside (IC50=162 µM) was more active than isoquercitrin, its structural analogue with a hydroxyl group at the C3' position. Plochmann et al. (2007) studied the effects of methoxylation of hydroxyl residues of flavonoids on cytotoxicity and showed for instance that isorhamnetin is more cytotoxic than quercetin. These authors indicated that higher methoxylated compounds were significantly more toxic than the less methoxylated molecules.

3.5. Isorhamnetin-3-O-glucoside esters synthesis

To study the effect of acylation on *Nitraria retusa* flavonoids activity, isorhamnetin-3-O-glucoside was chosen to be acylated. In fact this flavonoid could be a good substrate for the lipase B of *Candida antarctica* which showed a strong selectivity for flavonoids glycosides presenting a primary aliphatic hydroxyl group on their sugar moiety (Chebil, Humeau, Falcimaigne, Engasser and Ghoul 2007). So, isorhamnetin-3-O-glucoside was acylated by fatty acid ethyl esters using the lipase B of *Candida antarctica* in 2-methyl-2-butanol (M_2B_2) which allowed the complete solubilisation of both substrates at the concentrations used in the present study. A molar ratio of 1/10 (flavonoid / acyl donor) was chosen as it was previously

demonstrated to be optimal in terms of acylation rate (Chebil, Humeau, Falcimaigne, Engasser and Ghoul, 2006). The temperature was kept at 65°C and a pressure of 500 mbar was applied to favour the alcohol by-product evaporation. No product was detected when fatty acid ethyl esters and isorhamnetin-3-O-glucoside were incubated in the absence of enzyme. Under these conditions, for the two acyl donors, only one major product was obtained and identified as a monoester, isorhamnetin-3-O-glucoside butyrate (C4:0) ($M+H^+$=549 g/mol), isorhamnetin-3-O-glucoside laurate (C12:0) ($M+H^+$=661 g/mol). The regioselectivity of the reaction was determined by fragmentation MS analyses of the purified products.

To our knowledge, the ability of the CALB to catalyze the esterification of isorhamnetin-3-O-glucoside has never been reported. This enzyme was shown to be able to catalyse the esterification of other flavonols glucoside such as isoquercitrin, rutin and naringin (Chebil, Humeau, Falcimaigne, Engasser and Ghoul, 2006)

Both the conversion yields of isorhamnetin-3-O-glucoside and the initial rates of reaction for the two acyl donors were determined. The two reactions reached their thermodynamic equilibrium at 72h. The total conversion yield of isorhamnetin-3-O-glucoside depended on the carbon chain length of the acyl donor used. It decreased from 94 % for ethyl laurate to 81 % for ethyl butyrate. These results are in accordance with that found by Ardhaoui, Falcimaigne, Ognier, Engasser, Moussou, Pauly, Ghoul and (2004) who studied rutin acylation reactions catalyzed by the CALB, using free fatty acids with acyl chain length varying from 6 to 18 carbons. These authors showed that for carbon chain lengths lower than C12, the performances of the reaction increased with the fatty acid chain length.

No influence of the acyl donor chain length on the kinetics of isorhamnetin-3-O-glucoside acylation was observed. Indeed similar apparent initial rates of 3.2 µmol/h were obtained for the two acyl donors tested.

3.6. Biological activities of isorhamnetin-3-O-glucoside esters

All isorhamnetin-3-O-glucoside esters were purified in order to study their antioxidant and antiproliferative activities and to compare them with isorhamnetin-3-O-glucoside activities.

Table 3: IC50 Values of isorhamnetin-3-O-glucoside and its esters on DPPH, Superoxide Anion Scavenging, xanthine oxidase inhibition and antiproliferative activity.

	DPPH scavenging	Superoxide scavenging	Xanthine oxidase inhibition	Antiproliferative activity
	IC50 ± SD (µM)	IC50 ± SD (µM)	IC50 ± SD (µM)	IC50 ± SD (µM)
Isorhamnetin-3-O-glucoside	31.3 ± 0.7	41 ± 3	174 ± 6	162 ± 5
Isorhamnetin-3-O-glucoside laurate	> 50	68	13 ± 1	81 ± 6
Isorhamnetin-3-O-glucoside butyrate	> 50	84	61± 3	100 ± 11

3.6.1. Xanthine oxidase inhibition

Inhibition of xanthine oxidase (XO), antioxidant and antiproliferative activities of purified isorhamnetin-3-O-glucoside esters were determined and compared with those of isoquercitrin (Table 3). Allopurinol, which is routinely used as XO inhibitor, constituted the reference molecule with an IC 50 value of 2.4 µM. Isorhamnetin-3-O-glucoside was shown to display only a weak xanthine oxidase inhibitory activity with an IC 50 value of 174 µM. The acylation of this molecule significantly enhanced its xanthine oxidase inhibitory potential. Indeed, isorhamnetin-3-O-glucoside esters showed a higher XO inhibition activity than isorhamnetin-3-O-glucoside: the lauroyl ester exhibited a low IC50 value of 13 µM while the butyroyl ester was demonstrated to be less efficient to inhibit the XO whith an IC50 value of 61 µM. These results are in accordance with those described by Jagadeeshwar Rao, Tiwari, Kumar, Reddy, Ali and Rao (2003) who found that XO inhibition activity of mesquitol esters increased with their carbon acyl chain length. These authors found a linear relationship between the log IC50 of mesquitol esters and their acyl chain length. This result could be explained by the improvement of the lipophilicity of the esters allowing a better affinity to the active site of XO.

3.6.2. Superoxide radical scavenging activity

A molecule is considered as a superoxide scavenger when its IC50 value for reduction of the superoxide radical is lower than that found for XO inhibition (Cos et al., 1998). Conversely to sorhamnetin-3-O-glucoside, the, lauryl and butyryl esters didn’t respect this condition exhibiting IC50 values of 68 µM and 84 µM, respectively (Table 3).

3.6.3. DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging activity of isorhamnetin-3-O-glucoside lauryl and butyryl esters was assessed using trolox as reference molecule. This activity was expressed as SC50 values (Table 3) Esters were found to exhibit a lower radical scavenging activity than isorhamnetin-3-O-glucoside with SC50 values superior than the highest concentration tested, 50 µM.

Some authors studied the DPPH antiradical activity of phenolic esters and showed that their activity was independent of the acyl chain length (Takahashi, Tamagawa, Kubo, Fukui, Wakabayashi, Honda, 2003; Jagadeeshwar Rao, Tiwari, Kumar, Reddy, Ali and Rao). Takahashi, Tamagawa, Kubo, Fukui, Wakabayashi, Honda, (2003) showed similar results in the case of alkylaminophenols of various alkyl chain lengths. Jagadeeshwar Rao, Tiwari, Kumar, Reddy, Ali and Rao (2003) showed that acylation of mesquitol slightly or not influence its DPPH scavenging activity.

3.6.4. Antiproliferative activity

The influence of acylation and acyl donor nature in a-ntiproliferative activity of isorhamnetine-3-O-glucoside was determined and the effect of isorhamnetin-3-O-glucoside and its fatty acid esters on tumoral Caco2 cells growth was investigated. Results showed that acylation enhanced antiproliferative activity of isorhamnetin-3-O-glucoside, so esters showed a lower IC50 of 81 and 100 µM for isorhamnetin-3-O-glucoside laurate and isorhamnetin-3-O-glucoside butyrate than their parent molecule that showed an IC50 of 162 µM.

Isorhamnetin-3-O-glucoside laurate, that has the longer carbon chain (C12) was more potent than the shorter esters, isorhamnetin-3-O-glucoside butyrate (C4). In fact, the addition of a hydrophobic moiety to a flavonoid was expected to increase its lipophilicity and consequently its ability to interact with the cell membrane and their transfer through it (Mellou, Loutrari, Stamatis, Roussos, Kolisis (2006).

4. Conclusion

In the present study, biological activities of *Nitraria retusa* extracts/fractions were studied. The most active were extracts with high flavonoid contents excepted chloroform extract that contain low flavonoid content but a high isorhamnetin relative ratio. In fact, isorhamnetin exhibited high biological activities, such as antiproliferative and xanthine oxidase inhibition, similar to that found with quercetin. However this compound is present in low quantities in all other extracts that mainly contained glycosylated isorhamnetin derivatives.

To improve these extracts activities, two strategies can be used: The first method concerns acylation of extracts containing glycosylated flavonoids to increase the hydrophobicity of flavonoids and consequently to enhance the membrane permeability towards these molecules. The present study showed that acylation of isorhamnetin-3-O-glucoside led to the improvement of its antiproliferative activity towards Caco2 cells and its xanthine oxidase inhibition activity.

The second strategy concerns the addition of glycosidases to hydrolyse glycoside moiety and increase the ratio of aglycones flavonoids that exhibited higher biological activities than glycosylated derivatives (Do et al., 2009).

References

Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Ognier, S., Engasser, J.M., Moussou, P., Pauly, G., Ghoul, M. (2004). Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoïdes. *Journal of Biotechnology* 110 (3), 265-271.

Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 89 (1), 27-36.

Boyer, J., Brown, D., Rui, H.L. (2004). Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (23), 7172-7179.

Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A. (1998). Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition* 37 (2), 147-163.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews 56 (11), 317-333.

Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.-M., Ghoul, M. (2007). Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (23), 9496-9502.

Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Ghoul, M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoïdes. *Process Biochemistry* 41 (11), 2237-2251.

Chiang, Y.-M., Chuang, D.-Y., Wang, S.-Y., Kuo, Y.-H., Tsai, P.-W., Shyur, L.-F. (2004). Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from Bidens pilosa. Journal of Ethnopharmacology 95 (2-3), 409-419.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products 61 (1), 71-76.

Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., Olah, E. (1997). Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sciences* 60 (24), 2157-2163.

Do Y.-K., Kim J.-M., Chang S.-M., Hwang J.-H., Kim W.-S. (2009). Enhancement of polyphenol bio-activities by enzyme reaction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 56 (2-3), 173-178.

Halim, A.F., Saad, H.E., Hashish, N.E. Flavonol glycosides from *Nitraria retusa*. (1995). *Phytochemistry* 40 (1), 349-351.

Hsu, H.-F., Houng, J.-Y., Chang, C.-L., Wu, C.-C., Chang, F.-R., Wu, Y.-C. (2005). Antioxidant activity, cytotoxicity, and DNA information of Glossogyne tenuifolia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (15), 6117-6125.

Jagadeeshwar Rao, R., Tiwari, A.K., Kumar, U.S., Reddy, S.V., Ali, A.Z., Rao, J.M. (2003). Novel 3-O-acyl mesquitol analogues as free-radical scavengers and enzyme inhibitors: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 13 (16), 2777-2780.

Kim, M.-Y., Kim, Y.-C., Chung, S.-K. (2005). Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: Inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (4), 633-640.

Kuo, S.-M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters* 110 (1-2), 41-48.

Loa, J., Chow, P., Zhang, K. (2009). Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 63 (6), 1007-1016.

Martin, S., Andriambeloson, E., Takeda, K., Andriantsitohaina, R. (2002). Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: A basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology* 135 (6), 1579-1587.

Matkowski, A., Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77 (5), 346-353.

Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A.D., Kolisis, F.N., Stamatis, H. (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* 116 (3), 295-304.

Mellou, F., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C., Kolisis, F.N. (2006). Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry* 41 (9), 2029-2034.

Ordoñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry* 97 (3),452-458.

Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., Scheller, C. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 460 (1), 1-9.

Pottier-Alapetite G. (1979). Flore de la Tunisie, Angiospermes-dicotylédones Apétales-Dialypetales, 291-293.

Regasini, L.O., Vellosa, J.C.R., Silva, D.H.S., Furlan, M., de Oliveira, O.M.M., Khalil, N.M., Brunetti, I.L., Young, M.C.M., Barreiro, E.J., Bolzani, V.S. (2008). *Phytochemistry* 69 (8), 1739-1744.

Shahidi, F., Wanasundara, U.N., Amarowicz, R. (1994). Natural antioxidants from low-pungency mustard flour. *Food Research International* 27 (5), 489-493.

Shaltout, K.H., Sheded, M.G., El-Kady, H.F., Al-Sodany, Y.M. (2003). Phytosociology and size structure of Nitraria retusa along the Egyptian Red Sea coast. *Journal of Arid Environments* 53 (3), 331-345.

Takahashi, N., Tamagawa, K., Kubo, Y., Fukui, T., Wakabayashi, H., Honda, T. (2003). Enhancement of antioxidant activity of p-alkylaminophenols by alkyl chain elongation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11 (15), 3255-3260

Teng, B.-s., Lu, Y.-H., Wang, Z.-T., Tao, X.-Y., Wei, D.-Z. (2006). In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from Hippophae rhamnoides L. against BEL-7402 cells. *Pharmacological Research* 54 (3), 186-194.

Yu, S.-F., Chen, T.-M., Chen, Y.-H. (2007). Apoptosis and necrosis are involved in the toxicity of Sauropus androgynus in an in vitro study. *Journal of the Formosan Medical Association* 106 (7), 537-547.

Zielińska, M., Gülden, M., Seibert, H. (2003). Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13 (1), 47-53.

3. Contribution de l'article

L'analyse du contenu en flavonoïdes totaux et en polyphénols des différents extraits et fractions préparés a montré que le méthanol est un solvant approprié pour l'extraction de ces métabolites secondaires à partir des feuilles de *Nitraria retusa*. Le fractionnement de l'extrait au méthanol à l'aide de solvants organiques de polarité croissante a permis ensuite de concentrer les flavonoïdes, la fraction à l'acétate d'éthyle étant la plus riche. L'analyse des différents extraits et fractions a permis d'identifier les flavonoïdes majoritaires présents dans les feuilles de *Nitraria retusa* : il s'agit de l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-glucoside, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et probablement l'isorhamnétine-3-O-robinibioside. Ces molécules présentent une grande analogie structurale avec la quercétine et ses dérivés glycosylés isoquercitrine et rutine.

L'étude des activités biologiques des extraits et des fractions a permis de mettre en évidence une corrélation entre leurs teneurs en flavonoïdes et leurs activités biologiques. Ainsi les extraits les plus riches en flavonoïdes présentent les activités antioxydantes les plus importantes. D'autre part, les résultats obtenus suggèrent que les activités des extraits et des fractions dépendent également de la nature des flavonoïdes présents. Ainsi, la fraction la plus riche en isorhamnétine (fraction au chloroforme) s'est montrée très active, bien que ne faisant pas partie des milieux les plus riches en flavonoïdes. Afin de tenter de relier la structure des flavonoïdes aux activités des extraits qui les contiennent, ces derniers ont été purifiés. L'étude de leurs activités antioxydantes et cytotoxiques a montré que les formes glycosylées de l'isorhamnétine présentent des activités plus faibles que celles de leur analogue aglycone, ce qui rejoint les résultats obtenus pour la quercétine, l'isoquercitrine et la rutine. On peut ajouter à ces observations que l'activité antiradicalaire des flavonoïdes dérivant de l'isorhamnétine est inférieure à celle observée pour les flavonoïdes dérivant de la quercétine. Ceci pourrait être lié à l'absence de fonction catéchol dans ces molécules.

Concernant l'inhibition de la xanthine oxydase et la cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses, on a pu noter une action plus marquée des flavonoïdes de *Nitraria retusa* par rapport aux flavonoïdes de référence quercétine, rutine et isoquercitrine.

L'acylation enzymatique de l'isorhamnétine-3-O-glucoside, catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* a conduit à la synthèse d'esters, résultant de l'acylation sélective de l'hydroxyle primaire du flavonoïde. Ainsi, le laurate d'isorhamnétine et le butyrate d'isorhamnétine ont été préparés avec des rendements de 94 % et 81 %, respectivement.

Les activités de ces esters ont été étudiées et comparées à celles de l'isorhamnétine. Nous avons ainsi pu montrer que l'acylation améliore l'activité cytotoxique et le pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase du flavonoïde, le dérivé laurate étant plus actif que le dérivé butyrate. Cette observation est en accord avec des travaux de la littérature suggérant que le caractère lipophile des composés pourrait favoriser ces deux activités (Madhusudana Rao et al., 2005 ; Melou et al., 2005). En ce qui concerne l'activité antiradicalaire, au contraire, les esters d'isorhamnetine-3-O-glucoside se sont montrés moins actifs que la molécule non acylée.

4. Complément de résultats:

Activité antiproliférative des flavonoïdes et des esters d'isorhamnétine-3-O-glucoside vis-à-vis des cellules HUVEC.

4.1. Activité antiproliférative des flavonoïdes vis-à-vis des cellules HUVEC

Les activités antiprolifératives des flavonoïdes de *Nitraria retusa* et de leurs esters vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2 ayant été mises en évidence, une étude complémentaire de la toxicité de ces mêmes molécules vis-à-vis de cellules normales a été réalisée afin de mettre en évidence une éventuelle sélectivité.

Les pourcentages de mortalité de cellules Caco2 et des cellules HUVEC après traitement pendant 48 h à différentes concentrations des flavonoïdes sont présentés dans les figures 66 et 67.

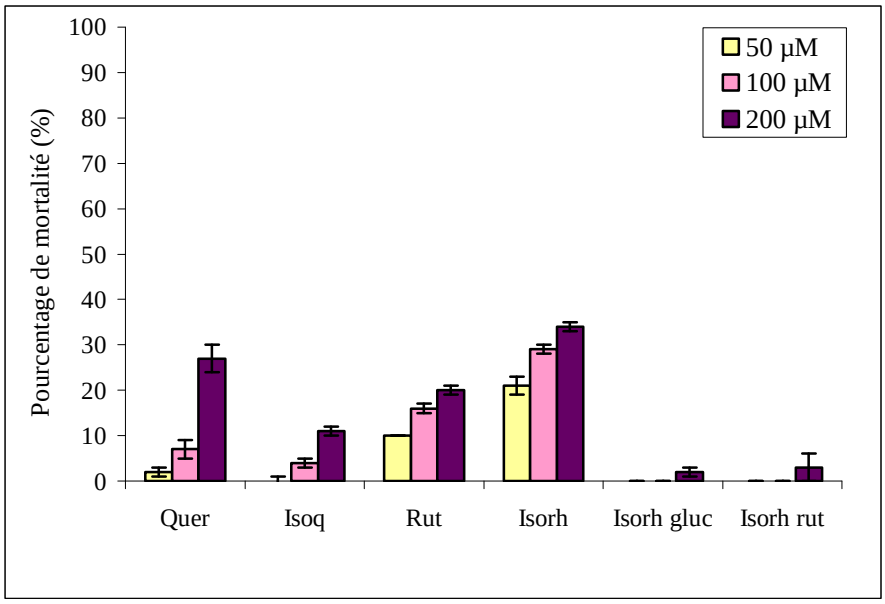


Figure 66: Mortalité de cellules HUVEC déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations de flavonoïdes : 50, 100 et 200 µM. Tous les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à des cellules de référence cultivées en présence de 1% de DMSO et en absence de flavonoïdes. Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (SD) (n=4).

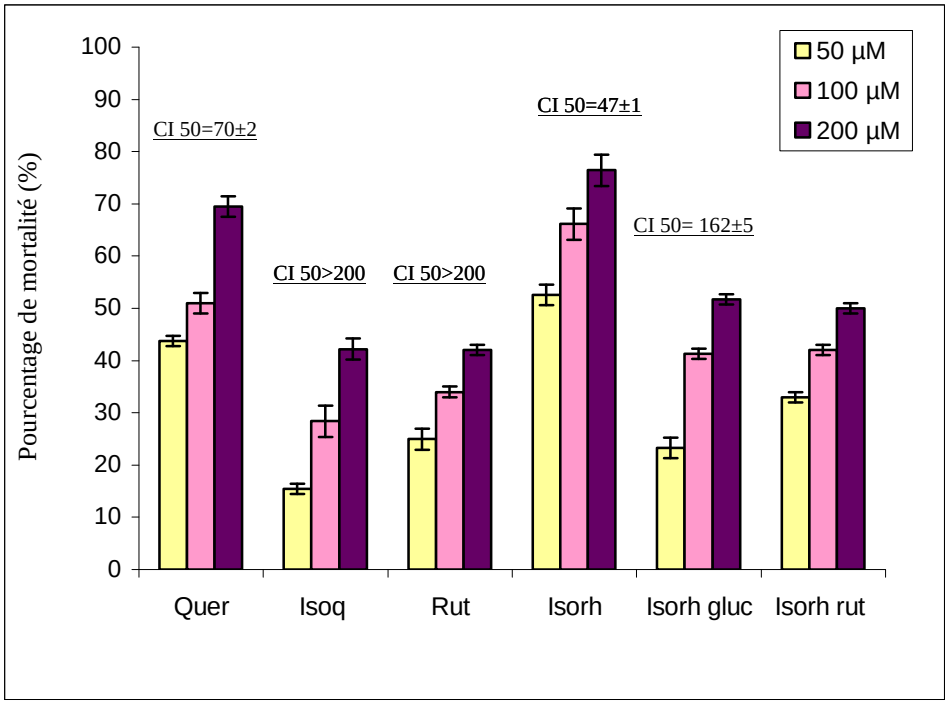


Figure 67: Mortalité des cellules Caco2 (%) déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations de flavonoïdes : 50, 100 et 200 µM. Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type (SD) (n=4). Les CI50 sont exprimées en µM.

A partir de ces résultats, plusieurs observations peuvent être faites :

Tous les flavonoïdes présentent une activité antiproliférative dose dépendante vis-à-vis des deux lignées cellulaires.

En ce qui concerne les flavonoïdes glycosylés, ceux-ci sont moins actifs sur les cellules HUVEC ou Caco2 que les aglycones quercétine et isorhamnétine correspondants. De même, Matsuo et al. (2005) ont montré que la quercétine est significativement cytotoxique vis-à-vis des cellules HUVEC avec une CI 50 de 303 µM tandis que son dérivé glycosylé, la rutine, n'a présenté aucune cytotoxicité vis-à-vis de cette même lignée cellulaire. Dans le cas des flavonoïdes de *Nitraria retusa*, des pourcentages de mortalité ne dépassant pas 1% pour l'isorhamnétine-3-O-glucoside et 3% pour l'isorhamnétine-3-O-rutinoside à 200 µM ont été obtenus. Ces composés présentent une activité antiproliférative plus conséquente vis-à-vis des cellules Caco2 (CI50 de 162 µM pour l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et de 70 µM pour l'isorhamnétine-3-O-glucoside) que vis-à-vis des cellules HUVEC. Ces résultats suggèrent

L'existence d'une sélectivité d'action de ces deux flavonoïdes, en faveur de la destruction des cellules cancéreuses. Dans tous les cas, aucun effet de la longueur de la chaîne glycosidique n'est observé.

Quant aux molécules aglycones, l'isorhamnétine est la molécule qui possède l'activité antiproliférative vis-à-vis des cellules Caco2 la plus élevée parmi les six flavonoïdes étudiés, avec un pourcentage de mortalité de 77 % à 200 µM. Celle-ci est également la plus active vis-à-vis des cellules HUVEC quelle que soit la concentration. La quercétine, analogue structural non méthylé de l'isorhamnétine présente un comportement similaire : elle induit 25 % de mortalité des cellules HUVEC contre 70 % de mortalité des cellules Caco2, à 200 µM. L'utilisation de concentrations plus faibles permet de diminuer la mortalité des cellules HUVEC (pourcentages de 2 et 7 % respectivement) mais conduit aussi à une diminution de la mortalité des cellules Caco2 (44 et 55% pour des concentrations de 50 et 100 µM, respectivement).

La rutine et l'isoquercitrine présentent des profils d'action similaires : elles sont faiblement cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses, même à forte concentration. Par ailleurs, elles présentent une action délétère vis-à-vis des cellules normales non négligeable.

Dans la littérature, différents effets concernant la sélectivité de flavonoïdes vis-à-vis de cellules cancéreuses et de cellules normales ont été rapportés. Ainsi, l'activité cytotoxique de la quercétine vis-à-vis de cellules cancéreuses leucémiques a été étudiée par Lugli et al. (2009) qui ont montré que la quercétine induit l'apoptose des cellules cancéreuses, mais pas celle des cellules normales mononucléées du sang périphérique (PBMC). De même, Paliwal et al. (2005) ont également étudié la cytotoxicité de la quercétine vis-à-vis de cellules cancéreuses et de cellules saines de la peau humaine ; ils ont montré que cette molécule présente une CI50 de 9 µM vis-à-vis des cellules cancéreuses et de 86 µM vis-à-vis des cellules saines. Cependant, Brown et al. (2003) n'ont observé aucune sélectivité de l'activité cytotoxique de la quercétine vis-à-vis des cellules cancéreuses SCC (cellules de l'épiderme oral humain) par rapport aux cellules normales NOMC (cellules normales de la muqueuse orale) avec des CI 50 de 30 et 31 µM, respectivement.

4.2. Activité antiproliférative des esters d'isorhamnétine-3-O-glucoside vis-à-vis des cellules HUVEC

Dans l'étude de la sélectivité des esters d'isoquercitrine, le butyrate d'isoquercitrine et le laurate d'isoquercitrine semblaient présenter des activités intéressantes, c'est pourquoi le laurate d'éthyle et le butyrate d'éthyle ont été utilisés pour l'acylation de l'isorhamnétine-3-O-glucoside.

Les résultats de cytotoxicité des deux esters obtenus vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2 et des cellules normales HUVEC sont présentés dans les figures 68 et 69.

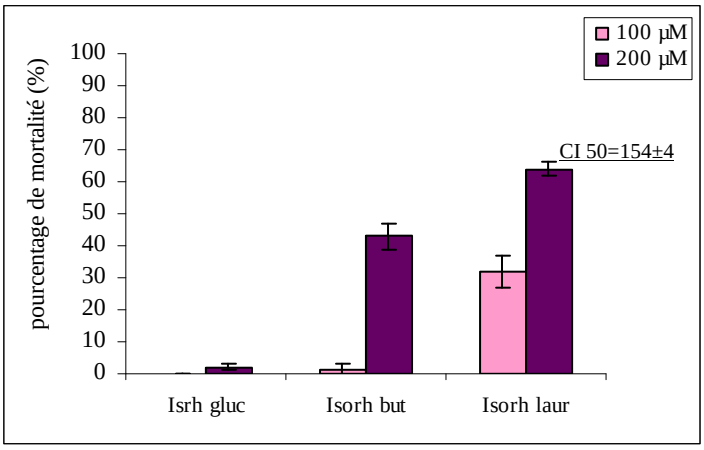


Figure 68: Mortalité des cellules HUVEC (%) déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isorhamnétine-3-O-glucoside et de ses esters : 50, 100 et 200 µM. Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type (SD) (n=4)

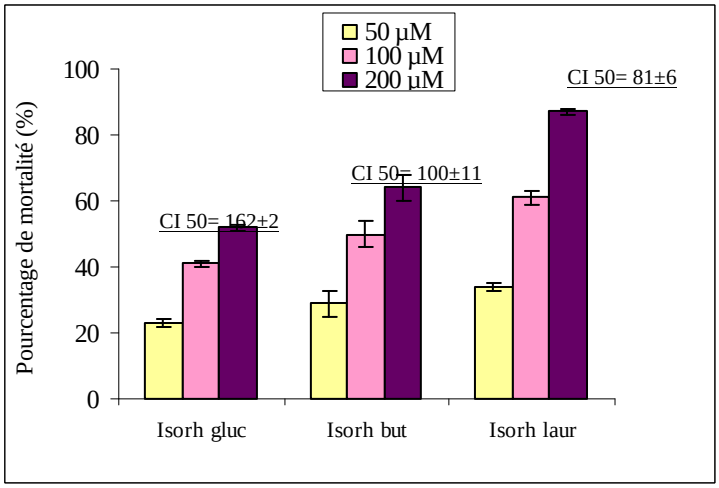


Figure 69: Mortalité des cellules Caco2 (%) déterminée par le test MTT après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'isorhamnétine-3-O-glucoside et de ses esters : 50, 100 et 200 µM. Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type (SD) (n=4)

L'acylation de l'isorhamnétine-3-O-glucoside par l'acide butyrique et l'acide laurique a permis d'améliorer le pouvoir cytotoxique de cette molécule vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2. Toutefois, la cytotoxicité vis-à-vis des cellules saines s'est trouvée elle aussi augmentée, conduisant à une sélectivité moins importante des esters synthétisés par rapport à la molécule originelle, l'isorhamnétine-3-O-glucoside.

L'acylation de l'isoquercitrine (chapitre IV) et de l'isorhamnétine-3-O-gucoside a eu un effet différent sur la sélectivité des esters obtenus : l'acylation de l'isoquercitrine avec le butyrate d'éthyle et le laurate d'éthyle a amélioré sa sélectivité tandis que l'acylation de l'isorhamnétine-3-O-glucoside a eu un effet contraire. Ces résultats montrent que la sélectivité des esters est dépendante à la fois de la nature du donneur de groupement acyle et du flavonoïde acylé ainsi que l'ont montré Mellou *et al.* (2006). Ces auteurs ont, en effet, mis en évidence l'effet positif de l'acylation de la rutine sur son activité antitumorale et antiangiogénique, alors qu'aucun effet n'est observé lors de l'acylation de la naringine.

4.3. Purification, acylation et activités biologiques de l'isorhamnetine-3-O-rutinoside

4.3.1. Purification de l'isorhamnetine-3-O-rutinoside à partir de la fraction au butanol

L'analyse CLHP et CL-SM de la fraction au butanol (FBuOH) obtenue à partir de l'extrait au méthanol de *Nitraria retusa* montre la présence d'un pic majoritaire d'isorhamnétine-3-O-rutinoside (pic 2 dans la figure 70).

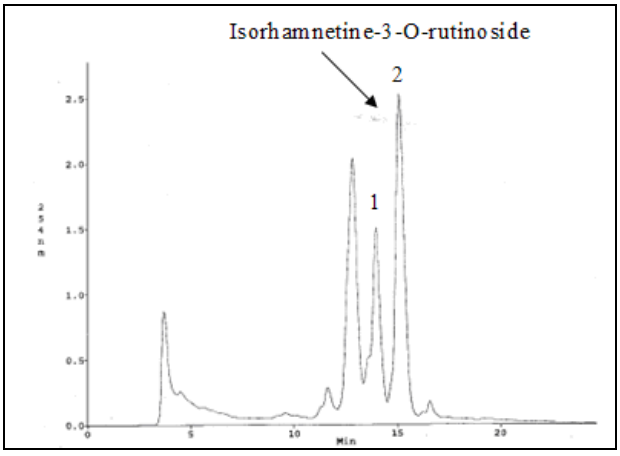


Figure 70: Chromatogramme de la FBuOH après analyse CLHP à 254 nm en utilisant une colonne C18 AltimaAmide 4,6 x 150 Altech.

Le temps de rétention de pic (2) correspond exactement à celui de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside standard utilisé. Cependant cela n'exclut pas la possibilité de présence de l'isorhamnétine-3-O-robinobioside, isomère de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, au niveau de ce pic. L'isorhamnétine-3-O-robinobioside sort probablement dans le pic (1) au niveau duquel une masse de 625 g/mol qui correspond bien à $M+H^+$ de l'isorhamnétine-3-O-robinobioside a été identifiée par analyse CL-SM.

Afin de purifier le pic correspondant à l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, la fraction au butanol a été injectée en plusieurs fois à l'aide d'un appareil CLHP semi préparative Biocad. Les volumes correspondant aux pics de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside collectés, ont été rassemblés et le solvant evaporé. L'isorhamnétine-3-O-rutinoside obtenue est analysée par spectroscopie de masse, en infusion directe (ESi, mode d'ionisation positif) (figure 71).

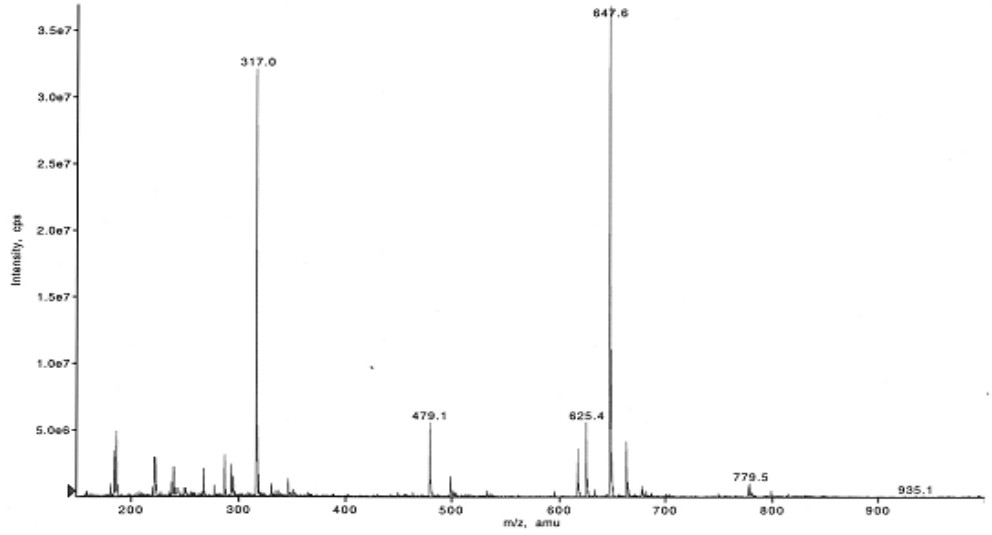


Figure 71: Spectre de masse d'isorhamnétine-rutinoside purifiée à partir de la FBuOH

L'analyse en spectométrie de masse de l'isrohamnétine-rutinoside obtenue par purification à l'aide de la chromatographie semi préparative montre la présence de la molécule obtenue avec une masse moléculaire, $M+H^+$= 625 g/mol, son adduit sodium $M+Na^+$=647 g/mol ainsi que les masses correspondant à ses produits de dégradation : l'isorhamnétine-glucoside ($M+H^+$=479 g/mol) et l'isorhamnétine ($M+H^+$=317 g/mol).

4.3.2. Acylation de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside purifiée à partir de la fraction au butanol.

Les rendements obtenus lors de l'acylation de l'isorhamnetine-3-O-glucoside commercialisé étant corrects, les mêmes conditions de réaction ont été utilisées pour l'acylation de l'isorhamnetine-3-O-rutinoside purifié à partir de FBuOH. Cependant, aucun produit n'a été obtenu après 96 h de réaction. Une hypothèse qui pourrait être émise pour expliquer ce résultat est que l'isorhamnetine-3-O-rutinoside obtenu est mélangé avec des petits phénols qui ne sont pas détectables par les différents méthodes d'analyse utilisées : CCM, CLHP ou CLSM et qui peuvent inhiber l'enzyme et par conséquent empêcher l'acylation de l'isorhamnetine-3-O-rutinoside. La présence éventuelle de traces de solvant (TFA) utilisé pour la purification peut également inhiber l'enzyme.

Ce résultat paraît surprenant étant donné que l'acylation de la rutine, analogue structural non méthylé de l'isorhamnetine-3-O-rutinoside, par la lipase B de *Candida antarctica* avec l'acide palmitique a déjà été décrite avec des rendements proches de 70% (Ardhaoui et al., 2004).

4.3.3. Comparaison des activités biologiques de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside purifiée à partir de la fraction au butanol et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside commercialisée.

Les activités biologiques de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside purifiée ont été évaluées et comparées à celles trouvées pour l'isorhamnétine-3-O-rutinoside commercialisée.

Les activités antioxydantes et antiprolifératives sont présentées dans le tableau 15

Tableau 15: Comparaison des activités biologiques d'isrohamnétine-3-rutinoside commercialisée et de d'isrohamnétine-3-rutinoside purifiée

	Piégeage du radical DPPH CI50 ± SD (µM)	Piégeage du radical Superoxide CI50 ± SD (µM)	inhibition de la xanthine oxidase CI50 ± SD (µM)	Activité antiproliferative	
				Caco2 IC50 ± SD (µM)	HUVEC à 200 µM (% de mortalité)
Isrh-3-rut commercialisée	21 ± 1	24±1	102±4	70±2	3±3
Isrh-3-rut purifiée	35± 3	30±2	90±3	84±4	2±1

Les résultats des activités biologiques de l'isorhamnétine-3-rutinoside purifiée montrent des faibles différences par rapport aux activités de l'isorhamnétine-3-rutinoside commercialisée. Par exemple, l'isorhamnétine-3-rutinoside commercialisée apparaît plus actif dans les tests de piégeage des radicals DPPH et superoxyde avec des CI 50 de 21 et 24 µM contre 35 et 30 µM pour l'isorhamnétine-3-rutinoside purifiée. De même l'activité antiproliférative vis-à-vis des cellules Caco2 de l'isorhamnétine-3-rutinoside commercialisée est légèrement supérieure à celle de l'isorhamnétine-3-rutinoside purifiée avec des CI 50 de 70 et 84 µM respectivement. Cependant, dans le cas de l'inhibition de la xanthine oxydase, l'isorhamnétine-3-rutinoside purifiée semble légèrement plus active que l'isorhamnétine-3-rutinoside commercialisée avec des CI 50 de 90 et 102 µM respectivement. Concernant la selectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses, les deux molécules ont montré une importante selectivité en induisant une faible mortalité de 2 à 3 % vis-à-vis des cellules normales HUVEC à 200 µM.

Ces légères différences d'activités pourraient être dues à la présence d'autres molécules présentes avec l'isorhamnétine-3-O-rutinoside purifiée. Il pourrait notament s'agir d'isorhamnétine-3-O-robinobioside, dont la séparation de son isomère isorhamnétine-3-O-rutinoside n'est pas aisée, ou d'autres molécules de type petits phénols qui eux expliqueraient l'absence de réaction de synthèse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse se sont articulés autour de deux axes d'investigation :

- d'un point de vue applicatif, il s'agissait de valoriser une plante, *Nitraria retusa*, Cette dernière est déjà utilisée depuis de nombreuses années en médecine traditionnelle et d'hypothétiques corrélations entre les activités de la plante et son contenu en flavonoïdes ont été rapportées. C'est pourquoi, notre étude a consisté à étudier les flavonoïdes constitutifs de des feuilles de *N. retusa*, à les identifier, à évaluer leurs activités telles que leurs propriétés antioxydantes et antiprolifératives et de les comparer avec celles d'autres flavonoïdes modèles, analogues structuraux plus connus.

d'un point de vue cognitif, l'objectif concernait la mise au point d'une méthodologie de couplage des flavonoïdes extraits de *N. retusa* avec des molécules susceptibles de renforcer leurs activités ou d'en apporter de nouvelles pour produire des dérivés fonctionnels. L'association acides aminés-flavonoïdes initialement envisagée n'ayant pas abouti, c'est une voie de modification structurale de flavonoïdes par acylation avec des acides gras qui a été plus particulièrement étudiée.

En ce qui concerne la valorisation de *N. retusa* par extraction de ses composés phénoliques et flavonoïdes, différentes étapes d'extraction et de fractionnement des feuilles, impliquant divers procédés et solvants ont été réalisées. L'extraction au méthanol des feuilles sèches de la plante, suivie d'un fractionnement à l'aide de solvants de polarité croissante est apparu comme un protocole performant pour préparer un extrait riche en flavonoïdes contenant jusqu'à 170 mg/g de masse sèche de polyphénols totaux et 60 mg/g de masse sèche de flavonoïdes.

L'identification par CLHP et SM^n a montré la présence majoritaire de 4 flavonoïdes majoritaires, à savoir, l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et l'isorhamnétine-3-O-glucoside et probablement l'isorhamnétine-3-O-robinobioside. Ces molécules se répartissent dans les différents extraits de la manière suivante: l'isorhamnétine, molécule la

moins polaire est extraite par le chloroforme, les flavonoïdes glycosylés, et par conséquent plus polaires sont davantage concentrés dans les fractions à l'acétate d'éthyle et au butanol.

Ainsi, *Nitraria retusa* peut être considérée comme une plante riche en polyphénols et en flavonoïdes. De plus, cette plante contient des flavonoïdes qui sont peu disponibles, ce qui pourrait faire d'elle une source intéressante d'isorhamnétine et de ses dérivés glycosylés.

Par ailleurs, nous avons montré que les extraits et les fractions obtenus présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes, vis-à-vis des radicaux DPPH et de l'anion superoxyde en présence du système xanthine/xanthine oxydase. L'activité antiradicalaire est dépendante du contenu en flavonoïdes et en polyphénols totaux des extraits et une relation linéaire a été établie, les fractions les plus riches en flavonoïdes étant les plus actives. Cependant, l'intensité de l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la teneur globale en flavonoïdes mais également de leur nature. Ainsi, la très forte inhibition de la xanthine oxydase et l'importante capacité inhibitrice du radical DPPH par la fraction au chloroforme, pourtant peu concentrée en flavonoïdes, peuvent être attribuées à sa forte teneur en isorhamnétine, molécule particulièrement active vis-à-vis de la xanthine oxydase.

De même, une tendance a été montrée, indiquant que les extraits les plus riches en flavonoïdes présentent des activités antiprolifératives les plus élevées vis-à-vis des cellules cancéreuses de colon humain, Caco2.

Afin de mieux comprendre l'influence de la nature des composés contenus dans les extraits sur leurs activités, les activités biologiques de l'isorhamnétine et de deux dérivés glycosylés de cet aglycone, l'isorhamnétine-3-glucoside et l'isorhamnétine-3-rutinoside ont été étudiées et comparées à celles de leurs homologues structuraux respectifs la quercétine, l'isoquercitrine et la rutine.

Dans le tableau 16, quelques données sont synthétisées permettant de donner des éléments de relation structure-fonction pour relier la présence simultanée de la méthoxylation ou/et de la glycosylation d'une molécule de base, la quercétine (figure 72), sur ses activités biologiques.

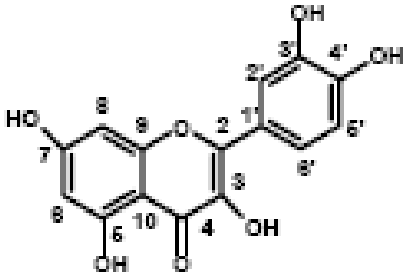


Figure 72: Structure de la quercétine

Tableau 16: Influence de la structure des flavonoïdes sur leurs activités biologiques.

	Effet de la méthoxylation en position 3'	Effet de la glycosylation en position 3	Méthoxylation + glycosylation
Xanthine oxydase	0	-	+
Piégeage de superoxyde	0	0	0
Piégeage de DPPH	-	0	-
Activité antiproliférative	++	-	+

0 : sans effet
+ : effet positif
++ : effet très positif
- : effet négatif

Ainsi différentes tendances ont été mises en évidence :

* L'isorhamnétine, flavonoïde aglycone est apparu comme étant le plus actif avec des activités comparables à celles de la quercétine, composé bien connu pour ses diverses activités biologiques, parmi lesquelles, les activités antioxydantes et antiprolifératives.

* Les dérivés glycosylés de la quercétine et de l'isorhamnétine sont moins actifs que les molécules aglycones correspondantes.

* La présence d'un groupe fonctionnel peut être favorable à une activité mais peut en inhiber une autre. Ainsi, la méthylation au niveau du carbone C3' de l'isorhamnétine lui confère une activité antiproliférative deux fois plus importante que celle de son analogue non

méthylé, la quercétine.Toutefois, cette méthylation diminue de moitié l'activité antiradicalaire de l'isorhamnétine vis-à-vis du radical DPPH.

* L'association d'une méthylation et d'une glycosylation favorise l'activité antiproliférative. Ainsi, les dérivés glycosylés de l'isorhamnétine, présentant une méthylation en position C3', sont plus actifs que leurs analogues dérivant de la quercétine et n'ayant pas cette fonction. De plus le nombre de sucre formant le groupement glycosylé semble conférer une meilleure activité antiproliférative et une activité d'inhibition de la xanthine oxydase supérieure.

* En terme de sélectivité des flavonoïdes vis-à-vis de cellules cancéreuses par rapport à des cellules saines, il a été montré que les dérivés glycosylés de l'isorhamnétine sont plus sélectifs par que les flavonoïdes aglycones, quercétine et isorhamnétine ainsi que les flavonoïdes glycosylés, isoquercitrine et rutine: la présence d'une méthylation en association avec une glycosylation au niveau du flavonoïde pourrait lui conférer une certaine sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ainsi, l'isorhamnetine-3-O-rutinoside, flavonoïde glycosylé de *N. retusa* se révèle plus sélectif avec une forte activité antiproliférative vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2 et une absence de cytotoxicité vis-à-vis des cellules normales HUVEC.

Le deuxième axe de cette thèse concernait l'étude d'une voie de modification structurale de flavonoïdes afin d'améliorer leurs propriétés biologiques ou pour éventuellement synthétiser des molécules polyfonctionnelles.

C'est l'acylation par des esters éthyliques d'acides gras de différentes longueurs de chaîne qui a été étudiée plus particulièrement. Dans une première phase, nous avons utilisé un flavonoïde modèle monoglycosylé possédant un groupe hydroxyle primaire, l'isoquercitrine.

Son acylation enzymatique par la lipase B de *Candida antarctica* a conduit à la synthèse d'un seul ester majoritaire sur l'hydroxyl primaire du sucre. La performance de l'acylation est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne de carbone. Ce sont donc les acides gras à chaînes courtes qui ont permis l'obtention des taux de conversions ainsi que des vitesses initiales les plus élevés.

Les conditions expérimentales adaptées à la réaction d'acylation de l'isoquercitrine ont été appliquées à son analogue structural, l'isorhamnétine-3-O-glucoside en présence de deux

donneurs de groupement acyle, le butyrate et le laurate d'éthyle ; ces derniers ont été choisis pour obtenir un compromis entre l'efficacité de la réaction d'acylation de l'isoquercitrine et le gain potentiel en terme d'activités antiprolifératives et antioxydantes pour les esters qui en dérivent. Des taux de conversion de l'isorhamnétine-3-O-glucoside sont obtenus avec des pourcentages de 94 % avec le laurate d'éthyle et 81 % avec le butyrate d'éthyle. Une même vitesse initiale de 3,2 µM / h est obtenue pour les deux acides gras.

Les activités des 8 esters d'isoquercitrine à savoir le butyrate, le caproate, le caprylate, le décanoate, le laurate, le palmitate, l'oléate et le stéarate d'isoquercitrine ainsi que celles des esters d'isorhamnétine-3-O-glucoside ont été évaluées. Il en ressort les éléments majeurs suivants :

* Concernant l'activité d'inhibition de la xanthine oxydase, tous les esters sont plus actifs que leur molécule d'origine, l'isoquercitrine ou l'isorhamnétine-3-O-glucoside. L'activité des esters est proportionnelle à la longueur de la chaîne acyle: une relation linéaire a pu être établie entre ces deux facteurs. Ces résultats pourraient s'expliquer par une augmentation de l'affinité des molécules devenues plus hydrophobes au niveau du site actif de l'enzyme. La présence d'une insaturation au niveau de la chaîne acyle de l'ester d'acide gras améliore l'activité de l'ester de flavonoïde. Ainsi, l'oléate d'isoquercitrine (C18:1) est apparu plus actif que le stéarate d'isoquercitrine (C18: 0).

* Tous les esters d'isoquercitrine présentent des activités de piégeage de radicaux superoxydes. Cependant, ces activités sont moins importantes que celle de l'isoquercitrine. Une relation linéaire a pu être établie entre l'activité des esters et le nombre de carbone de la chaine acyle. En revanche, une telle activité n'a pu être observée pour aucun ester d'isorhamnetine-3-O-glucoside puisqu'ils ne correspondent pas à la condition décrite par Cos et al. (1998), selon laquelle une substance n'est capable de piéger les radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase que si celle-ci présente une CI50 plus faible pour cette activité que la CI50 d'inhibition de la xanthine oxydase.

* En ce qui concerne le piégeage des radicaux ABTS ou DPPH, des relations inversement proportionnelles entre les activités des esters d'isoquercitrine et la longueur de leur chaîne acyle ont pu être établies. L'activité la plus élevée est obtenue avec le butyrate d'éthyle (C4). Cette activité diminue lorsque la chaine acyle s'allonge jusqu'à 8 carbones.

Pour les esters à plus longues chaînes, une activité similaire est obtenue. Dans le cas du test DPPH, les esters sont moins actifs que l'isoquercitrine dont ils dérivent. De même, les esters de l'isorhamnétine-3-O-glucoside présentent une activité plus faible que celle determinée pour l'isorhamnétine-3-O-glucoside.

* Les esters d'isoquercitrine présentent une importante activité antiproliférative vis-à-vis des cellules cancéreuses Caco2, supérieure à celle de l'isoquercitrine. Le laurate d'isoquercitrine est apparu comme le plus actif induisant une mortalité cellulaire maximale à 200 µM. Les esters à longues chaînes paraissent moins actifs. Les esters d'isorhamnétine-3-O-glucoside sont également plus actifs que les flavonoïdes non acylés. Ces résultats concernant l'amélioration de l'activité antiproliférative vis-à-vis des cellules cancéreuses après acylation pourraient être expliqués par une augmentation de l'hydrophobie des molécules acylées et par conséquent, une amélioration de leur capacité à être transférées à travers les membranes cellulaires. Cependant, d'autres facteurs pourraient également jouer un rôle dans la détermination de cette activité comme la structure de la molécule et donc sa capacité à interagir avec des récepteurs membranaires des cellules.

Les différents esters d'isoquercitrine sont faiblement toxiques vis-à-vis des cellules normales HUVEC, induisant une mortalité inférieure à 50 % à la concentration la plus élevée utilisée, 200 µM. En terme de sélectivité vis-à-vis de cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, le laurate d'isoquercitrine apparaît comme le plus sélectif. En revanche, les esters d'isorhamnétine-3-O-glucoside ne présentent pas de sélectivité particulière vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses, notamment concernant l'identification et la purification d'autres flavonoïdes plus rares chez *N. retusa* qui n'ont pas été ciblés dans le présent travail à savoir l'isorhamnétine-galactoside, l'isorhamnétine-xylosyl robinobioside et l'isorhamnétine 3-O-4^{Rhm} galactosyl robinobioside qui sont des flavonoïdes qui, à ce jour et à notre connaissance, n'ont jamais été caractérisés quant à leurs activités biologiques. D'autres molécules appartenant à des classes chimiques différentes comme les coumarines, les alcaloïdes, les stéroïdes pourraient être également visées pour leur activité potentielle thérapeutique ou cosmétique… En effet, la présence d'alcaloïdes potentiellement intéressants pour le traitement du cancer a été déjà rapportée dans d'autres espèces de la famille de *Nitrariaceae* comme *Nitraria tangutorum* (Putkonen et al. 2001; Putkonen et al., 2003).

En ce qui concerne les réactions d'acylation il serait intéressant d'utiliser d'autres solvants moins toxiques, tels que les liquides ioniques pour la mise au point d'un procédé plus propre. D'autre part, une étude plus approfondie des conditions réactionnelles pourrait améliorer le taux de conversion et diminuer le temps réactionnel.

Afin d'améliorer les activités antioxydantes et antiradicalaires de flavonoïdes il serait intéressant d'étudier l'effet de leur acylation par des acides phénoliques connus pour leur activité antioxydante importante dans le but d'obtenir une activité renforcée.

Concernant l'activité antiproliférative, une étude plus approfondie est nécessaire afin de déterminer le mode d'action des différentes molécules testées et leur site d'action au niveau de la cellule et comprendre l'origine de la différence d'activité et de sélectivité observée entre les différents esters de flavonoïdes et les molécules naturelles.

Ce travail ouvre donc un large champ pour l'étude de *Nitraria retusa*, plante utilisée traditionnellement mais dont les activités biologiques n'avaient jusqu'à présent jamais été étudiées. L'évaluation de différentes activités biologiques des esters de flavonoïdes en comparaison avec les molécules originelles montre que l'acylation permet d'améliorer le pouvoir biologique des flavonoïdes en augmentant leur lipophilicité et par conséquent leur solubilité dans des milieux lipidiques et leur biodisponibilité en facilitant leur transfert à travers les membranes biologiques. Toutefois une autre stratégie possible est d'enrichir les extraits en flavonoïdes aglycones par voie enzymatique en utilisant des glycosidases (Do et al., 2009). Ceux-ci se révélant plus actifs que leurs dérivés glycosylés. Enfin, cette étude a permis d'ouvrir quelques pistes dans la compréhension de la relation structure-activité de flavonoïdes et de leurs dérivés acylés.

REFERENCES

Abd El-Ghani M.M., Amer W.M. (2003). Soil-vegetation relationships in a coastal desert plain of southern Sinai, Egypt. *J. Arid Environ.*, 55, 607-628.

Acuña U.M., Atha D.E., Ma J., Nee M.H., Kennelly E.J. (2002). Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother. Res*., 16, 63-65.

Afanas'ev I. B., Ostrakhovitch E. A., Mikhal'chik E.V., Ibragimova, G. A., Korkina L.G. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem. Pharmacol*., 61, 677-684.

Agullo G., Gamet-Payrastre L., Fernandez Y., Anciaux N., Demigné C., Rémésy C. (1996). Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett*., 105, 61-70.

Alluis B., Pérol N ., El Hajji H., dangles O. (2000). Water soluble flavonol (=3-Hydroxyl-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) Derivatives Synthesis, colouring, and Antioxidant properties, *Helv. Chim. Acta*, 83, 428-443.

Alluis B., Dangles O. (1999). Acylated flavone glucosides: Synthesis, conformational investigation, and complexation properties. *Helv. Chim. Acta*, 82, 2201-2212.

Anandharajan R., Jaiganesh S., Shankernarayanan N.P., Viswakarma R.A., Balakrishnan, A. (2006). In vitro glucose uptake activity of Aegles marmelos and Syzygium cumini by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPARγ in L6 myotubes. *Phytomedicine* 13, 434-441.

Anthonsen H.W., Baptista A., Drabløs F., Martel P., Petersen S.B., Sebastião M., Vaz L. (1995). Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol. Annu. Rev*., 1, 315-371.

Ardhaoui M., Falcimaigne A., Engasser J.-M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M. Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. (2004). *J. Mol. Catal B-Enzym*., 29, 63-67.

Ardhaoui M., Falcimaigne A., Engasser J.M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M. (2004). Enzymatic synthesis of new aromatic and alipathic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. *Biocatal. Biotransfor*., 22, 253-259.

Ardhaoui M., Falcimaigne A., Ognier S., Engasser J.M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M. 2004. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids**.** *J. Biotechnol*., 110, 265-271.

Aron P.M., Kennedy J.A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res*., 52, 79-104.

Arpigny J.L. et Jaeger K.-E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochem. J*., 343, 177-183.

Arroyo, M., Torres, R., De La Mata, I., Pilar Castillón, M., Acebal, C. (1999). Interaction of penicillin V acylase with organic solvents: Catalytic activity modulation on the hydrolysis of penicillin v. *Enzyme Microl. Tech*., 25, 378-383.

Arts I.C., Hollman P.C., Feskens E.J. (2001). Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr*, 74, 227-232.

Atsumi T., Iwakura I., Kashiwagi Y., Fujisawa S., Ueha T. (1999). Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxid. Redox Sign*., 1, 537-546.

Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2000). Peroxidase-Catalyzed Formation, of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Arch. Biochem. Biophys*., 378, 224-233.

Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2001). Structure-Activity Study on the Quinone/Quinone Methide Chemistry of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 398-408.

Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., Van Bladeren P.J. (2002a). Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent. *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 343-351.

Awad, H.M., Boersma M.G., Boeren S., van der Woude H., van Zanden J., van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M. (2002b). Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett*., 520, 30-34.

Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., Van Bladeren P.J., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M.(2003). Quenching of Quercetin Quinone/Quinone Methides by Different Thiolate Scavengers: Stability and Reversibility of Conjugate Formation. *Chem. Res. Toxicol*., 16, 822-831.

Bacon J.R., Williamson G., Garner R.C., Lappin G., Langouët S., Bao Y. (2003). Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis*, 24,. 1903-1911.

Barfoed, M., et Skagerlind, J. (1994). Enzymatic synthesis of sugar alcohol esters, WO94/12651.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press*, 764.

Berthod A., Billardello B., Geoffray S. (1999). Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation1 analysis. *Analusis*, 27, 750-757.

Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D. (2005) Phenolics content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chem.*, 82, 390-393.

Bloomer S., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1992). Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. *Enzyme Microb. Tech*., 14, 546-552.

Bodini M.E., Copia G., Tapia R., Leighton F., Herrera L. (1999). Iron complexes of quercetin in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide anion radical. *Polyhedron*, 18, 2233-2239.

Bonfili L., Cecarini V., Amici M., Cuccioloni M., Angeletti M., Keller J.N., Eleuteri A.M. (2008). Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds.

Bongiorno P.B., Fratellone P.M., LoGiudice P. (2008). Potential health benefits of garlic (Allium sativum): A narrative review. *J. Complement Integr. Med*., 5, art. no. 1.

Borbulevych O.Y., Jankun J., Selman S.H., Skrzypczak-Jankun E. (2004). Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 A resolution. *Protein Struct. Funct. Genet*., 54, 13-19.

Bors W., Hheller W., Michel C., Saran M. (1990). Flavonoides as antioxidant determination of radical - scavenging efficiencies. *Methods enzymol*., 186, 343-355.

Bors W., Michel C., Saran M.(1994). Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol*., 234, 420-429.

Boulos L. (2000). Flora of Egypt, Vol.2 (*Geraniaceae-Boraginaceae*). Cairo: Al Hadara Puplishing. 352.

Boumendjel A., Mariotte A.M., Perrier E., Bresson Rival D. (1999). Flavonoid esters and their use notablyin cosmetics, FR2778663.

Bosetti C., Spertini, L., Parpinel M., Gnagnarella P., Lagiou P., Negri E., Franceschi S., La Vecchia C. Montella M., Peterson J., Dwyer J., Giacosa A. (2005). Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidem. Biomar.*, 14, 805-808.

Bousquet C., (1992). Explora, La génétique, Presse Pocket, 129.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igic R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). *Food Chem.*, pp. 925-929.

Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P.,Christiansen L., Huge-Jensen B., Norskov L., Thim L. Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343, 767-770.

Brasseur T., Angenot L. (1986). Flavonol glycosides from leaves of Strychnos variabilis. *Phytochemistry*, 25, 563-564.

Bravo A., Anacona J.R. (2001). Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Met. Chem*., 26, 20-23.

Brinkmann M., Lütkemeyer D., Gudermann F., Lehmann J. (2002). New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'the Cellscreen'. *Cytotechnology* 38, 119-127.

Briske-Anderson M.J., Finley J.W., Newman S.M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. P. Soc. Exp. Biol. Med., 214, 248-257.

Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M., Dangles O. (1997) Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables. In phytochemistry of fruit and vegetables proceedings of the phytochemical society of Europe. Oxford, UK. Clarendon Press, 30-49.

Brown J., O'Prey J., Harrison P.R. (2003). Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: Involvement to the Akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis* 24 (2), 171-177.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Ed, Tec et Doc., Paris.

Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G., and Swinnen J.V. (2005). Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity. *J. Biol. Chem*., 280, 5636-5645.

Buisman G.J.H., Van Helteren C.T.W., Kramer G.F.H., Veldsink J.W., Derksen J.T.P., Cuperus F.P. (1998). Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol. Lett.* 20, 131-136.

Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. (2001). J Agric *Food Chem.,*49, 2774-2779.

Burta, O., Tirlea, F., Burta, O.L., Qadri, S.M. (2008). Phytotherapy in cardiovascular diseases: From ethnomedicine to evidence based medicine. *Journal of Biological Sciences* 8 (2), 242-247.

Burton G.W., Ingold K.U. (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. Annals of the New York Academy of Sciences 570, 7-22.

Buschi C.A., Pamilio A.B., **(**1982). Isorhamnetin 3-O-Robinobioside From *Gomphrena martiana*. *J. Nat. Prod.,* 45, 557-559.

Calias P., Galanopoulos T., Maxwell M., Khayat A., Graves D., Antoniades H.N., D'Alarcao M. (1996). Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. Carbohydrate Research., 292, 83-90.

Caltagirone S., Ranelletti F.O., Rinelli A., Maggiano N., Colasante A., Musiani P., Aiello F.B., Piantelli M. (1997). Interaction with Type II Estrogen Binding Sites and Antiproliferative Activity of Tamoxifen and Quercetin in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*., 17, 51-59.

Cao G., R.L. Prior (1999), Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract, *Clin. Chem.* 45, 574-576.

Cao L., Bornscheuer U.T., Schmid R.D. (1999). Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6, 279-285.

Casagrande F., Bacqueville D. (1998). Pillaire, M.J., Malecaze, F., Manenti, S., Breton-Douillon, M., Darbon, J.-M. G1 phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27(Kip1) and inhibition of G1 CDKs in choroidal melanoma cells. *FEBS lett*., 422, 385-390.

Casagrande F., Darbon J.-M. (2001). Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol*., 61, 1205-1215.

Cazarolli L.H., Zanatta L., Alberton E.H., Figueiredo M.S., Folador P., Damazio R.G., Pizzolatti M.G., Silva F.R. (2008). Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini rev. med. Chem.*, 8, 1429-1440.

Cernia E., Palocci C., Soro, S. (1998). The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. *Chem. Phys. Lipids,* 93, 157-168.

Chaabi M., Freund-Michel V., Frossard N., Randriantsoa A., Andriantsitohaina R., Lobstein A. (2007). Anti-proliferative effect of Euphorbia stenoclada in human airway smooth muscle cells in culture. J. Ethnopharmacol. 109, 134-139.

Chaïeb M., Boukhris M. **(**1998). Flore succincte et illustré des zones arides et sahariennes de Tunisie, 49, 43-44.

Chamouleau F., Coulon D., Girardin M., Ghoul M. (2001). Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11, 949-954.

Chan A.C., Tran K., Raynor T., Ganz P.R., Chow C.K. . (1991). Regeneration of vitamin E in human platelets. *J. Biol. Chem.,* 266, 17290-17295.

Chang H.-L., Su J.-H., Yeh Y.-T., Lee Y.-C., Chen H.-M., Wu Y.-C., Yuan S.-S.F. (2008). Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett.*, 267, 85-95.

Chang WS,, Lee Y.J., Lu F.J., Chiang H.C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res,* 13, 2165-70.

Chebil L., Anthoni J., Humeau C., Gerardin C., Engasser J.-M., Ghoul M. (2007). Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J. Agricult. Food Chem.*, 55, 9496-9502.

Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J.-M., Ghoul M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochem.*, 41, 2237-2251.

Chen C.-C., Chen T.-L., Tsai S.-W. (2006). Altering lipase activity and enantioselectivity in organic media using organo-soluble bases: Implication for rate-limiting proton transfer in acylation step. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 201-208.

Chen D., Dou Q.P. (2008). Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.,* 9, 1196-1206.

Chen Y.-C., Shen S.-C., Lee W.-R., Hou W.-C., Yang L.-L., Lee T.J.F. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.*, 82, 537-548.

Chi Y.S., Jong H.G., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P. (2001). Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1185-1191.

Chiba K., Kawakami K., Tohyama K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol in Vitro* 12, 251-258.

Chiesi M., Schwaller R. (1995). Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol*., 49, 495-501.

Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinae N. (1998). Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-glucoside in rats and humans, *FEBS Lett*, 438, 220–224.

Choi, C.-W., Hyun, A.J., Sam, S.K., Jae, S.C. (2007). Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from Flos Lonicerae. *Arch. Pharmacal Res.* 30 (1), 1-7.

Cimanga K., De Bruyne T., Hu J.P., Cos P., Apers S., Pieters L., Tona L., Kambu, K., Vanden Berghe Vlietinck A.J. (1999). Constituents from *Morinda morindoides* leaves as inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions. *Pharm. Pharmacol. Comm.* 5, 419-424.

Cook N.C., Samman S. (1996). Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.

Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. Curr. Top. *Med. Chem.*, 1, 569-590.

Cos P., Ying L., Calomme, M., Hu J. P., Cimanga K., & Van Poel B. (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine-oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*., 61, 71-76.

Coulon, D., Girardin, M., Engasser, J.-M., Ghoul, M. (1997). Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Ind. Crop. Prod.* 6, 375-381.

Coulon D., Girardin M., Ghoul M. (1999). Enzymic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. *Process Biochem.* 34, 913-918.

Coulon, D., Ismail, A., Girardin, M., Rovel, B., Ghoul, M. (1996). Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *J. Biotech*. 51, 115-121.

Crespy V., Aprikian O., Morand C., Besson C., Manach C., Demigne C. Remesy C. (2001). Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J. Nutr*., 131, 3227-3230.

Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 564-582.

Cushine T.TP., Lamb A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. Int. *J. antimicrob. Ag*., 26, 343-356.

Cygler M., Schrag J.D. (1999). Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *B. B. A. Mol. Cell Biol. L*., 1441, 205-214.

Danieli B., Bertario A., Carrea G., Redigolo B., Secundo F., Riva S. (1993). Chemo-enzymatic synthesis of 6"-O-(3-arylprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin. *Helv. Chim. Acta.* 76, 2981-2991.

Danieli B, De Bellis P, Carrea G, Riva S. (1989). Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides. *Heterocyles*, 29, 2061-2064.

Danieli, B.; De Bellis, P.; Carrea, G.; Riva, S. (1990). Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helv. Chim. Acta*.,73, 1837-1844.

Danieli, B., Lesma, G., Luisetti, M., Rivo, S. (1997). Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 3, 193-201.

Danieli B., Riva S. (1994). Enzyme-mediated Regioselective Acylation of Polyhydroxylated Natural Products. *Pure Appl. Chem.*, 66, 2215.

Daoud H. (1985). Flora of Kuwait, Vol. 1. KPI Publication in assocation with Kuwait University, 56.

Da Silva E.L., Tsushida T., Terao J. (1998). Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 349, 313-320.

Da Silva, S.L., da Silva, A., Honorio, K.M., Marangoni, S., Toyama, M.H., da Silva, A.B.F. (2004). The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J. Mol. Struc.-Theochem*., 684, 1-7.

Day A.J., Canada F.J., Diaz J.C., Kroon P.A., McLauchlan R., Faulds C.B., Morgan M.R., Williamson G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase, *FEBS Lett*., 468, 166-170.

Day, A.J. DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J.C., Morgan M.R.A., Williamson G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver betaglucosidase activity, *FEBS Lett*., 436, 71-75.

Delattre J., Beaudeux J.-L., Bonnefort-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques. Tec & Doc Lavoisier: Londres - Paris - New York.

Deprez S., Mila I., Huneau J.-F., Tome D., Scalbert A., (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 Cells, *Antiox. Redox Sig*., 3, 957-967.

Derewenda, Z.S. (1994). Structure and function of lipases. *Adv. in Protein Chem.* 45, 1-52.

De Souza R.F.V., De Giovani, W.F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.* 9, 97-104.

De Stefani E., Boffetta P., Deneo-Pellegrini H., Mendilaharsu M., Carzoglio J.C., Ronco A., Olivera L. (1990). Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer*, 34, 100-110.

De Stefani E., Ronco A., Mendilaharsu M., Deneo-Pellegrini H. (1999). Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract - II. Nutrients. *Oral Oncol.*, 35, 22-26.

De Whalley C.V., Rankin S.M., Hoult J.R., Jessup W., Leake D.S. (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol*., 39, 1743-1750.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 65, 337-353.

Ding X.-P., Qi J., Chang Y.-X., Mu L.-L., Zhu D.-N., Yu B.-Y. (2009). Quality control of flavonoids in Ginkgo biloba leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection. *J. Chromatogr. A.* 1216, 2204-2210.

Do Y.-K., Kim J.-M., Chang S.-M., Hwang J.-H., Kim W.-S. (2009). Enhancement of polyphenol bio-activities by enzyme reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 56,173-178.

Drabløs F., Petersen S.B. (1997). Identification of conserved residues in family of esterase and lipase sequences. *Methods Enzymol*., 284, 28-61.

Duan J. A., Williams I.D., Che C.T., Zhou R.H., Zhao S.X., (1999). Tangutorine: A Novel 13-Carboline Alkaloid from *Nitraria tangutorum*. *Tetrahedron Lett*., 40, 2593-2596.

Duan J A., Zhou R H. Zhao S. X. (1998). The chemical constituents of flavonoids and phenolic acid compounds of leaves from *Nitraria tangutorum* Bor.in China (1)

Ducret A., Giroux A., Trani M., Lortie R. (1995). Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnol. Bioeng.* 48, 214-221.

Dudal Y., Lortie R. (1995). Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized Mucor miehei lipase. Biotechnol. Bioeng. 45, 129-134

Dugas Jr A.J., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxyl radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity L**.** relationships, *J. Nat. Prod*. 63, 327-331.

Durgo K., Vuković L., Rusak G., Osmak M., Čolić J.F. (2007). Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technol. Biotech*., 45, 69-79.

Eissa A.M.F., El-Metwally A.M., El-Hashash M.A., El-Gohary A.M.F. (2008). Synthesis and biological evaluation of some new2-propyl-4(3H)-quinazolinone derivatives as anti-bacteria. *J. Korean Chem. Soc.,* 52, 328-337.

Ema T., Tanida D., Matsukawa T., Sakai T. (2008). Biomimetic trifunctional organocatalyst showing a great acceleration for the transesterification between vinyl ester and alcohol. *Chem. Commun*., 957-959.

Ema, T., Kageyama, M., Korenaga, T., Sakai, T. (2003). Highly enantioselective lipase-catalyzed reactions at high temperatures up to 120°C in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 3943-3947.

Enaud E., Humeau C., Piffaut B., Girardin M. (2004). Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *J. Mol. Catal B: Enzymatic* 27, 1-6.

Engelmann M.D., Hutcheson R.; Cheng I.F. (2005). Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2953-2960.

Erben-Russ M., Bors W., Saran, M. (1987). Reactions of linoleic acid peroxyl radicals with phenolic antioxydants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.,* 52, 393-412.

Ergan F., Trani M., André G. (1988). Solvent free triglyceride synthesis using lipozymeTM IM-20. *Biotechnol. Lett.* 10, 629-634.

Erlund I., Alfthan G., Maenpaa J., Aro A. (2001). Tea and coronary heart disease: the flavonoid quercetin is more bioavailable from rutin in women than in men, *Arch. Intern. Med.,* 161, 1919-1920.

Fauconnier M.L., Marlier M. (1997). Revue bibliographique: les lipoxygénases de soja. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*., 1, 125-141.

Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 108-115.

Ferrali M., Signorini C. Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.*, 416, 123-129.

Fickers P., Destain J., Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12, 119-130.

Fink B.N., Steck S.E., Wolff M.S., Britton J.A., Kabat G.C., Gaudet M.M., Abrahamson P.E., Bell P., Schroeder J. C., Teitelbaum S. L., Neugut A. I., Gammon M.D. (2007). Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on long island. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* 16, 2285-2292.

Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Golino A., Mastellone C., Oriano P., Monaco P. (2007). Reactive oxygen species scavenging activity of flavone glycosides from Melilotus neapolitana. *Molecules* 12, 263-270.

Fotakis G., Timbrell J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171-177.

Frankel E.N., Huang S.W., Aeschbach R., Prior E., (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and resmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem*. 44, 131–135.

Frexinos J., Buscail L. (2004). Hépato-gastro-entérologie proctologie : Pour le praticien.

Fujiwara H., Tanaka Y., Fukui Y., Ashikari T., Yamaguchi M., Kusumi T. (1998). Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Sci.*, 137, 87-94.

Galanis A., Pappa A., Giannakakis A., Lanitis E., Dangaj D., Sandaltzopoulos R. (2008). Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett.*, 266, 12-20.

Galati G., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J. (2001). Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radical Biol. Med.*, 30, 370-382.

Galati G., Chan T., Wu B., O'Brien P.J. (1999). Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 521-525.

Gao C., Mayon P., MacManus D.A., Vulfson E.V. (2001). Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnol. Bioeng*. 71, 235-243.

Garcia-Closas R., Gonzalez C.A., Agudo A., Riboli E. (1999). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control,* 10 (1), 71-75.

García-Ramírez B., Fernández-Larrea J., Salvadó M.J., Ardèvol A., Arola L., Bladé C. (2006). Tetramethylated dimeric procyanidins are detected in rat plasma and liver early after oral administration of synthetic oligomeric procyanidins, *J. Agric. Food Chem*., 54, 2543 -2551.

Gariboldi E., Mascetti D., Galli G., Caballion P., Bosisio E. (1998). LC-UV-electrospray-MS-MS mass spectrometry analysis of plant constituents inhibiting xanthine oxidase. *Pharm. Res.*, 15, 936-943.

Gayot S., Santarelli X., Coulon D. (2003). Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: Effect of the water content. *J. Biotech*. 10, 29-36.

George C.Y., Jeffrey P.H, Jaeman B., Avignon D.A., Jay W.H., (2003). 8-Nitroxanthine, a product of myeloperoxidase, peroxynitrite, and activated human neutrophils, enhances generation ofsuperoxide by xanthine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys*., 418, 1-12.

Giorno L., Molinari R., Natoli M., Drioli E. (1997). Catalytic behaviour of lipase free and immobilized in biphasic membrane reactor with different low water-soluble substrates. *J. Chem. Technol. Biot,* 69, 11-14.

Goderis H.L., Ampe G., Feyten M.P., Fouwe B.L., Guffens W.M., Van Cauwenbergh, S.M., Tobback, P.P. (1987). Lipase-catalysed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng*., 30, 258-266.

Goetz M. E., Luch A. (2008). Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett*., 266, 73-83.

Gopalan V., Pastuszyn A., Galey Jr W.R.., Glew R.H. (1992). Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase, *J. Biol. Chem*. 267, 14027-14032.

Gorman L.A.S., Dordick J.S. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng*., 39, 392-397.

Gotor V. (1999). Non-conventional hydrolase chemistry: Amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 2189-2197.

Greenspan L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Nat. Bur. Stand*., 81, 89-96.

Grochulski P., Li Y., Schrag J.D., Cygler M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Prot. Sci*., 3, 82-91.

Groenewoud G., Hundt H.K.L. (1986). The microbial metabolism of condensed (+)-catechin by rat caecal microflora. *Xenobiotica*, 16, 99-107.

Guerra J.A., Molina M.F., Abad M.J., Villar A.M. Paulina, B. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from Tanacetum microphyllum. *Int. Immunopharmacol.*, 6, 1723-1728.

Guillardeau, I., Montet, D., Khaled, N., Pina, M., Graille, J. (1992). Fructose caprylate biosynthesis in a solvent-free medium. *Tenside. surfact. det.* 29 (5), 342-344.

Guyot B., Bosquette B., Pina M., Graille J. (1997). Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnol. Lett.* 19, 529-532.

Hale A.L. (2003). Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah strains using aflep and microsatellite marker analysis. Office of graduate studies of texas A&M university. Genetics, 260.

Halim A.F., Saad H.E., Hashish N.E. (1995). Flavonol glycosides from *Nitraria retusa*, Egypt. *Phytochemistry*, 40, 349-351.

Halling Peter J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-aqueous media. *Institution of Chemical Engineers Symposium Series*, 34-36.

Hammerstone J.F., Lazarus S.A., Schmitz H.H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr*., 130, 2086S-2092S.

Harborne B. (1989) Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics. Academic Press, London, UK.

Harborne J.B., Mabry T.J., (1982). The Flavonoids, Advances in Research. Chapman & Hall, London.

Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H., (eds), (1975). The Flavonoids. Chapman & Hall, London

Harborne J. B., Williams C. A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. Plant Science Laboratories, The University of Reading, Reading, UK RG6 6AS Received (in Cambridge, UK) .First published as an Advance Article on the web 5th April 2001.

Hari Krishna, S., Divakar, S., Prapulla, S.G, Karanth, N.G. (2001). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from Rhizomucor miehei. *J. Biotech.* 87, 193-201.

Harris S.R., Thorgeirsson U.P. (1997). Flavone acetic acid stimulates nitric oxide and peroxynitrite production in subcutaneous mouse tumors. Biochem. *Biophys. Res. Commun*., 235, 509-514.

Hasler A., Gross G.-A., Meier B., Sticher O. (1992). Complex flavonol glycosides from the leaves of Ginkgo biloba. *Phytochemistry* 31, 1391-1394.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.

Heneidy S.Z. (1996). Palatability and nutritive value of some common plant species from the Aqaba Gulf area of Sinai, Egypt. *J. of Arid Environ*., 34,115-123.

Hirano R., Sasamoto W., Matsumoto A., Itakura H., Igarashi O., Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr Sci Vitaminol*., 47, 357-362.

Hmamouchi M. (1997). Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. Université Mohammed V, Faculté de Medecine et de Pharmacie, Unité de Recherche: Plantes Medicinales et Aromatiques, Rabat, MAROC.

Hollman P.C.H., De Vries J.H.M., Van Leeuwen S.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1276-1282.

Holst B., Williamson G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.,* 19, 73-82.

Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A., Ryder J.J., Hall W.L., Cassidy A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.,* 88, 38-50.

Huang Y.T., Kuo M.L., Liu J.Y., Huang S.Y., Lin J.K., (1996). Inhibitions of Protein Kinase C and Proto-oncogene Expressions in NIH 3T3 Cells by Apigenin . *Eur. J. Cancer.*, 32, 146-151.

Hugon D. (2000). Production biotechnologique d'une nouvelle gamme de tensioactifs: des esters de tréhalose et d'acides gras. Thèse de l'INPL, Nancy.

Huk I., Brovkovych V., Nanobash Vili J., Weigel G., Neumayer Ch., Partyka L., Patton S., Malinski T. (1998). Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases

nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br. J. Surg.*, 85, 1080–5.

Ishihara, K., Nakajima, N. (2003). Stereoselective reduction of keto esters: Thermophilic bacteria and microalgae as new biocatalysts.

Iio M, Ono Y, Kai S, Fukumoto M. (1986). Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32, 635-42.

Imlay J. A, Chin S.M., Linn S. (1988). Toxic DNA damage by hydren peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240, 640-642.

Imlay J. A, Chin S.M., Linn S. (1988). Toxic DNA damage by hydren peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240, 640-642.

Jagadeeshwar Rao, R., Tiwari A.K., Kumar U.S., Reddy S.V., Ali A.Z., Rao J.M. (2003). Novel 3-O-acyl mesquitol analogues as free-radical scavengers and enzyme inhibitors: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2777-2780.

Jeong J.H., An J.Y. Kwon Y.T., Rhee J.G., Lee Y.J. (2009). Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. Journal of Cellular *Biochemistry*, 106, 73-82.

Jessup W., Rankin S.M., De Whalley C.V., Hoult J.R., Scott J., Leake D.S. (1990). Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.*, 265, 399-405.

Jiang Q., Yin X., Lil M.A., Danielson M.L., Freiser H., Huang J. (2008). Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.*, 105, 20464-20469.

Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. (1994). Flavonoids as antioxydants. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4846-4851.

Kamel M.S., Othtani K., Kurokawa T., Assaf M.H., El-Shanawany M. A., Ali A.A., Kasai R., Ishibashi S., Tanaka O. (1991). Studies on Balanites aegyptiaca fruits, an antidiabetic Egyptian folk medicine. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1229-1233.

Kang H.M., Kim J.H., Lee M.Y., Son K.H., Yang D.C., Baek N.I., Kwon, B. M. (2004). Relationship Between Flavonoid Structure and Inhibition of Farnesyl Protein Transferase *Nat. Prod. Res*. 18, 349-356.

Kao F.-J., Ekhorutomwen S.A., Sawan S.P. (1997). Residual stability of lipase from Candida rugosa in hexane, supercritical CO2, and supercritical SF6. *Biotechnol. Tech.* 11, 849-852.

Kassas M., Zahran M.A. (1967). On the ecology of the Red Sea littoral salt marsh. *Ecol. Monogr.*, 37, 277-316.

Kassas M., Girgis W.A. (1965). Habitat and plant communities in the Egyptain desert. VI: the units of a desert ecosystem. *J. Ecol.* 53, 715-728

Katsoura M.H., Polydera A.C., Katapodis P., Kolisis F.N., Stamatis H. (2007). Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochem.*, 42, 1326-1334.

Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L., Tselepis A.D., Stamatis H. (2006). Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *J. Biotechn.* 123, 491-503.

Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A. (1991). A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from Pseudomonas cepacia, and lipase from *Candida rugosa. J. Org. Chem.*, 56, 2656-2665.

.Keith H.G. (1965). A preliminary check list of Libyan Flora. vol 2. Printed by United Middle East Executives Ltd London, England for Government of Libyan Arab Republic, 1047.

Khaled N., Montet D., Farines M., Pina M., Graille J., (1992). Synthèse des mnoesters de sucre par biocatalyse. *Oléagineux*, 47, 181-190.

Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N., Quinn M.T. (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorgan. Med. Chem.*, 15,1749-1770.

Kim J.D., Liu L., Guo W., Meydani M. (2006). Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J. Nutr. Biochem.*, 17, 165-176.

Kim D.-H., Jung E.-A., Sohng I.-S., Han J.-A., Kim T.-H., Han M.J. (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.*, 21, 17-23.

Kim K.K., Song H.K., Shin D.H., Hwang K.Y., Sun S.W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 5, 173-185.

Kintz P. (1998). Toxicologie et pharmacologie médicolégales. Publié par Elsevier Masson, ISBN, 44-48.

Knekt P., Järvinen R., Seppänen R., Helioövaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol*. 146, 223-230.

Knekt P., Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Helioövaara M., Reunanen A., Hakulinen, T. Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 560-568.

Kodelia G., Athanasiou K., Kolisis F.N. (1994). Enzymatic synthesis of butyryl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture. *Appl. Biochem. Biotech.* 44, 205-212.

Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., De Groot A., Evstatieva L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal*., 13, 8-17.

Kontogianni A., Skouridou V., Sereti V., Stamatis H., Kolisis F.N. (2003). Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J. Mol. Catal B: Enzymatic*, 21,59-62.

Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., Kolisis, F.N. (2001). Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103, 655-660.

Kosmider B., Osiecka R. (2004). Flavonoid Compounds: A Review of Anticancer Properties and Interactions with cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Drug. Dev. Res.*, 63, 200-211.

Krishnamachari V., Levine L.H., Pare P.W. (2002). Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4357-4363.

Kubo I., Yokokawa Y. (1992). Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from Buddleia coriacea. *Phytochemistry*, 31, 1075-1077.

Kuo S.-M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett*., 110, 41-48.

Kvittingen L., Sjursnes B., Anthonsen T., Halling P. (1992). Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: A practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron*, 48, 2793-2802.

Laane C., Boeren S., Vos K. . (1985). On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. *Trends Biotechnol.,* 3, 251-252.

Lambusta D., Nicolosi G., Patti A., Piattelli M. (1993). Separation of stereoisomeric 1,1'-bis(α-hydroxyethyl)ferrocenes by lipase-mediated acetylation in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* 4, 919-924.

Larribaud J. (1952). Tindouf et le Sahara occidental. Arch. Inst. Pasteur, Alger, 30, 244-318.

Leake D.S. (1998a). Isoflavonoids as inhibitors of lipid peroxidation and quenchers of singlet oxygen. In Flavonoids in health and disease, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 295-302.

Leake D.S. (1998b). Effects of flavonoids on the oxidation of low-density lipoproteins. In Flavonoids in health and disease, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 253-276.

Lee Y.S., Lee S., Lee H.S., Kim B.-K., Ohuchi K., Shin K.H. (2005). Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside from salicornia herbacea on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull*., 28, 916-918.

Lee E.S., Shin H. T., Hwang H. J. et Kim J. H., (2003). Antioxudant activity of extracts from Alpinia katsumadai seed. *Phytother. Res.*, 17, 1041-1047

Leese H.J., Semenza G. (1973). On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase, *J. Biol. Chem*., 248, 8170-8173.

Le Floc'h E. (1983). Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne, Ed, Publications Scientifiques Tunisiennes, Imprimerie officielle de la République Tunisienne., Tunis.

Le Houéro H.N. (1980). Browse in north Africa. In: Le Houérou H.N. (Ed.), Browse in Africa. Addis Ababa: International livestock Center for Africa, 55-82.

Le Marchand L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother* 56, 296-301.

Le Marchand L., Murphy S.P., Hankin J.H., Wilkens L.R., Kolonel L.N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer I.,* 92, 154 160.

Li F., Awale S., Tezuka Y., Kadota S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5434-5440.

Li H.N., Nie F.F. Liu W., Dai Q.S. Lu N., Qi Q., Li Z.Y., You Q.D., Guo Q.L. (2009). Apoptosis induction of oroxylin A in human cervical cancer HeLa cell line in vitro and in vivo. *Toxicology*, 257, 80-85.

Liang J., Tian Y.-X., Yang F., Zhang J.-P., Skibsted L.H. (2009). Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chem.* 115, 1437-1442.

Lin J.-K., Chen Y.-C., Huang Y.-T., Lin-Shiau S.-Y. (1997). Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J. Cell. Biochem*, 67, 39-48

Lin C.-M., Chen C.-S., Chen C.-T., Liang Y.-C., Lin J.-K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 294, 167-172.

Lin J.-P., Yang J.-S., Lu C.-C., Chiang J.-H., Wu C.-L., Lin J.-J., Lin H.-L., Yang M-D, Liuh K-C, Chiu T-H, Chung, J.-G. (2009). Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo. *Leuk. Res*., 33, 823-828

Liu B.P.L., Chong E.Y.Y., Cheung F.W.K., Duan J.A., Che C.T., Liu W.K. (2005). Tangutorine induces p21 expression and abnormal mitosis in human colon cancer HT-29 cells. *Biochem. Pharmacol*., 70, 287-299.

Li-Weber M. (2009). New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat. Rev.* 35, 57-68.

Lloyd D.R., Phillips D.H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) Fenton reactions: Evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut*., 424, 23-36.

Lobner, D., 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J. Neurosci. Meth*., 96, 147-152.

Lotito S. B, Frei B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med*., 41, 1727-1746.

Lu, S., Gough, A.W., Bobrowski, W.F., Stewart, B.H. (1996). Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J. Pharm. Sci* ., 85, 270-7357.

Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V., Biról. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta. Biol. Szeged.*, 47, 119-125.

Lugli E., Ferraresi R., Roat E., Troiano L., Pinti M., Nasi M., Nemes E., Bertoncelli L., Gibellini L., Salomoni P., Cooper E. L., Cossarizza, A. (2009). Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. *Leukemia Res*., 33, 140-150.

Ma X.-M., Liu Y., Shi Y.-P. (2007). Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from Ixeridium gracile (DC.) SHIH. *Chem. Biodiv*., 4, 2172-2181.

Mai T.T.N., Suresh A., Yasuhiro T., Quan L. T., Hiroshi W., and Shigetoshi K., (2004). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1414-1421.

Maksoud S.A., El-Hadidi M.N. (1988). The flavonoids of *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae) from Egypt. *Plant Syst. Evol*, 106, 153-158.

Manach C., Morand C., Demigne C., Texier O., Regerat F., C. Rémésy C., (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS Lett*., 409, 12-16.

Manach C., Donovan J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans, *Free Rad. Res*., 38, 771-785.

Man-Ying Chan M., Mattiacci J.A., Hwang H.S., Shah A., Fong D. (2000). Synergy between ethanol and the grape polyphenols quercetin and resveratrol in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem. Pharmacol*., 60, 1539-1548.

Marcheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, ISBN 2880746256, 9782880746254. 84-86.

Mario E. G., Andreas L., (2008). Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.*, 266, 73-83.

Mariotte A.M., Perrier E, Boumendjel A, bresson-Rival D., (2001). Flavonoid esters and their use notably in cosmetics, US 6235294.

Markham K.R., Ternai B., Stanley R., Geiger H., Mabry T.J. (1978) Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, 34, 1389-1397.

Martinez C., Yanez J., Vicente V., Alcaraz M., Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Lozano J. A. (2003). Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Res*., 13, 3-9.

Matsuo M., Sasaki N., Saga K., Kaneko T. (2005). Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (2), 253-259.

Mathiesen L., Malterud K.E. Sund R.B. (1997). Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from Myrica gale and structurally related acetophenones, *Free. Radic. Biol. Med.* 2, 307-311.

McPhail D.B., Hartley R.C., Gardner P.T., Duthie G.G. (2003). Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1684-1690.

Mellou F., Loutrari H., Stamatis H., Roussos C., Kolisis F.N. (2006). Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochem.* 41, 2029-2034.

Mellou F., Lazari D., Skaltsa H., Tselepis A.D., Kolisis F.N., Stamatis H. (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J. Biotechnol*., 116, 295-304.

Mercader A. G., Duchowicz P. R., Fernández F. M., Castro E. A., Bennardi D. O., Autino J. C., Romanelli G. P. (2008). QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorgan. Med. Chem.*, 16, 7470–7476.

Metodiewa D., Jaiswal A.K., Cenas N., Dickancaite E., Segura-Aguilar J. (1999). Quercetin may actas a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med*., 26, 107-116.

Michels G., Mohamed G.A., Weber N., Chovolou Y., Kampkötter A., Wätjen W., Proksch P. (2006). Effects of Methylated Derivatives of Luteolin Isolated from Cyperus alopecuroides in Rat H4IIE Hepatoma Cells. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98, 168-172.

Miller N.J., Rice-Evans C. (1997). Factor influencing the antioxydant activity determinated by the $ABTS^{\cdot+}$ radical cation assay. *Free Radic. Biol. Med*., 26, 195-199.

Miller N.J., Rice-Evans C.A. (1996). Spectrophotometric determinations of antioxydant activity. *Redox Rep*., 2, 161-171.

Miller N.J., Castelluccio C., Tijburg L., Rice-Evans C. (1996a). The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters--radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett.*, 392, 40-44.

Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. (1996b). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*., 384, 240-242.

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*., 84, 407-412.

Montoro P., Braca A., Pizza C., De Tommasi N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem*., 92, 349-355.

Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic. Biol. Med*., 34, 243- 253.

Morley K.L., Ferguson P.J., Koropatnick J. (2007). Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett.*, 251, 168-178.

Mosman T. (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

Moussa M., Boer M., Canton Y., Solé-Benet A. (2000). Cadre général physique des oasis Tunsiens de Mareth et Fatnassa. IMAROM Working Paper Series no.7.

Mutua L.N., Akoh C.C. (1993). Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp*. Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc*., 70, 43-46.

Musialik M., Kuzmicz R., Pawtowski T.S., Litwinienko G. (2009). Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem*, 74, 2699-2709.

Nagai S., Ohara K., Mukai K. (2005). Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. *J. Phys. Chem., B*., 109, 4234-4240.

Nakagawa K., Kawagoe M., Yoshimura M., Arata H., Minamikawa T., Nakamura M., Matsumoto A. (2000). Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions of mice. *J. Health Sci*., 46, 509-512.

Nakajima N., Ishihara K., Hamada H., Kawabe S.-I., Furuya T. (2000). Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 347-349.

Nakajima N., Ishihara K., Itoh T., Furuya T., Hamada H. (1999). Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 105-107.

Napier P.E., Lacerda H.M., Rosell C.M., Valivety R.H., Vaidya A.M., Halling P.J. (1996). Enhanced organic-phase enzymatic esterification with continuous water removal in a controlled air-bleed evacuated-headspace reactor. *Biotechnol. Progr*., 12, 47-50.

Natoli M., Nicolosi G., Piattelli M. (1992). Regioselective alcoholysis of flavonoid acetates with lipase in an organic solvent. *J. Organic Chem*., 57, 5776-5778.

Natoli M., Nicolosi G., Piattelli M. (1990). Enzyme-catalyzed alcoholysis of flavone acetates in organic solvent. *Tetrahedron Lett*., 31, 7371-7374.

Negre-Salvayre A., Mabile L., Delchambre J., Salvayre R. (1995). Alpha-Tocopherol, ascorbic acid, and rutin inhibit synergistically the copper-promoted LDL oxidation and the cytotoxicity of oxidized LDL to cultured endothelial cells. Biol. *Trace Elem. Res.*, 47, 81-91.

Nicolosi G., Patti A., Piatello M., Lambusta D., (1999). Biocatalytic process for the preparation of 3-O-acylflavonoids, WO9966062.

Nie X., Wang H. (2000). Preparation method of tea-polyphenol high-grade alihatic ester, CN 1263083.

Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr*., 74, 418-425.

Ohrner N., Orrenius C., Mattson A., Norin T., Hult K. (1996). Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme Microbial. Technol.*, 19, 328-331.

Oikawa S., Hirosawa I., Hirakawa K., Kawanishi S. (2001). Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis*, 22, 1239-1245.

Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J , Silman I., Schrag J., Sussman J.L., Verschueren K.H.G., Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng*., 5, 197-211.

Olthof M.R., Hollman P.C.H., Vree T.B., Katan M.B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'- glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.*, 130, 1200-1203.

Otto R.T., Scheib H., Bornscheuer U.T., Pleiss J., Syldatk C., Schmid R.D. (2000). Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 8, 201-211

Otto R.T., Bornscheuer U.T., Syldatk C., Schmid R.D. (1998). Synthesis of aromatic n-alkyl-glucoside esters in a coupled β-glucosidase and lipase reaction. *Biotechnol. Lett*., 20, 437-440.

Oyanagui Y. (1984). Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 142, 290-296.

Ozsoy N., Can A., Yanardag R., Akev N. (2008). Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. *Food Chem.,* 110, 571-583.

Paliwal S., Sundaram J., Mitragotri S. (2005). Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. *Brit. J. Cancer*, 92, 499-502.

Pan M.-H., Ho C.-T. (2008). Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem. Soc. Rev*., 37, 2558-2574.

Parejo I., Bastida J., Viladomat F., Codina C. (2005). Acylated quercetagetin glycosides with antioxidant activity from Tagetes maxima. *Phytochemistry*, 66, 2356-2362.

Passager P., Barbançon S. (1956). Taghit (Sahara oranais): étude historique, géographique et médicale. *Arch. Inst. Pasteur, Alger.*, 34, 404-475.

Passicos E., Santarelli X., Coulon D. (2004). Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnol. Lett*., 26, 1073-1076.

Patti A., Pattelli, M., Nicolosi G. (2000). Use of *Micor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins. *J. mol. Catal. B: Enzymatic*, 10, 577-582.

Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphénols. *Free Radical Res.,* 40, 1054-1065.

Perron N.R., Brumaghim J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochem Biophys 53, 75-100

Perusse P., Leech D. (2003). A voltammetric assay of antioxidants and inhibitors of soybean lipoxygenase. *Electroanal.*, 15, 573-578.

Peterson J., Dwyer J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.*,18, 1995-2018.

Pierini R., Kroon P.A., Guyot S., Johnson I.T., Belshaw N.J. (2008). The procyanidin-mediated induction of apoptosis and cell-cycle arrest in esophageal adenocarcinoma cells is not dependent on p21Cip1/WAF1. *Cancer Lett.* 270, 234-241.

Pinto M.d.C., Macias P. (2005). Oxidation of dietary polyphenolics by hydroperoxidase activity of lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9225-9230.

Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids,* 93, 67-80.

Plochmann K. Korte G. Koutsilieri E. Richling E. Riederer P. Rethwilm A. Schreier P. Scheller C. (2007). Structure–activity relationships of favonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys*, 460, 1-9.

Poli G., Albano E., Dianzani M.U. (1987). The role of lipid peroxidation in liver damage. Chem and Phys Lipids, 45, 117-142.

Potikha L., Kovtunenko V., Turelyk A., Turov A., Tolmachev A. (2008). Synthesis of fused pyrido[a]imidazoles. *Synthetic Commun.*, 38, 2061-2070.

Pottier-Alapetite G. (1979). G Flore de la Tunisie, Angiospermes-dicotylédones Apétales-Dialypetales, 291-293.

Psotová J. Lasousky J. Vičar J. (2003). Metal-chelating properties. Electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six naturel phenolics. *Biomed. papers*, 147, 147-153.

Putkonen T., Tolvanen A., Jokela R., (2001). First total synthesis of (±)-tangutorine. *Tetrahedron lett.*, 42, 6593-6594.

Putkonen T., Tolvanen A., Jokela R., Caccamese S., Parrinello N. (2003). Total synthesis of (±)- tangutorine and chiral HPLC separation of enantiomers .*Tetrahedron,* 59, 8589-8595.

Rajendran M., Manisankar P., Gandhidasan R., Murugesan R. (2004). Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Naturally Occurring Flavonoids: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.,* 52, 7389-7394.

Ramos S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem,* 18, 427-442.

Rankin S.M., Hoult J.R.S., Leake D.S. (1988). Effects of flavonoids on the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, 95, 727.

Rastija V., Medić-Šarić M. (2009). QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. European Journal of Medicinal Chemistry 44, 400-408.

Re R., Pellegrini N., A. Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med*., 26, 1231-1237.

Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier, O., Regerat F. Nutritional interest of flavonoids. (1996). *Med. Nutr*., 32, 17-27.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med*., 20, 933-956.

Rigano D., Formisano C., Basile A., Lavitola A., Senatore F., Rosselli S., Bruno M. (2007). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum ssp. Libanoticum*. *Phytother., Res.* 21, 395-397.

Riva S., Danieli B., Luisetti M. (1996). A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates. *J. Nat. Prod.* 59, 618-621.

Rivera D., Obón C., Heinrich M., Inocencio C., Verde A., Fajardo J. (2006). Gathered Mediterranean food plants--ethnobotanical investigations and historical development. *Forum Nutr.*, 59,18-74.

Sadik. CD, Sies H., Schewe T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of act. *Biochem. Pharmacol*., 65, 773-81.

Saglam, H., Pabuccuoglu, A., Kivçak, B. (2007). Antioxidant activity of Vitex agnus-castus L. extracts. *Phytother. Res.*, 21, 1059-1060.

Saija A. Tomaino A., Trombetta D., Luisa Pellegrino M., Tita B., Messina C., Bonina F. P. Rocco C. Nicolosi G. Castelli F. (2003). 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56, 167-174.

Sakai M., Suzuki M., Nanjo F., Hara, Y. (1994). 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP 0618203..

Saleh N., Ahmed A., Abdalla M., (1982). Flavonoids glycosides of *Tribulus Pentandrus* and *T.terrestris*. *Phytochemistry*, 21, 1995-2000.

Saleh N.A.M., El-Hadidi M.N. (1977). An Approach to the Chemosystematics of the Zygophyllaceae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 121-129.

Salah N., Mansour R., Markham K., (1990). An acylated isorhamnetin glycoside from *Aerva javanica*. *Phytochemistry*, 29, 1344-1345.

Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A. (1992). Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*., 78, 211–8.

Santaniello E., Ferrabosch P., Grisenti P., Manzocchi A. (1992). The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chem. Rev*., 92, 1071-1140.

Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agr*., 80, 1094-1117.

Saran M., Vetter G., Erben-Russ M., Winter R., Kruse A., Michel C., Bors W. (1987). Pulse radiolysis equipment: A setup for simultaneous multiwavelength kinetic spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum*., 58, 363-368.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Edition, Tec & Doc. Collection : sciences et techniques agro-al.

Scalbert A., Deprez S., Mila I., Albrecht A.-M., Huneau J.-F., Rabot S. (2000). Proanthocyanidins and human health: Systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors*, 13, 115 -120.

Schieber A., Keller P., Streker P., Klaiber I., Carle R. (2002). Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (Malus domestica cv. "Brettacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. *Phytochem. Analysis*, 13, 87-94.

Scrive M. (1990). Biologie et génétique, La science et les hommes / La vie, Éditions Messidor/ La farandole. Paris, 127.

Sekher Pannala A., Chan TS., O'Brien PJ., Rice-Evans C.A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282,1161-1168.

Shabana M.M., Mirhom Y.W., Genenah A.A., Aboutabl E.A., Amer H.A. (1990). Study into wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Ninth communication: hypoglycaemic activity of some selected plants in normal fasting and alloxanised rats. *Arch. Exp. Vet. Med*., 44, 389-394.

Sharma B., Viswanath G., Salunke R., Roy P. (2008). Effects of flavonoid-rich extract from seeds of Eugenia jambolana (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chem*., 110, 697-705.

Sheahan M.C., Chase M.W. (1996). A phytogenetic analysis of Zygophyllaceae based on morphological anatomical and rbc L DNA sequence data. *Bot.J.Linn.Soc*.122:279-300, illus. Peganaceae, Nitrariaceae supported.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidationof soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem*., 40, 945–948.

Shoji T., Masumoto S., Moriichi N., Akiyama H., Kanda T., Ohtake Y., Goda Y. (2006). Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: Analysis of procyanidins in plasma using the Porter method and high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem*., 54, 884-892.

Shoskes DA. (1998). Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*, 66, 147-52.

Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Di Bilio A.J., Bonomo R.P. (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against $O_2^{-\cdot}$. *Free Radical Biol. Med*., 11, 1-8.

Skrzypczak-Jankun E. Zhou K. Jankun J. (2003). Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 A reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. *Int. J. Mol. Med*., 12, 415-422.

Sokmen M., Angelova M., Krumova E., Pashova S., Ivancheva S., Sokmen A., Serkedjieva J. (2005). In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum L*. *Life Sci.* 76, 2981-2993.

Spencer J.P.E., Chowrimootoo G., Choudhury R., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.*, 458, 224-230.

Spencer J.P.E., Chaudry F., Pannala A.S., Srai S.K., Debnam E., Rice-Evans C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 272, 236-241.

Spivey A.C., Arseniyadis S. (2004). Nucleophilic catalysis by 4-(dialkylamino) pyridines revisited - The search for optimal reactivity and selectivity. *Angew. Chem. Int. Edit.* 43, 5436-5441.

Sroka Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch. C*, 60, 833-843.

Stahl W., Sies H. (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 46, S14-S18.

Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N. (2001). Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 11, 323-328.

Stevenson D.E., Wibisono R., Jensen D.J., Stanley R.A., Cooney J.M. (2006). Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by Candida antarctica lipase B (Novozym 435®). *Enzyme Microbial. Technol.* 39, 1236-1241.

Sudhersan C., Abo El-Nil M., Hussain J. (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *J. Arid Environ*., 54, 133-147

Sun J., Khtan B., Huang S-H., Whiteman M. et Zhu Y-Z. (2002). Effects of natural products on Eschemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta. Pharmaco.*, 23, 1142-1151.

Suresh Babu K., Hari Babu T., Srinivas P.V., Sastry B.S., Hara Kishore K., Murty U.S.N., Madhusudana Rao J. (2005). Synthesis and in vitro study of novel 7-O-acyl derivatives of Oroxylin a as antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3953-3956.

Susanti D., Sirat H.M., Ahmad F., Ali R.M., Aimi N., Kitajima M. (2007). Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of Melastoma malabathricum L. *Food Chem.*, 103, 710-716

Szent-Gyorgyi A. (1938). Methoden zur Herstellung von citrin. *Physiol. Chem*., 255,126-131.

Täckholm V. (1978). Oknen bommar, 151.

Täckholm V. (1974). Student's Flora of Egypt, 2nd edn, Cairo University, Cooperative Printing Company, Beirut, 31, 313, 868.

Täckholm V., Boulos L. (1972). Supplementary Notes to Students Flora of Egypt, 2nd Edn, Publication of the Cairo University Herbarium, 5, 85.

Tamura H., Yamagami A. (1994). Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J. Agricult. Food Chem*., 42, 1612-1615.

Teillet, F., Boumendjel, A., Boutonnat, J., Ronot, X. (2008). Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med. Res. Rev*., 28, 715-745.

Teng B.-s., Lu Y.-H., Wang Z.-T., Tao X.-Y., Wei D.-Z. (2006). In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from Hippophae rhamnoides L. against BEL-7402 cells. *Pharmacol. Res*., 54, 186-194.

Terao J., Piskula M.K. (1998). Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In Flavonoids in health and disease, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York.

Terra X., Valls J., Vitrac X., Mérrillon J.-M., Arola L., Ardèvol A., Bladé C., Fernández-Larrea J., Pujadas G., Salvadó J., Blay M. (2007) Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4357-4365.

Trivedi R., Kumar S., Kumar A., Siddiquia J. A., Swarnkara G., Gupta V., Kendurker A., Kumar Dwivedi A., Romero J. R., Chattopadhyaya N. (2008). Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague–Dawley rats. *Mol. Cell. Endocrinol*., 289, 85-93.

Trotter A. (1915). Flora economica della Libia, Publiciti a cura del Ministro delle colonie Roma, 375.

Tsang C., Auger C., Mullen W., Bornet A., et al., (2005). The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins followintg the ingestion of grape seed extract by rats. *Brit. J. Nutr.*, 94, 170–181.

Turner N.A., Vulfson E.N. (2000). At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microbia.l Technol.* 27, 108-113.

Uppenberg J., Öhrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthomen T., Alwyn Jones T. (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, 34, 16838-16851.

Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar,S., Jones T.A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Structure*, 2, 293-308.

Uppenberg J., Patkar S., Bergfors T., Jones T.A. (1994). Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida Antarctica. J. Mol. Biol*., 235, 790-792.

Ushio-Fukai M., Nakamura Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*., 266, 37-52.

Valivety R.H., Johnston G.A., Suckling C.J., Halling P.J. (1991). Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. *Biotechnol. Bioeng*., 38, 1137-1143.

Van Acker S.A.B.E., Van Balen G.P., Van Den Berg D.-J., Bast A., Van Der Vijgh W.J.F. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*., 56, 935-943.

Van Acker S. A. B. E., Van Den Berg D.-j., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., Van Der Vijgh W. J. F., Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol. Med*., 20, 331-342.

Van Der Woude H., Alink G.M., Van Rossum B.E.J., Walle K., Van Steeg H., Walle T., Rietjens I.M.C.M. (2005). Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol*., 18, 1907-1916.

Vercauteren J., Weber J.-F., Bisson J.-L., Bignon, J. (1994). Polyphenol derivative compositions and preparation thereof, FR2706478.

Villeneuve, P. Lipases in lipophilization reactions. (2007). *Biotechnol. Adv.* 25, 515-536.

Waghmare N.G., Kasinathan P., Amrute A., Lucas N., Halligudi S.B. (2008). Titania supported silicotungstic acid: An efficient solid acid catalyst for veratrole acylation. Catal. Commun. 9, 2026-2029.

Walle T., Walle U.K., Halushka P.V. (2001). Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J. Nutr.* 131, 2648-2652.

Wang J., Mazza G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN-γ-Activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food chem.*, 50, 4183-4189.

Wang H., Gao X.D., Zhou G.C., Cai L., Yao W.B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit. *Food Chem.* 106, 888-895.

Wang H., Wang X., You J., Suo Y., Zhao X., Yulin Li Y., Ding C. (2007). Comparative Analysis of Allantoin, Quercetin, and 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydro-β-Carboline-3-Carboxylic Acid in Nitraria tangutorum Bobr. Seed by HPLC-APCI-MS and CE. *J Liq. Chromatogr. R. T.*, 30, 363 -376.

Ward N. C., Croft K. D., Puddey I. B., Hodgson J. M. (2004). Supplementation with grape seed polyphenols results in increased urinary excretion of 3-hydroxyphenylpropionic

acid, an important metabolite of proanthocyanidins in humans, *J. Agric. Food Chem*, 52, 5545-5549.

Watson L. et Dallwitz M.J. (1992) onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 10th April 2008.

Wehtje E., Adlercreutz P. (1997). Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 798-806.

Wehtje E., Svensson I., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1993). Continuous control of water activity during biocatalysis in organic media. *Biotechnol. Tech.* 7, 873-878.

Wei Y., Held I., Zipse H. (2006). Stacking interactions as the principal design element in acyl-transfer catalysts. *Org. Biomol. Chem.* 4, 4223-4230.

Weissburger, J.H. (1997). Tea and health: a historical perspective. *Cancer Lett*. 114, 315-317.

Wickramasinghe S.N., Hasan R., Khalpey Z. (1996). Differences in the serum levels of acetaldehyde and cytotoxic acetaldehyde-albumin complexes after the consumption of red and white wine: in vitro effects of flavonoids, vitamin E, and other dietary antioxidants on cytotoxic complexes. *Alcohol. Clin. Exp. Res*., 20, 799-803.

Win W., Cao Z., Peng X., Trush M.A., Li Y. (2002). Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro *Mutat. Res.*, 513, 113-120.

Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. Structure of human pancreatic lipase. (1990). *Nature*, 343,771-774

Wolfe J. T., Ross D., Cohen G. M. (1994). A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett*., 352, 58-62

Wolfe K.L., Liu R.H. (2008). Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J. Agricult. Food Chem.*, 56, 8404-8411.

Woudenberg-Van Oosterom, M., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (1996). Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng* 49, 328-333.

Xing S.R. (1991). Ningxia Medicinal Flora, Vol. 2. Ningxia People's Publishing House,Nigrmia, China.

Xu W., Liu J. , Li C., Wu H.-Z., Liu Y.-W. (2008). Kaempferol-7-O-β-d-glucoside (KG) isolated from Smilax china L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. *Cancer lett*.. 264, 229-240.

Yahya A.R.M., Anderson W.A., Moo-Young M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb. Technol*., 23, 438-450.

Yamada S., Misono T., Iwai Y., Masumizu A., Akiyama Y. (2006). New class of pyridine catalyst having a conformation switch system: Asymmetric acylation of various sec-alcohols. *J. Org. Chem.*, 71, 6872-6880.

Yamashita N., Tanemura H., Kawanishi S. (1999). Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutat. Res*.,425, 107-115.

Yang C.S., Sang S., Lambert J.D., Lee M.-J. (2008). Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. M*ol. Nutr. Food Res.*, 52, S139-S151.

Yasuhiro T., Kumiko H.A., Hideki H., Lin Z.,Yoshinori K., Shiro K., Michael A.B. (2005). Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase . *Life Sci.,* 76, 1835-1847.

Yochum L., Kushi L.H., Meyer K., Folsom A.R., (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol*., 149, 943-949.

Yourui S., Hang G., Hanqing W. (2004). Chemical constituents of seed oil extracted by SFE-CO_2. Lanzhou institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Peop. Rep. China. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 16, 16-18.

Yu F.R., Lian S.J., Lian X.Z. (2008). Cytotoxic and proliferous effects of *Nitraria tangutorum* flavone on human A-704 strain cells. *Chin. Pharmacol. Bull*., 24, 236-239.

Zhang Q., Zhao X.-H., Wang Z.-J. (2008). Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2042-2053.

Zhang Q., Chen L.-J., Ye H.-Y., Gao L., Hou W., Tang M., Yang G., Zhong Z., Yuan Y. Peng, A. (2007). Isolation and purification of ginkgo flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves by high-speed counter-current chromatography. *J. Sep. Sci.,* 30 (13), 2153-2159.

Zhong-Jian J., Guangjun Z., Jihe W. (1989). Flavonoid constituents of the seeds of *Nitraria tangutorum* Bolor Inst. Org. Chem., Lanzhou Univ., Lanzhou, Peop. Rep. China. Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 27, 102-7.

Zhou J., Wang, L., Wang J., Tang N. (2001a). Antioxidative and antitumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. *Transition Met. Chem*., 26, 57-63.

Zhou J., Wang L.-F., Wang J.-Y., Tang N. (2001b). Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. *J. Inorg. Biochem*., 83, 41-48.

Ziaee A., Zamansoltani F., Nassiri-Asl M., Abbasi E. (2009). Effects of rutin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 104, 253-258.

Zohary M. (1973). Geobotanical Foundations of the Middle East. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Nom du document : these hadj salem2.doc
Répertoire : C:\Documents and Settings\PROPRIETAIRE\Bureau
Modèle : C:\Documents and Settings\PROPRIETAIRE\Application Data\Microsoft\Modèles\Normal.dot
Titre : INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Sujet :
Auteur : PROPRIETAIRE
Mots clés :
Commentaires :
Date de création : 03/12/2009 03:49:00
N° de révision : 2
Dernier enregistr. le : 03/12/2009 03:49:00
Dernier enregistrement par : PROPRIETAIRE
Temps total d'édition :8 Minutes
Dernière impression sur : 03/12/2009 12:35:00
Tel qu'à la dernière impression
Nombre de pages : 266
Nombre de mots : 106 996 (approx.)
Nombre de caractères : 621 649 (approx.)

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Fabienne GUERARD, Professeur, Université de Brest, Plouzané

Monsieur Eric GONTIER, Professeur, Université de Picardie, Amiens

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame HADJ SALEM Jamila

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria retusa et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 30 septembre 2009

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé de la thèse

Ce travail a consisté, dans un premier temps, à extraire et à identifier les flavonoïdes majeurs contenus dans les feuilles de *Nitraria retusa* et à évaluer leurs activités biologiques. Quatre flavonoïdes ont été identifiés dans les extraits et les fractions obtenus : l'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-O-glucoside et les deux isomères isorhamnétine-3-O-rutinoside et isorhamnétine-3-O-robinobioside.
L'étude des activités biologiques des extraits et des fractions de *N. retusa* a permis d'établir une relation linéaire entre leur teneur en flavonoïdes et leurs activités antioxydantes et antiprolifératives, les milieux les plus riches présentant les activités les plus importantes. Ces activités dépendent également de la nature des flavonoïdes présents ; ainsi, la très forte activité d'inhibition de la xanthine oxydase relevée pour la fraction au chloroforme et sa grande capacité à piéger le radical DPPH ont été attribuées à sa teneur élevée en isorhamnétine, flavonoïde aglycone présentant une grande analogie structurale avec la quercétine, molécule bien connue pour ses activités antioxydantes.
Dans un deuxième temps, l'acylation enzymatique de l'isoquercitrine, flavonoïde modèle, et de l'isorhamnétine-3-O-glucoside a été étudiée pour tenter d'améliorer leurs propriétés.
L'acylation enzymatique de l'isoquercitrine par des esters éthyliques d'acides gras de différentes longueurs de chaîne, catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*, a montré que les performances de la réaction sont inversement proportionnelles à la longueur de la chaîne du donneur d'acyle. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'acylation de l'isorhamnétine-3-O-glucoside. Les activités des esters d'isoquercitrine et d'isorhamnétine-3-O-glucoside ont été évaluées et comparées à celles des flavonoïdes non acylés. Les esters ont montré des activités antiprolifératives vis-à-vis de cellules Caco2 et d'inhibition de la xanthine oxydase plus importantes que celles des molécules d'origine. Finalement, ce travail a permis d'apporter des éléments de compréhension de la relation structure-activité de flavonoïdes et de leurs dérivés acylés.

Mots clés : *Nitraria retusa*, flavonoïdes, acylation enzymatique, activité antioxydante, activité antiproliférative

Abstract

The present work firstly consisted in studying the extraction and the identification of major flavonoids contained in *Nitraria retusa* leaves and evaluating their biological activities. Four flavonoids were identified in extracts and fractions: isorhamnetin, isorhamnetin-3-O-glucoside and the two isomers isorhamnetin-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-robinobioside. The evaluation of the biological activities of extracts and fractions of *N. retusa* allowed to establish a linear relationship between their antioxidant and antiproliferative activities and their total flavonoids content, the most enriched exhibiting the highest activities. The nature of the flavonoids present in the extracts and fractions was shown to be important too. Thus, the strong xanthine oxidase inhibition activity and the high DPPH radical scavenging capacity observed for the chloroform fraction can be attributed to its high content in the aglycone flavonoid isorhamnetin, a structural analogue of quercetin which is well known for its antioxidant activities.
In a second part, the enzymatic acylation of isoquercitrin as a model compound and isorhamnetin-3-O-glucoside was studied in order to improve their properties. The enzymatic acylation of isoquercitrin by fatty acid ethyl esters of different chain lengths, catalyzed by the lipase B of *Candida antarctica*, showed that the performance of the reaction is inversely proportional to the acyl donor chain length. Similar results were obtained when acylating the isorhamnetin-3-O-glucoside. The activities of isoquercitrin and isorhamnetin-3-O-glucoside esters were determined and compared to that of initial flavonoids. Esters exhibited higher antiproliferative towards Caco2 cells and xanthine oxidase inhibition activities than original compounds. Finally, this work led to a better understanding of the structure-activity relationship of flavonoids and their acylated derivatives.

Keywords: *Nitraria. retusa*, flavonoids, enzymatic acylation, antioxidant activity, antiproliferative activity