

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé

Faculté de Pharmacie

ANNEE 2003

N°

RADIOLYSE GAMMA DES FLAVONOIDES. ETUDE DE
LEUR REACTIVITE AVEC LES RADICAUX ISSUS DES
ALCOOLS : FORMATION DE DEPSIDES.

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Spécialité : Biophysique

Présentée et soutenue publiquement par

Abdelghafour MARFAK

Le 12 Décembre 2003

Membres du Jury

MIALOCQ J. C.	Directeur de recherche	CEA Saclay	Président
HOUEE-LEVIN C.	Professeur	Paris Sud	Rapporteur
CHAOUCH A.	Professeur	Kénitra (MAROC)	Rapporteur
DUROUX J. L.	Professeur	Limoges	Examineur
ALLAIS D. P.	Maître de Conférences	Limoges	Examineur
TROUILLAS P.	Maître de Conférences	Limoges	Examineur

REMERCIEMENTS

*J*e tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Claude Mialocq qui m'a honoré en acceptant d'être président de ce jury et pour ses précieux conseils.

*J*e remercie Madame Chantal Houée-Levin pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ma thèse, pour avoir jugé ce travail et pour ses conseils importants et pertinents donnés à la suite de notre rencontre.

*J*e remercie également Monsieur Aziz Chaouch d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'être présent ici aujourd'hui, présence qui a nécessité un déplacement du Maroc.

*J*e tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Jean-Luc Duroux pour la confiance qu'il m'a témoigné et pour le temps qu'il a consacré pour diriger cette thèse.

*L*e travail de thèse étant un travail d'équipe, je remercie tout particulièrement Madame Daovy-Paulette Allais et Monsieur Patrick Trouillas pour leur aide et pour avoir suivi de très près l'évolution de ce travail. Merci à Patrick pour sa vision éclairée du secteur de la modélisation moléculaire apportée à cette thèse.

J'associe à mes remerciements Monsieur Yves Champavier et Madame Hayat Lotfi pour leur précieuse collaboration.

*M*erci à mon ancien voisin de bureau, Monsieur Claude-Alain Calliste, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

*J*e tiens à remercier Monsieur Philippe Vignoles et Redouane ainsi que l'ensemble des membres du laboratoire de biophysique.

Abréviations

ADH	Alcool Déshydrogénase
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase
BDE	Bond Dissociation Enthalpy
CAT	Catalase
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
COSY	Correlation Spectroscopy
DPPH	2,2-diphénylpicrylhydrazyl
GPX	Glutathiumperoxydase
GSH	γ -glutamyl-cystéinyl-glycine
GSSH	Gluthation-disulfure
HER	1-Hydroxyethyl radical
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMR	1-Hydroxymethyl radical
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
IC ₅₀	Concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence
LC-MS	Chromatographie Liquide / Spectroscopie de Masse
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SOD	Superoxyde dismutase
SOMO	Singlet Occupied Molecular Orbital
XO	Xanthine Oxydase

LISTE DES PUBLICATIONS

1. Reactivity of flavonoids with 1-hydroxyethyl radical: a γ -radiolysis study.

Abdelghafour MARFAK, Patrick TROUILLAS, Daovy-Paulette ALLAIS, Claude-Alain CALLISTE, Jeanne COOK-MOREAU and Jean Luc DUROUX.

Biochimica et Biophysica Acta-General Subject- (2004), **1670**, 28-39. (Facteur d'impact 2003 : 2,37)

2. Transformation mechanism of the antioxydant kaempferol into depsides. γ -Radiolysis study in methanol and in ethanol.

Abdelghafour MARFAK, Patrick TROUILLAS, Daovy-Paulette ALLAIS, Claude-Alain CALLISTE, Jeanne COOK-MOREAU and Jean Luc DUROUX.

Radiation Research (2003), **160 (3)**, 355-365. (Facteur d'impact 2003 : 2,47)

3. Redox reactions obtained by gamma irradiation of quercetin methanol solution are similar to in vivo metabolism.

Abdelghafour MARFAK, Patrick TROUILLAS, Daovy-Paulette ALLAIS, Claude-Alain CALLISTE and Jean Luc DUROUX.

Radiation Research (2003), **159 (2)**, 218-227. (Facteur d'impact 2003 : 2,47)

4. Radiolysis of kaempferol in water/methanol mixtures. Evaluation of antioxidant activity of kaempferol and products formed.

Abdelghafour MARFAK, Patrick TROUILLAS, Daovy-Paulette ALLAIS, Yves CHAMPAVIER, Claude-Alain CALLISTE and Jean Luc DUROUX.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2003), **51 (5)**, 1270-1277. (Facteur d'impact : 1,57)

5. Radiolysis of quercetin in methanol solution : observation of depside formation.

Abdelghafour MARFAK, Patrick TROUILLAS, Daovy-Paulette ALLAIS, Yves CHAMPAVIER, Claude-Alain CALLISTE and Jean Luc DUROUX.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2002), **50 (17)**, 4827-4833. (Facteur d'impact : 1,57)

6. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal tea.

Patrick TROUILLAS, Claude-Alain CALLISTE, Daovy-Paulette ALLAIS, Alain SIMON, Abdelghafour MARFAK, Christiane DELAGE and Jean Luc DUROUX.

Food Chemistry (2003), **80 (3)**, 399-407. (Facteur d'impact 2003 : 1,15)

7. A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical scavenging activity.

Patrick TROUILLAS, Catherine FAGNERE, Roberto LAZARONI, Claude-Alain CALLISTE, Abdelghafour MARFAK and Jean Luc DUROUX.

Food Chemistry (2004), **88**, 571-582. (Facteur d'impact 2003 : 1,15)

Table des Matières

INTRODUCTION	1
--------------	---

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LES RADICAUX LIBRES OXYGENES ET FORMATION DES RADICAUX DERIVES DES ALCOOLS

INTRODUCTION	5
--------------	---

I. DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE	6
---	----------

I.1. FORMATION	6
----------------	---

I.1.1. Le radical superoxyde 6

I.1.2. Le peroxyde d'hydrogène 7

I.1.3. Le radical hydroxyle 7

I.1.4. Les radicaux peroxydes 8

I.1.5. Les hydroperoxydes organiques 8

I.1.6. Les radicaux alcoxydes 8

I.2. SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES ROS : ANTIOXYDANTS ENDOGENES	9
--	---

I.2.1. La prévention à plein temps 9

I.2.2. La détoxification active suite à un stress oxydatif 10

a) La superoxyde dismutase 10

b) La catalase 10

c) Les glutathion peroxydases et réductases 10

I.2.2. La détoxification passive 11

II. STRESS OXYDANT ET MALADIES ALCOOLIQUES DU FOIE	12
---	-----------

II.1. ENZYMES DU METABOLISME DE L'ETHANOL	13
---	----

II.1.1. Alcool déshydrogénase 13

II.1.2. Aldéhyde déshydrogénase (ALDH) 13

II.1.3. Cytochrome P450E1 (CYP2E1) 14

II.2. MECANISMES RADICALAIRES INDUITS PAR L'ETHANOL DANS LE FOIE	14
--	----

II.2.1. Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) 15

II.2.2. Formation du radical 1-hydroxyethyl dérivé de l'éthanol 16

a) Rôle de $\cdot\text{OH}$ 16

b) Rôle de CYP2E1 17

c) Rôle de l'hydrogène peroxyde, du superoxyde et du fer 17

II.3. IMPLICATION DE HER DANS LES MALADIES DU FOIE LIEES A LA CONSOMMATION D'ALCOOL	18
---	----

II.4. L'INTOXICATION AU METHANOL : FORMATION DU RADICAL 1-HYDROXYMETHYL	20
---	----

CHAPITRE II : LES FLAVONOÏDES

INTRODUCTION	23
I. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION	24
I.1. FLAVONES ET FLAVONOLS	26
I.2. FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS	26
I.3. FLAVAN-3-OLS, FLAVAN-3,4-DIOLS ET ANTHOCYANIDOLS	26
I.4. CHALCONES ET AURONES	27
II. DISTRIBUTION ET LOCALISATION	28
III. PROPRIETES DES FLAVONOÏDES	29
III.1. LES FLAVONOÏDES COMME ANTIOXYDANTS	30
<i>III.1.1. Inhibition enzymatique</i>	30
<i>III.1.2. Chélation des ions métalliques</i>	33
<i>III.1.3 Piégeage des radicaux libres</i>	34
a) <u>Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyphénols</u>	35
b) <u>Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B</u>	35
c) <u>Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et la double liaison C2-C3</u>	37
d) <u>L'effet de la glycosylation sur l'activité des flavones et flavanones</u>	38
e) <u>Anthocyanidols</u>	38
III.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES	40
<i>III.2.1. Effets antiallergiques</i>	40
<i>III.2.2. Effets anti-inflammatoires</i>	40
<i>III.2.3. Effets anti-ulcéreux</i>	41
<i>III.2.4. Effets anticancéreux</i>	41
<i>III.2.5. D'autres effets biologiques</i>	42

CHAPITRE III

LA TECHNIQUE DE L'IRRADIATION : APPLICATION A LA CONSERVATION DES ALIMENTS

INTRODUCTION	43
I. CONSERVATION DES ALIMENTS PAR IRRADIATION	44
I.1. FACTEURS D'ALTERATION DES PRODUITS ALIMENTAIRES	44
<i>I.1.1. Les altérations d'origines internes : actions enzymatiques</i>	45
<i>I.1.2. Les altérations d'origines externes</i>	45
I.2. TRAITEMENT PAR IRRADIATION IONISANTE	47
<i>I.2.1. Rayonnements ionisants</i>	47
<i>I.2.2. Rayonnements ionisants utilisés dans le traitement des aliments</i>	49
<i>I.2.3. Définition de la dose</i>	51
a) <u>Traitement à faibles doses : inhibition de la germination et désinsectisation</u>	51
b) <u>Traitement à doses moyennes</u>	52
c) <u>Traitement à fortes doses</u>	53

I.3. APPLICATIONS DE L'IONISATION AUX FRUITS ET LEGUMES	54
<i>I.3.1. Fruits</i>	54
a) <u>Fraises</u>	54
b) <u>Framboises</u>	55
c) <u>Pruneau</u>	55
d) <u>Pommes et poires</u>	55
e) <u>Mangue et papaye</u>	55
<i>I.3.2. Légumes</i>	56
a) <u>Pommes de terre</u>	56
b) <u>Ails, oignons et échalotes</u>	56
c) <u>Champignons</u>	56
I.4. EFFET DE L'IRRADIATION SUR LES FLAVONOIDES PRESENTS DANS LES FRUITS	57
<i>I.4.1. Fraises</i>	57
<i>I.4.2. Clémentine</i>	59

CHAPITRE IV

RADIOLYSE DES SOLUTIONS

INTRODUCTION	61
I. LES ETAPES DE LA RADIOLYSE DES LIQUIDES	61
II. RADIOLYSE DE L'EAU	62
III. RADIOLYSE DU METHANOL	64
IV. RADIOLYSE DE L'ETHANOL	68
V. COURBE DE DILUTION	70

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE V

MATERIELS ET METHODES

I. IRRADIATION	73
I.1. APPAREILLAGE	73
I.2. CHOIX DES CONCENTRATIONS	73
I.3. MODE OPERATOIRE	74
II. LES ANALYSES DES ECHANTILLONS IRRADIES	74
II.1. APPAREILLAGE	74
II.2. MODE OPERATOIRE	74

III. PURIFICATION DES ECHANTILLONS IRRADIES	75
IV. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES	75
IV.1. RMN	75
IV.2. LC-MS	76
V. MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	76
V.1. ACTIVITE ANTI-SUPEROXYDE ET CHIMILUMINESCENCE	77
<i>V.1.1. Appareillage</i>	77
<i>V.1.2. Principe</i>	77
<i>V.1.3. Mode opératoire</i>	79
<i>V.1.4. Calcul du pourcentage d'inhibition</i>	79
V.2. ACTIVITE ANTI-DPPH ET RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE	80
<i>V.2.1. Principe de la RPE</i>	80
<i>V.2.2. Le radical DPPH</i>	82
<i>V.2.3. Mode opératoire</i>	83
VI. MESURE DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE	84
VI.1. METHODE	84
VI.2. MODE OPERATOIRE	84
VII. MODELISATION MOLECULAIRE	85
VII.1. LES METHODES UTILISEES EN MODELISATION MOLECULAIRE	85
<i>VII.1.1. La mécanique moléculaire</i>	85
<i>VII.1.2. La mécanique quantique</i>	86
VII.2. CONFORMATION	87
VII.3. RAPPELS SUR LES PROPRIETES ELECTRONIQUES DES MOLECULES ET DES RADICAUX	88

CHAPITRE VI

RADIOLYSE DES FLAVONOIDES DANS LE METHANOL ET L'ETHANOL

INTRODUCTION	91
I. RADIOLYSE DES FLAVONOIDES DANS LE METHANOL	91
I.1. RADIOLYSE DE LA QUERCETINE	91
<i>I.1.1. Identification des produits radiolytiques de la quercétine</i>	95
a) <u>Spectres UV de QM1 et QM2</u>	96
b) <u>Spectres RMN de QM1 et QM2</u>	97
c) <u>Spectres de masse de QM1 et QM2</u>	100
d) <u>Confirmation de la connexion entre les cycles A et B de QM1 et de QM2</u>	101
e) <u>Equilibre chimique entre QM1 et QM2</u>	103
f) <u>Stabilité des produits de radiolyse au cours de l'irradiation</u>	103

I.2. RADIOLYSE DES FLAVONOIDES DANS LE METHANOL : GENERALISATION	104
<i>I.2.1. Identification des produits de radiolyse des flavonols</i>	108
a) <u>Spectres UV/Visible</u>	108
b) <u>Spectres RMN des produits de radiolyse</u>	108
c) <u>Confirmation par LC-MS</u>	115
II. RADIOLYSE DES FLAVONOIDES DANS L'ETHANOL	118
II.1. SPECTRES UV/VISIBLE DES PRODUITS RADIOLYTIQUES	120
II.2. SPECTRES RMN DES PRODUITS RADIOLYTIQUES	120
III. MECANISME DE TRANSFORMATION DES FLAVONOLS EN DEPSIDES	126
III.1. RENDEMENT RADIOLYTIQUE ET COURBE DE DILUTION	126
III.2. CONFIRMATION DES PREMIERES ETAPES DU MECANISME DE TRANSFORMATION DES FLAVONOLS EN DEPSIDES PAR MODELISATION MOLECULAIRE	135
IV. COMPARAISON AVEC LA DEGRADATION DES FLAVONOIDES PAR CERTAINES ENZYMES	138
V. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES FLAVONOIDES EN TANT QUE PIEGEURS DES RADICAUX DERIVES D'ALCOOLS	140
V.1. CALCUL DES CONSTANTES DE VITESSE DE REACTION DES FLAVONOLS AVEC HMR ET HER POUR LE PREMIER MECANISME	140
V.2. LA TRANSFORMATION FLAVONOLS-DEPSIDES : LE MECANISME CORRIGE (CALCUL DES CONSTANTES DE VITESSE DE REACTION)	145
V.3. RELATION ENTRE CONSTANTES DE VITESSE DE REACTION ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE	156

CHAPITRE VII

RADIOLYSE DES FLAVONOIDES DANS DES MELANGES EAU/METHANOL : APPLICATION AU TRAITEMENT DES ALIMENTS PAR IRRADIATION

INTRODUCTION	159
I. IRRADIATION DES FLAVONOIDES DANS DES MELANGES EAU/METHANOL	160
II. CONTRIBUTION DE L'EAU ET DE SES ESPECES RADIOLYTIQUES DANS LA DEGRADATION DES FLAVONOLS	168
III. COMPARAISON AVEC LE TRAITEMENT DES FRAISES PAR IRRADIATION	172
IV. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES FLAVONOLS ET DE LEURS PRODUITS DE RADIOLYSE	174
IV.1. ACTIVITE ANTI-SUPEROXYDE ET ANTI-DPPH	174
IV.2. INHIBITION DE LA XANTHINE OXYDASE	176

V. MODELISATION MOLECULAIRE ET DEPSIDES	178
V.1. CONFORMATION GEOMETRIQUE	178
V.2. DETERMINATION DE LA DISTRIBUTION HOMO	179
V.3. BDE	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	183
REFERENCES	187

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Cependant, dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxydes (ROO^\bullet), alcoxydes (RO^\bullet), superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et hydroxydes (HO^\bullet). Ces radicaux centrés sur l'oxygène (appelés ainsi parce que l'électron célibataire est porté par l'atome d'oxygène) sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS : Reactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne). Il a été démontré que les ROS oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN. Ces dommages oxydatifs sont considérés comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (*Gutteridge, 1993*).

Les ROS ne sont pas les seuls radicaux formés au sein de notre organisme, puisque l'on a observé au niveau du foie, organe principal du métabolisme, la formation d'espèces réactives appartenant à la famille des radicaux centrés sur le carbone, notamment le radical 1-hydroxyméthyl ($^\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ ou HMR : Hydroxymethyl Radical) et le radical 1-hydroxyéthyl ($\text{CH}_3^\bullet\text{CHOH}$ ou HER : Hydroxyethyl Radical) (*Albano, 1987 ; Reinke, 1987 ; Nordmann, 1990 ; Kadiiska, 2000*). Ceux-ci sont produits, après une administration importante ou chronique d'alcool, soit indirectement par une voie radicalaire résultant de l'attaque de l'éthanol ou du méthanol par les radicaux hydroxydes, soit directement par une voie enzymatique faisant intervenir le cytochrome P450 (CYP2E1). Il a été rapporté que ces radicaux sont, en partie, responsables des maladies hépatiques d'origine alcoolique.

Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène est formé par des enzymes qui agissent en synergie, à savoir la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD). En effet, la SOD transforme le superoxyde en peroxyde

d'hydrogène tandis que la catalase métabolise ce dernier en une molécule d'eau et une autre d'oxygène.

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes. Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes.

Les flavonoïdes (**Figure 1**) constituent un groupe de produits naturels appartenant à la famille des polyphénols. Dans certaines conditions, ils se transforment par des enzymes telle que la quercétine 2,3-dioxygénase en depsides (*Oka, 1972 ; Kooter, 2002*) similaires à ceux que nous avons identifiés dans notre travail (**Figure 2**). Structuralement parlant, les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols.

Les flavonoïdes sont largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, notamment dans les fruits et les légumes. Ils sont également présents dans le vin rouge et le thé. Les céréales, les épices et les herbes aromatiques (persil, thym, céleri) sont considérés aussi comme des sources importantes de flavonoïdes. Des études épidémiologiques ont démontré qu'une consommation régulière de fruits frais et de légumes diminue le risque de développement des maladies cardiovasculaires et d'apparition de certains cancers (*Hertog, 1993*). Ces effets sont attribués, en partie, aux concentrations relativement importantes des flavonoïdes présents dans ces aliments.

Les flavonoïdes sont également reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités anti-allergiques, antivirales (*Van Hoof, 1984*) et anti-inflammatoires (*Brasseur, 1989*). Ces activités sont en général attribuées à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux.

La réactivité des flavonoïdes avec les espèces réactives de l'oxygène (hydroxyle et superoxyde) a fait l'objet de nombreuses études (*Cotelle, 1996 ; Rice-Evans, 1996 ;*

Jovanovic, 1994 ; Pietta, 2000 ; Cos, 1998). Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a été consacrée à l'établissement de la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux dérivés des alcools, notamment HER et HMR. Le travail que nous présenterons ici est lié à cette problématique.

Les radicaux HER et HMR ont été produits par l'irradiation de flavonoïdes en solutions méthanoliques et éthanoliques. Un grand nombre de recherches dans le domaine de la chimie sous rayonnement a porté sur l'étude de la radiolyse du méthanol et de l'éthanol (*Jin, 1996 ; Taub, 1962 ; Getoff, 1993*). Lors de l'irradiation, ces deux solvants se transforment principalement en espèces radicalaires : HMR (à partir du méthanol), HER (à partir de l'éthanol), e^-_s et H^\bullet (à partir des deux solvants). Ces espèces sont reconnues pour leur grande réactivité vis-à-vis des solutés présents dans les milieux irradiés.

Le premier aspect de ce travail consistera principalement à étudier les transformations chimiques induites sur les flavonoïdes au cours de la radiolyse, ce qui permettra de mieux comprendre les mécanismes réactionnels entre ces molécules et les espèces radiolytiques issues des alcools.

Par ailleurs, l'irradiation γ est utilisée actuellement pour décontaminer les aliments en ralentissant le développement des micro-organismes pathogènes et par conséquent en assurant une plus longue conservation de ces nutriments. Elle peut remplacer les techniques classiques de conservation telles que la stérilisation et la congélation. Elle détruit les bactéries et les moisissures et inhibe la croissance des insectes nuisibles dans les fruits secs. Cependant, l'irradiation peut présenter des inconvénients en provoquant des modifications structurales des groupes moléculaires constituant les aliments tels que les lipides, les glucides, les vitamines et également les flavonoïdes.

Le deuxième aspect du travail que nous exposerons ici, nous permet d'appréhender les transformations chimiques que peuvent subir les flavonoïdes contenus dans les aliments soumis à un traitement par irradiation.

Les flavonoïdes sont peu solubles dans l'eau. Ceci nous a empêché de réaliser directement leur radiolyse en solution aqueuse. C'est pourquoi, en nous servant des résultats obtenus lors de l'irradiation de ces molécules en milieux alcooliques, nous avons entrepris d'étudier les effets de l'introduction d'eau dans le milieu d'irradiation. Notre objectif est de nous rapprocher le plus possible des conditions physico-chimiques existant réellement dans

les fruits et légumes lors d'un traitement ionisant. On suppose en effet que dans les fruits et les légumes, les flavonoïdes sont en milieu aqueux probablement acide. La modélisation *in vitro* de ces conditions n'est pas une tâche facile, cependant, nous avons testé différents mélanges eau/alcool et nous discuterons de l'effet remarquable de l'eau sur la dégradation des flavonoïdes.

L'effet de l'irradiation sur la qualité nutritionnelle des aliments a également retenu notre attention. Pour cela, nous avons évalué l'activité antioxydante des flavonoïdes et celle de leurs produits de radiolyse en mesurant leur capacité à piéger les radicaux DPPH (2,2-diphénylpicrylhydrazyl) et superoxyde et à inhiber la xanthine oxydase, enzyme responsable de la formation de ce dernier.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

*LES RADICAUX LIBRES OXYGENES ET FORMATION DES
RADICAUX DERIVES DES ALCOOLS*

LES RADICAUX LIBRES OXYGENES ET FORMATION DES RADICAUX DERIVES DES ALCOOLS

INTRODUCTION

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques.

Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS). Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces. En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (*Gutteridge, 1993*).

Par ailleurs, au niveau du foie, organe principal du métabolisme, l'administration d'alcool est susceptible d'entraîner des maladies hépatiques. Quoique les mécanismes impliqués dans le développement de celles-ci demeurent encore une énigme, des dérivés réactifs de l'éthanol détectés *in vivo* et *in vitro* après administration d'alcool seraient l'une des causes du déclenchement de ces maladies.

Une première partie de ce chapitre est consacrée à la présentation générale de différentes formes de radicaux libres de l'oxygène, au mécanisme de leur formation et à leur élimination par l'organisme.

La deuxième partie, portera sur la description du métabolisme de l'alcool entraînant la formation de radicaux réactifs tels que :

➤ Le radical 1-hydroxyéthyl (Hydroxyethyl Radical : HER ou $\text{CH}_3\bullet\text{CHOH}$) issu de la métabolisation de l'éthanol.

➤ Le radical 1-hydroxyméthyl (Hydroxymethyl Radical : HMR ou $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$) issu de la métabolisation du méthanol.

Nous verrons également leur implication dans les maladies hépatiques.

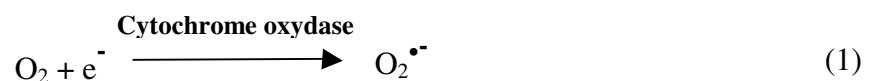
I. ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

L'appellation ROS n'est pas restrictive (*Gutteridge, 1993*). Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène : radical superoxyde ($\text{O}_2\bullet^-$), radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), monoxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite (ONOO^-).

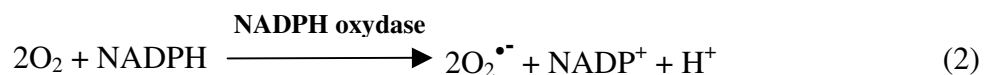
I.1. FORMATION

I.1.1. LE RADICAL SUPEROXYDE

L'une des sources physiologiques majeures de radicaux superoxydes ($\text{O}_2\bullet^-$) est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial :

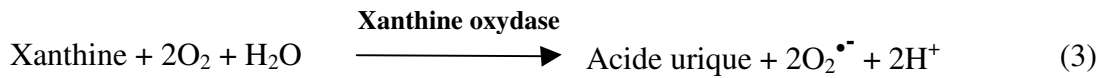


Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



Le système enzymatique xanthine / xanthine oxydase est également considéré comme une source biologique importante de radicaux superoxyde. En effet, en présence d'oxygène la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique. Dans cette réaction,

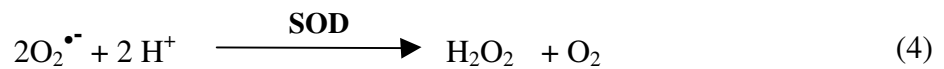
l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi le radical superoxyde :



Le radical superoxyde est peu réactif, mais représente un précurseur d'espèces plus agressives. Avec l'apport d'un autre électron, il devient un ion peroxyde (O_2^{2-}), qui, à son tour, avec l'ajout de deux ions hydrogène (2H^+), produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

1.1.2. LE PEROXYDE D'HYDROGENE

Il se forme par dismutation du radical superoxyde, catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) :



L'absence de charge à sa surface rend ce ROS très lipophile et peu réactif en milieu aqueux. Le peroxyde d'hydrogène peut néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité, associée à sa capacité à traverser les membranes biologiques, fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse. Il peut alors participer à la biosynthèse du radical hydroxyle.

1.1.3. LE RADICAL HYDROXYLE

Il est formé par la dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de métaux de transition sous leur forme réduite. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton :



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical superoxyde aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle. Ce mécanisme réactionnel se nomme la réaction d'Haber-Weiss :



Cette réaction très lente ne se produit qu'en présence de métaux.

En dehors des réactions biochimiques aboutissant au radical hydroxyle, celui-ci peut être aussi obtenu directement à partir d'eau ou de milieux aqueux soumis aux rayonnements ionisants (voir chapitre III).

Avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. Il réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages. Il apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (*Gutteridge, 1993*).

1.1.4. LES RADICAUX PEROXYLES

Les radicaux peroxyles (ROO^\bullet) se forment par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres carbonés. Ils sont peu réactifs, mais sont capables de diffuser à travers les membranes biologiques.

1.1.5. LES HYDROPEROXYDES ORGANIQUES

Les hydroperoxydes organiques (ROOH) sont les formes hydrogénées des radicaux peroxyles. Ils sont réactifs et se redécomposent en radicaux peroxyles ou en radicaux alcoxyles.

1.1.6. LES RADICAUX ALCOXYLES

Les radicaux alcoxyles (RO^\bullet) se produisent lors de la dégradation des peroxydes organiques. Ils sont très réactifs.

I.2. SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES ROS : ANTIOXYDANTS ENDOGENES

Comme nous venons de le voir, les radicaux libres se produisent spontanément et d'une manière continue au sein de notre organisme. Cependant, ils sont rigoureusement contrôlés par des antioxydants dits endogènes. Lorsque ce précaire équilibre est rompu soit par une augmentation du nombre de radicaux libres, soit par une baisse de l'activité antioxydante, il survient un stress oxydatif. Ce dernier peut occasionner plusieurs types de dommages aux cellules entraînant ainsi une perte de fonction et d'intégrité, voire la mort cellulaire.

Afin de contrer l'action oxydante des radicaux libres, notre organisme possède une « armée » d'antioxydants de nature protéique, enzymatique et d'agents oxydables. Ces antioxydants interviennent en trois temps, constituant ainsi trois lignes de défense : la prévention à plein temps, la détoxification active suite à un stress oxydatif, et la détoxification passive.

I.2.1. LA PREVENTION A PLEIN TEMPS

Cette première ligne de défense prévient la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes telles que le fer divalent et le cuivre monovalent. Elle comprend des enzymes ferroxidases et des protéines chélatrices du fer (transferrine, hémossidérine) et du cuivre (albumine, céruloplasmine).

➤ La ferroxidase : c'est une enzyme qui permet la transformation de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}). Cette activité oxydante favorise la capture du fer par la ferritine et limite ainsi la quantité de ce métal qui pourrait s'auto-oxyder et former alors des espèces réactives de l'oxygène dans les vaisseaux sanguins.

➤ La transferrine : c'est une glycoprotéine plasmatique capable de piéger jusqu'à deux atomes de fer ferrique. Celui-ci devient incapable d'intervenir dans des mécanismes d'oxydoréductions générateurs de radicaux libres.

➤ L'albumine : c'est une protéine plasmatique qui joue le même rôle que la transferrine mais en captant l'ion cuivreux.

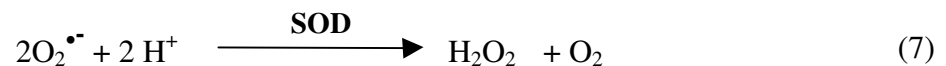
1.2.2. LA DETOXICATION ACTIVE SUITE A UN STRESS OXYDATIF

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

a) La superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD), qui existe sous différentes formes, est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :

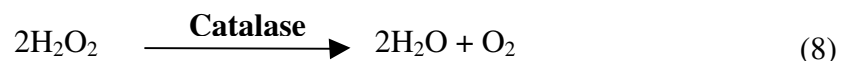


Il existe trois types de SOD : SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD).

b) La catalase

Cette enzyme est contenue dans les peroxysomes qui vivent en aérobie (présence d'oxygène). Elle existe en forte concentration dans le foie et les globules rouges. Au niveau sub-cellulaire, la catalase se retrouve dans le cytosol et dans les peroxysomes.

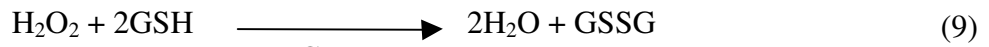
Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



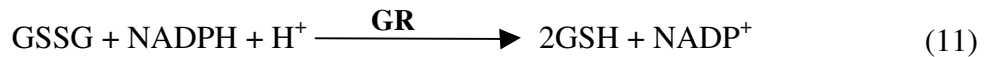
c) Les glutathion peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette

réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) :



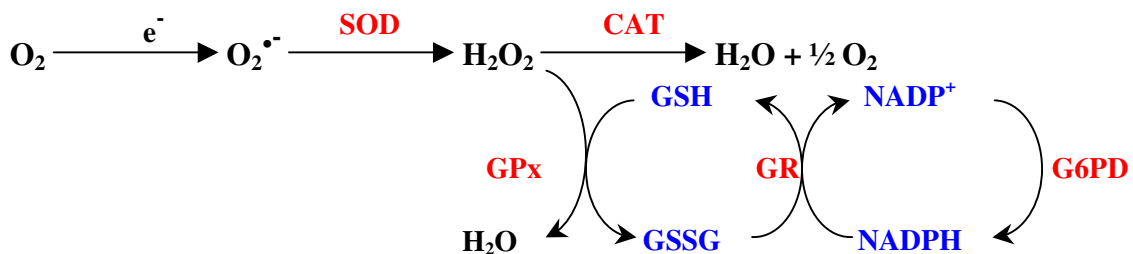
La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du NADP⁺ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déhydrogénase) :



Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant :



1.2.3. LA DETOXICATION PASSIVE

Cette troisième ligne de défense permet la réduction des radicaux libres qui ont pu « survivre » aux deux autres lignes de défense. Sont regroupées dans cette catégorie des molécules antioxydantes telles que l'*alpha*-tocophérol (vitamine E), le *bêta*-carotène et l'acide *L*-ascorbique

L'activité antioxydante de la vitamine E et du *bêta*-carotène comprend l'hydrogénation des radicaux peroxydes (ROO•) et alcoxydes (RO•) des acides gras membranaires permettant ainsi la terminaison du mécanisme de peroxydation des lipides.

L'acide *L*-ascorbique est le principal antioxydant de la troisième ligne de défense. En effet, il peut capter à la fois les radicaux hydroxydes, superoxydes et peroxydes.

II. STRESS OXYDANT ET MALADIES ALCOOLIQUES DU FOIE

Au niveau du foie, organe principal du métabolisme, l'éthanol est susceptible d'entraîner diverses lésions telles que la nécrose et l'hépatite alcoolique aiguë (*Badger, 2003*). Les mécanismes impliqués dans le développement des maladies hépatiques chroniques d'origine alcoolique demeurent encore une énigme. Néanmoins, la fréquence de ces maladies est liée à la dose et à la durée de l'alcoolisation.

La majeure partie de l'éthanol est oxydée au niveau de l'hépatocyte. Le mécanisme fait intervenir deux oxydations, la première transformant l'alcool en radical hydroxyéthyl (HER) et acétaldéhyde, la seconde transformant l'acétaldéhyde en acétate.

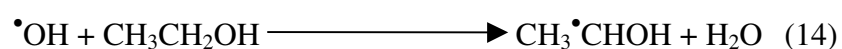
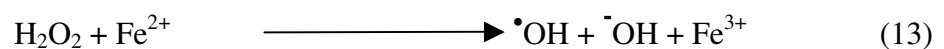
L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde se fait selon deux voies enzymatiques, chacune située dans un compartiment cellulaire différent :

- La voie de l'alcool déshydrogénase (ADH), qui est cytosolique.
- La voie du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS : microsomal ethanol oxidation system), qui fait intervenir le cytochrome P4502E1 (CYP2E1) et qui est localisé dans le réticulum endoplasmique.

L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), dont la localisation est cytosolique et mitochondriale.

Une grande partie de l'éthanol peut également être oxydée en HER :

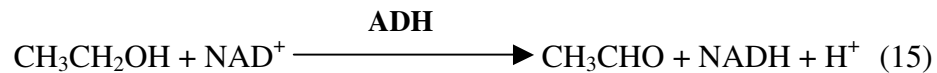
- Soit directement en impliquant le CYP2E1.
- Soit indirectement par voie radicalaire, résultant de l'attaque de l'éthanol par des radicaux hydroxydes générés par la réaction de Fenton :



II.1. ENZYMES DU METABOLISME DE L'ETHANOL

II.1.1. ALCOOL DESHYDROGENASE

L'alcool déshydrogénase (ADH) est une enzyme cytosolique utilisant le NAD^+ comme cofacteur. Du fait de son abondance dans le foie, l'ADH joue un rôle très important dans le métabolisme de l'alcool. En effet, elle catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en réduisant simultanément le coenzyme NAD^+ en NADH :

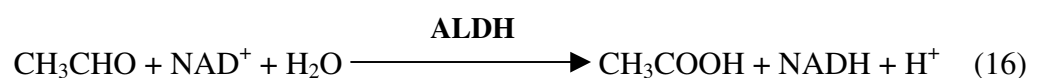


L'enzyme n'a pas d'affinité pour l'alcool si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Ethanol se transforme en un complexe Enzyme- NADH -Acétaldéhyde ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'acétaldéhyde puis le NAD réduit.

L'acétaldéhyde, métabolite intermédiaire obligatoire dans le métabolisme oxydatif de l'éthanol, est une substance électrophile très réactive. Elle est capable de former des adduits avec les molécules environnantes telles que les protéines et les acides nucléiques, ce qui peut aboutir à des nécroses cellulaires. Les adduits acétaldéhyde-protéine ont été retrouvés aussi bien au niveau du foie que du cerveau (*Rintala, 2000*). L'acétaldéhyde est par ailleurs particulièrement toxique pour la mitochondrie : il favorise la mort cellulaire en diminuant la quantité du glutathion réduit, en augmentant la peroxydation lipidique et les effets toxiques des radicaux libres.

II.1.2. ALDEHYDE DESHYDROGENASE (ALDH)

Ces enzymes sont très abondantes dans le cytoplasme et les mitochondries de nombreuses cellules : foie, rein, cerveau, globules rouges. Elles catalysent la dégradation de l'acétaldéhyde en acétate en utilisant le NAD^+ comme cofacteur (*Borson, 1986*) :

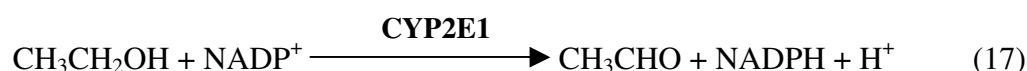


II.1.3. CYTOCHROME P450E1 (CYP2E1)

CYP2E1 est une enzyme de la superfamille des cytochromes P450 qui utilisent le NADPH et l'oxygène comme cofacteurs. Ces enzymes sont localisées principalement dans le réticulum endoplasmique. Le CYP2E1 est exprimé en grande quantité au niveau de l'hépatocyte, et en quantité 10 à 100 fois plus faibles dans les cellules de Kupffer (*Koivisto, 1996*). Il est situé aussi dans les tissus extrahépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau) (*Lieber, 1999*).

Le CYP2E1 catalyse de façon spécifique le métabolisme de nombreuses molécules. Parmi celles-ci, certaines sont des substrats endogènes (acétone, acides gras), d'autres proviennent de l'alimentation (éthanol, nitrosamine), d'autres sont des médicaments (anesthésique, paracétamol) ou des solvants organiques industriels (benzène, styrène).

Le CYP2E1 catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde selon la réaction (*Lieber, 1999*):



Le CYP2E1 possède aussi la capacité d'oxyder l'acétaldéhyde en acétate (*Bell-Parikh, 1999*). Il a été rapporté également que des radicaux libres sont formés au cours du métabolisme de l'éthanol par le CYP2E1 (*Eckstöm, 1989*), notamment des radicaux hydroxyles et 1-hydroxyéthyles (HER).

A la différence de la voie de l'ADH, la voie microsomale du CYP2E1 est inductible par l'alcool. Cette induction est observée soit à la suite de l'administration d'une seule dose forte d'éthanol (*Peterson, 1982*), soit au cours d'un alcoolisme chronique (*Roberts, 1994*).

II.2. MECANISMES RADICALAIRES INDUITS PAR L'ETHANOL DANS LE FOIE

L'un des aspects de la toxicité de l'alcool qui a suscité récemment un grand intérêt est la contribution de radicaux libres provenant de son métabolisme dans certaines pathologies. De nombreuses études expérimentales ont démontré que l'administration aiguë ou chronique d'alcool à des animaux augmente d'une part la peroxydation des lipides, et d'autre part,

diminue le taux d'antioxydants dans les tissus (Nordmann, 1992). Des études cliniques supportent ces observations montrant que, chez des patients atteints de maladies du foie liées à l'alcool, le taux des marqueurs du stress oxydatif est très élevé tandis que celui des antioxydants est faible (Nordmann, 1992 ; Lecomte, 1994).

La destruction des systèmes antioxydants de défense cellulaire, accompagnée de la formation de radicaux oxygénés, pourrait causer des dommages oxydatifs associés à des maladies du foie chez les alcooliques. Ces mêmes effets peuvent être causés également par d'autres radicaux libres, qui ne dérivent pas de l'oxygène.

II.2.1 FORMATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS)

L'administration d'éthanol à des rats a montré une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène telles que le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (Boveris, 1983 ; Thurman, 1973 ; Klein, 1983). Ces radicaux peuvent être générés selon deux voies : par le NADPH cytochrome P450 réductase (une flavoenzyme) ou par le cytochrome P450 qui peuvent produire le radical superoxyde, qui à son tour, permet la formation du radical hydroxyle via une réaction d'Haber-Weiss (réaction 6). Une augmentation de l'activité de la réductase a été observée chez des rats nourris avec de l'éthanol (Joly, 1973 ; Ekström, 1986). Cependant, cette variation est apparue faible comparée à celle observée sur le cytochrome P450. Dans les microsomes des rats traités préalablement par l'éthanol, la formation de la plupart des radicaux dérivés de l'oxygène implique l'intervention du cytochrome P450. Une forme unique de cette enzyme a été isolée à partir des microsomes du foie humain (Lasker, 1987). Il a été montré que cette isoenzyme (CYP2E1) peut être induite par l'éthanol (Koop, 1982 ; Ingelman-Sundberg, 1984) mais également par l'acétone (Patten, 1986 ; Johansson, 1986). On a aussi observé une corrélation entre la production de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 et la quantité de CYP2E1 (Ekström, 1989). Ceci indique le rôle important de cette isoenzyme dans la génération des espèces réactives de l'oxygène au niveau des microsomes des rats nourris par l'éthanol.

II.2.2. FORMATION DU RADICAL 1-HYDROXYETHYL DERIVE DE L'ETHANOL

a) Rôle de $\bullet\text{OH}$

En 1987, deux études indépendantes utilisant la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) ont montré que des microsomes de foie murin incubés en présence d'un spin-trap, d'éthanol et de NADPH produisent une espèce radicalaire identifiée comme étant le HER (*Albano, 1987 ; Reinke, 1987*). De plus, il a été constaté que la formation de HER augmente avec la concentration d'éthanol et que cette production est très élevée chez les rats nourris avec de l'éthanol par rapport aux rats non traités. Les radicaux hydroxyles générés dans la réaction de Fenton, pourraient oxyder l'éthanol en HER (*Cederbaum, 1977 ; Ingelman-Sundberg, 1984*). En effet, il y a arrachement, par le radical hydroxyle, d'un atome d'hydrogène à partir du carbone 1 de la molécule d'éthanol permettant la formation de HER :



Par ailleurs, Cederbaum et Dicker ont montré qu'en présence de chélateurs de fer et de piègeurs de $\bullet\text{OH}$, l'éthanol peut être aussi oxydé par les microsomes du foie via une réaction catalysée par le cytochrome P450 (*Cederbaum, 1983*). Ekström et ses collaborateurs ont démontré qu'en présence de chélateur de fer, la forme isoenzymatique du cytochrome P450 induite par l'éthanol (CYP2E1) possède une grande spécificité pour l'oxydation de l'éthanol mais pas pour la production de $\bullet\text{OH}$ (*Ekström, 1986*). Une autre voie suggérée par Ingelman-Sundberg et Johanson est l'intervention des radicaux $\bullet\text{OH}$ produits au niveau du site actif de l'enzyme et qui ne seraient pas accessibles à leurs piègeurs (*Ingelman-Sundberg, 1984*).

Nous constatons qu'au moins deux mécanismes sont invoqués dans la génération de HER à partir de l'éthanol. Le premier implique la participation des radicaux $\bullet\text{OH}$ formés par la réaction de Fenton, tandis que le deuxième est indépendant de $\bullet\text{OH}$ et fait intervenir le cytochrome CYP2E1.

b) Rôle de CYP2E1

Dans les microsomes du foie, la formation de HER exige la présence de NADPH et des enzymes monooxygénase fonctionnelles et actives. La présence du cytochrome P450 apparaît essentielle puisque HER ne peut être généré par les systèmes monooxygénases reconstitués incubés en présence de NADPH, que si le cytochrome P450 réductase et le cytochrome P450 sont toutes les deux présents (*Albano, 1991*). Le rôle de CYP2E1 dans la formation de HER est confirmé par le fait que la présence des anticorps anti-CYP2E1 ou des inhibiteurs de cette isoenzyme tels que le *p*-nitrophenol et diéthylldithiocarbamate, réduisent la formation de HER d'environ 60% (*Albano, 1991 ; Albano, 1994*).

c) Rôle du peroxyde d'hydrogène, du superoxyde et du fer

Le signal RPE détecté après incubation, dans un tampon phosphate ou Tris, de microsomes en présence d'éthanol, de NADPH et du POBN (spin-trap), est identifié comme étant le signal caractéristique de HER (*Reinke, 1997*). En effet, durant le métabolisme aérobie et en présence de NADPH, les microsomes produisent continuellement le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent, par conséquent, interagir avec le fer et produire $\bullet\text{OH}$ puis HER. Afin de confirmer ces interactions, les auteurs ont rajouté au milieu réactionnel de la catalase (inhibiteur de H_2O_2), de la superoxyde dismutase (SOD, piègeur de $\text{O}_2^{\bullet-}$), de la deferoxamine (DFO, chélateur du fer), et de l'azoture (inhibe la dégradation de H_2O_2 par la catalase). Ils ont observé que le signal de HER a largement augmenté en présence de l' azoture, tandis que la catalase a montré un effet négatif. Ceci indique que le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important dans la production de HER. L'intervention de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et du fer est aussi importante puisque la SOD et DFO inhibent la formation de HER comme le montre la diminution de son signal RPE.

Par ailleurs, l'implication des ROS dans la production de HER est en accord avec le rôle joué par CYP2E1, puisque cette isoenzyme a une grande activité de NADPH oxydase dans la génération de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 (*Albano, 1991 ; Gorsky, 1984 ; Ekstöm, 1986*). Ces ROS peuvent réagir avec le fer et produisent des espèces (comme par exemple, $\bullet\text{OH}$ formé dans la réaction de Fenton) ayant le pouvoir d'arracher un atome d'hydrogène de la molécule

d'éthanol aboutissant ainsi à la formation de HER. Cependant, ce mécanisme ne peut pas expliquer les observations suivantes :

(i) durant le métabolisme de l'éthanol, 1-propanol et 1-butanol, le signal RPE de l'adduit spin trap-radical formé à partir de chaque alcool, augmente en fonction d'une part de la taille de la chaîne carbonée (*Albano, 1991*), et d'autre part de la concentration de CYP2E1 (*Morgan, 1982*).

(ii) en l'absence du fer, CYP2E1 montre une grande spécificité pour l'oxydation de l'éthanol et non pas pour la production de $\bullet\text{OH}$ (*Ekström, 1989*).

Ces observations suggèrent la possibilité qu'au moins une partie, des radicaux HER produits par les microsomes du foie, est formée après l'interaction de l'éthanol avec une espèce oxydante liée au CYP2E1. Albano et ses collaborateurs ont suggéré que HER peut se former aussi durant l'oxydation de l'éthanol, catalysée par CYP2E1, en acétaldéhyde, et que le complexe CYP2E1-Fe³⁺-O₂ pourrait être responsable de l'oxydation de l'éthanol suivant la réaction (*Albano, 1999*) :



II.3. IMPLICATION DE HER DANS LES MALADIES DU FOIE LIÉES A L'ADMINISTRATION D'ALCOOL

Comme nous l'avons vu, la SOD est considérée comme la première ligne de défense contre les effets toxiques des radicaux libres de l'oxygène en catalysant la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. L'administration chronique ou aiguë d'éthanol entraîne une diminution de l'activité de la SOD dans plusieurs tissus murins tels que le foie (*Ribière, 1985*) et le cerveau (*Ledig, 1981*).

Récemment, Santiard et ses collaborateurs ont démontré que HER est capable de réagir avec Cu, Zn-SOD conduisant à l'inactivation de l'enzyme (*Santiard, 1995*). Celle-ci n'est pas la seule protéine cible pour HER, puisque ces radicaux peuvent aussi inactiver la (Na⁺, K⁺)-ATPase dans les membranes synaptiques (*Olfield, 1991*) et participent à l'alkylation des protéines microsomales (*Albano, 1993*).

L'administration d'éthanol a également comme conséquence de réduire les taux d' α -tocophérol (*Bjorneboe, 1987*) et de glutathion (*Vina, 1980* ; *Strubelt, 1987*) dans le foie. Une

étude menée par Stoyanovsky et ses collaborateurs a montré que cet effet indésirable est lié à la réactivité de HER sur ces antioxydants cellulaires ainsi que sur l'acide ascorbique (Stoyanovsky, 1998). En administrant l'éthanol et un spin-trap (PBN) à des rats, le spin adduit PBN/HER a été détecté par RPE. En présence de glutathion (GSH), on a enregistré une diminution de ce signal RPE, indiquant l'inhibition de HER par GSH. En rajoutant la glutathion peroxydase, on a observé une diminution de la capacité de GSH à piéger HER. Ceci est dû au fait que GSH est oxydé en glutathion di-sulfure (GSSG) selon la réaction (9) précédemment décrite.

L'inactivation de la catalase et la glutathion peroxydase par HER a été également démontrée (Puntarulo, 1999). L'inhibition de la première enzyme peut augmenter la production du radical hydroxyle et par conséquent, diminuer les réserves d'antioxydants dans les cellules (Puntarulo, 1999).

La possibilité de ces antioxydants cellulaires à interagir avec HER pourrait jouer un rôle dans les effets néfastes de l'éthanol et contribuer alors à un stress oxydatif au niveau du foie. Il a d'ailleurs été constaté que le taux d' α -tocophérol est faible chez des patients alcooliques souffrant de maladies hépatiques (Bjorneboe, 1987).

En conclusion, HER peut contribuer aux mécanismes responsables de l'hépatotoxicité de l'éthanol via :

- (i) La formation des adduits HER/protéine (Sakurai, 2000 ; Nordmann, 1990).
- (ii) Un stress oxydatif en détruisant l'équilibre oxydant/antioxydant cellulaire (Moncada, 1994).
- (iii) L'interaction avec les antioxydants cellulaires (glutathion, α -tocophérol, acide L-ascorbique) (Stoyanovsky, 1998).
- (iv) L'inactivation des enzymes de défense cellulaires (glutathion réductase, glutathion peroxydase, catalase, SOD) (Santiard, 1995 ; Puntarulo, 1999).

II.4. L'INTOXICATION AU METHANOL : FORMATION DU RADICAL 1-HYDROXYMETHYL

Le méthanol est un alcool très présent dans notre environnement. En tant que solvant, il est un des composants de nombreux produits destinés au lavage et dégraissage. Il est également présent dans les diluants pour peintures et vernis. L'exposition humaine au méthanol par voie orale ne se produit généralement qu'accidentellement. Le méthanol n'est que peu toxique par lui-même, mais après ingestion il est métabolisé en produits toxiques (*Jacobsen, 1986*). La majeure partie du méthanol absorbé (90 à 95%) subit le métabolisme hépatique selon un schéma similaire à celui détaillé pour l'éthanol : l'ADH oxyde le méthanol en formaldéhyde, lui-même rapidement transformé en acide formique par l'ALDH, pour aboutir à la production de CO₂ et H₂O. Ces voies métaboliques mettent à contribution respectivement le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et le glutathion. L'accumulation d'acide formique semble être le principal responsable de l'acidose métabolique observée chez des sujets intoxiqués par le méthanol (*Jacobsen, 1986; Liesivuori, 1991; McMartin, 1980*).

Afin d'éliminer l'intoxication au méthanol, deux traitements ont été recommandés. Le premier est l'hémodialyse qui permet l'extraction du méthanol de l'organisme ainsi que celle des métabolites toxiques déjà formés (*Jacobsen, 1986; Gonda, 1978*). Le deuxième traitement nécessite l'administration d'antidotes tels que l'éthanol et le 4-méthyl pyrazole (*Blomstrand, 1979*). Ce sont des inhibiteurs de l'ADH, qui bloquent ainsi le métabolisme du méthanol, et donc, empêchent la formation des métabolites toxiques.

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe précédent, la métabolisation de l'éthanol fait l'objet d'un grand intérêt pour de nombreux groupes de recherches. Il est à noter que des radicaux intermédiaires analogues à HER sont produits durant l'oxydation microsomale de plusieurs alcools aliphatiques tels que le propanol, le butanol et le pentanol indiquant, la présence d'un mécanisme métabolique commun pour la formation des radicaux centrés sur le carbone à partir des alcools (*Albano, 1987; Albano, 1991; Albano, 1994*).

Récemment, en administrant à des rats le méthanol et un spin-trap, α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N-tert*-butylnitrone (POBN), Kadiiska et Masson ont démontré, et pour la première fois, que cette intoxication aiguë au méthanol génère chez ces sujets un radical identifié par RPE comme étant le radical HMR (*Kadiiska, 2000*). Le spin adduit POBN/HMR a été détecté

dans la bile et l'urine 2 h après l'injection du méthanol. On a observé qu'un traitement simultané par du méthanol et du 4-méthyl pyrazole augmente l'intensité du signal RPE. Ceci est dû apparemment à l'inhibition de l'ADH, ce qui bloque la transformation de la molécule du méthanol en formaldéhyde et favorise, par conséquent, la formation du HMR.

Quoique le mécanisme de formation de HMR soit encore mal connu, ce radical, comme son analogue HER, semble jouer un rôle dans la toxicité du méthanol. En effet, une fois formé, HMR est rapidement converti en radical peroxy, qui se transforme par la suite en formaldéhyde en libérant le radical HO₂[•] (*Bothe, 1978*) :



HMR peut également réagir avec le glutathion (GSH) produisant ainsi le radical thiyl (*Eriksen, 1988*) :



Puisque ce radical thiyl peut réagir aussi avec l'oxygène, ces trois réactions pourraient représenter des sources génératrices des radicaux dérivés de l'oxygène et causer ainsi un stress oxydatif suite à une intoxication au méthanol.

CHAPITRE II

LES FLAVONOÏDES

LES FLAVONOÏDES

INTRODUCTION

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) et superoxydes ($\text{O}_2\bullet$).

Nous classifions dans un premier lieu, les flavonoïdes et nous présenterons leur distribution nutritionnelle. Ceci sera suivi, dans une deuxième partie, par une présentation de leur activité antioxydante en tant que piégeurs des radicaux libres et également en tant qu'inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation de ces espèces nocives.

I. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (**Figure 3**) (*Bruneton, 1999*).

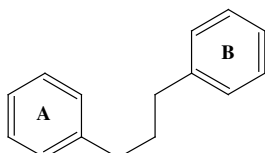


Figure 3: Squelette de base des flavonoïdes.

Leur biosynthèse (**Figure 4**) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2*R*,3*R*)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7) (**Figure 4**). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside (**Figure 4**).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

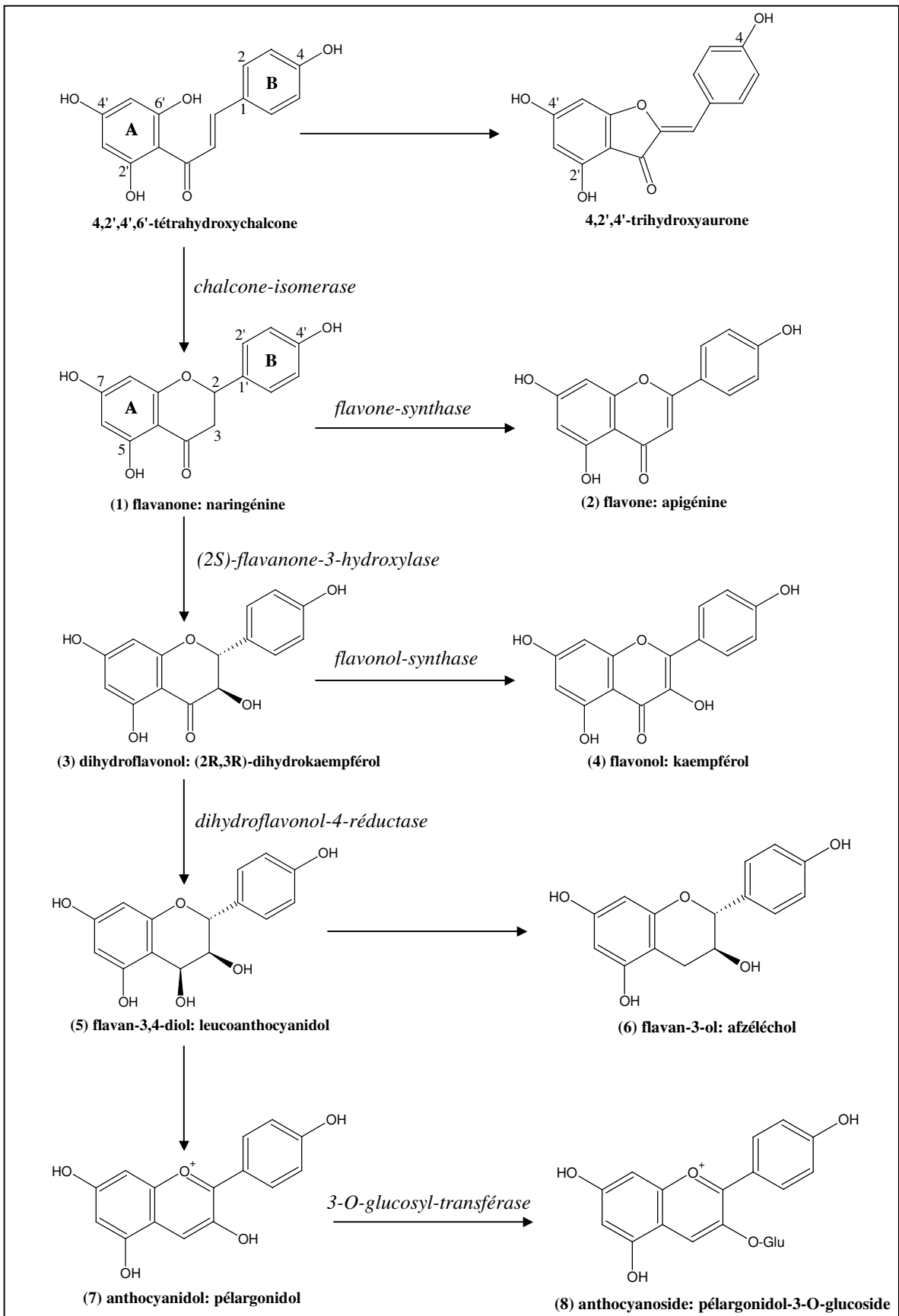


Figure 4 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

I.1. FLAVONES ET FLAVONOLS

Comme nous avons mentionné ci-dessus, tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4, 2',4',6'-tétrahydrochalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (**Figure 4**), cela étant, l'un d'entre eux peut être absent.

Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols (structures (2) et (4) sur la **Figure 4**) est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3 (**Figure 4**). Sur la **Figure 1** nous avons présenté quelques exemples de molécules les plus répandues de ces deux groupes de flavonoïdes.

I.2. FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie (**Figure 4**) (structures (1) et (3)). Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols. Sur la **Figure 1**, nous montrons des exemples de molécules appartenant à ce groupe de flavonoïdes.

I.3. FLAVAN-3-OLS, FLAVAN-3,4-DIOLS ET ANTHOCYANIDOLS

A la différence des flavonoïdes décrits au-dessus, ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols).

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés.

Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélagonidol et le cyanidol (**Figure 1**).

Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pélagonidol-3-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou kéraçyanine.

I.4. CHALCONES ET AURONES

Les chalcones sont différentes des autres types de flavonoïdes cités au-dessus. De par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α,β -insaturée (**Figure 4**). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (**Figure 4**).

II. DISTRIBUTION ET LOCALISATION

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits.

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (Justen, 1998; Bronner, 1995; Hollman, 1996; Crozier, 1997). Le **Tableau 1** regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.

Tableau 1: Sources alimentaires des flavonoïdes.

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones	
naringénine	fruits du genre <i>citrus</i>
Flavones	
chrysin	peau des fruits
apigénine	persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	persil, céleri
Flavonols	
kaempférol	radis, brocoli, thé noir
quercétine	oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate
myricétine	canneberge, vin rouge
Flavan-3-ols	
épicatéchine	thé vert, thé noir
catéchine	thé vert, thé noir
épigallocatechine	vin rouge
Anthocyanidols	
cyanidol	cassis, myrtilles
malvidol	raisins, fraises, cassis
apigénidol	framboises, fraises

Les flavones apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Cependant, leurs analogues hydrogénés (flavanones), l'hespérintine et la naringénine sont exclusivement présents dans les agrumes (Justen, 1998). Dans les tomates, il y a autant

de naringénine que de quercétine. Cette dernière se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonol, y est également largement détecté. Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts, les haricots noirs et les pois.

Autres flavonoïdes souvent étudiés, les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, airelles, groseilles, mais également, à un degré moindre, dans tous les autres fruits rouges comme les raisins, les fraises et les framboises. On peut aussi les trouver dans certains légumes comme le chou rouge et les radis.

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires.

III. PROPRIÉTÉS DES FLAVONOÏDES

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937), chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la

fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

III.1. LES FLAVONOÏDES COMME ANTIOXYDANTS

D'après Halliwell (*Halliwell, 1994*), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- (i) Le piégeage direct des ROS.
- (ii) L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- (iii) La protection des systèmes de défense antioxydants.

III.1.1. INHIBITION ENZYMATIQUE

La xanthine oxydase (XO) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique suivant la réaction précédemment décrite (réaction 3, Chapitre I).

Par conséquent, la xanthine oxydase est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde. Hansaki et ses collaborateurs, dans une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (*Hansaki, 1994*). Ces résultats ont été confirmés par Cos et ses collaborateurs qui ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production d'acide urique (*Cos, 1998*). Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la xanthine oxydase (**Figure 5**). Les différents points qui ressortent de cette étude sont les suivants :

- La taxifoline, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine ne peuvent inhiber la xanthine oxydase qu'à des concentrations supérieures à 100 μM .

- La flavone, la 4'-hydroxyflavone et la naringénine sont incapables d'inhiber la production de l'acide urique.

Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols n'ont donc aucune influence sur l'activité de la xanthine oxydase.

- Seuls les flavonols et les flavones ont la capacité à inactiver l'enzyme (**Figure 5**). Ceci montre l'importance de la double liaison C2-C3 dans l'inhibition de la xanthine oxydase. En effet, les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols diffèrent des flavones et des flavonols par l'absence de la double liaison entre C-2 et C-3. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Il est donc possible qu'une structure plane soit importante pour l'inhibition de la xanthine oxydase.

- En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, on observe que l'absence du groupe hydroxyle en C-3 augmente légèrement l'activité (**Figure 5**).

- Toutes les flavones ont montré des activités presque similaires quelque soit les substituants du cycle B, indiquant que le cycle B n'a que peu d'influence sur l'inhibition de l'enzyme pour les flavones (**Figure 5**).

- Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine (**Figure 5**).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (*Landolfi, 1984*).

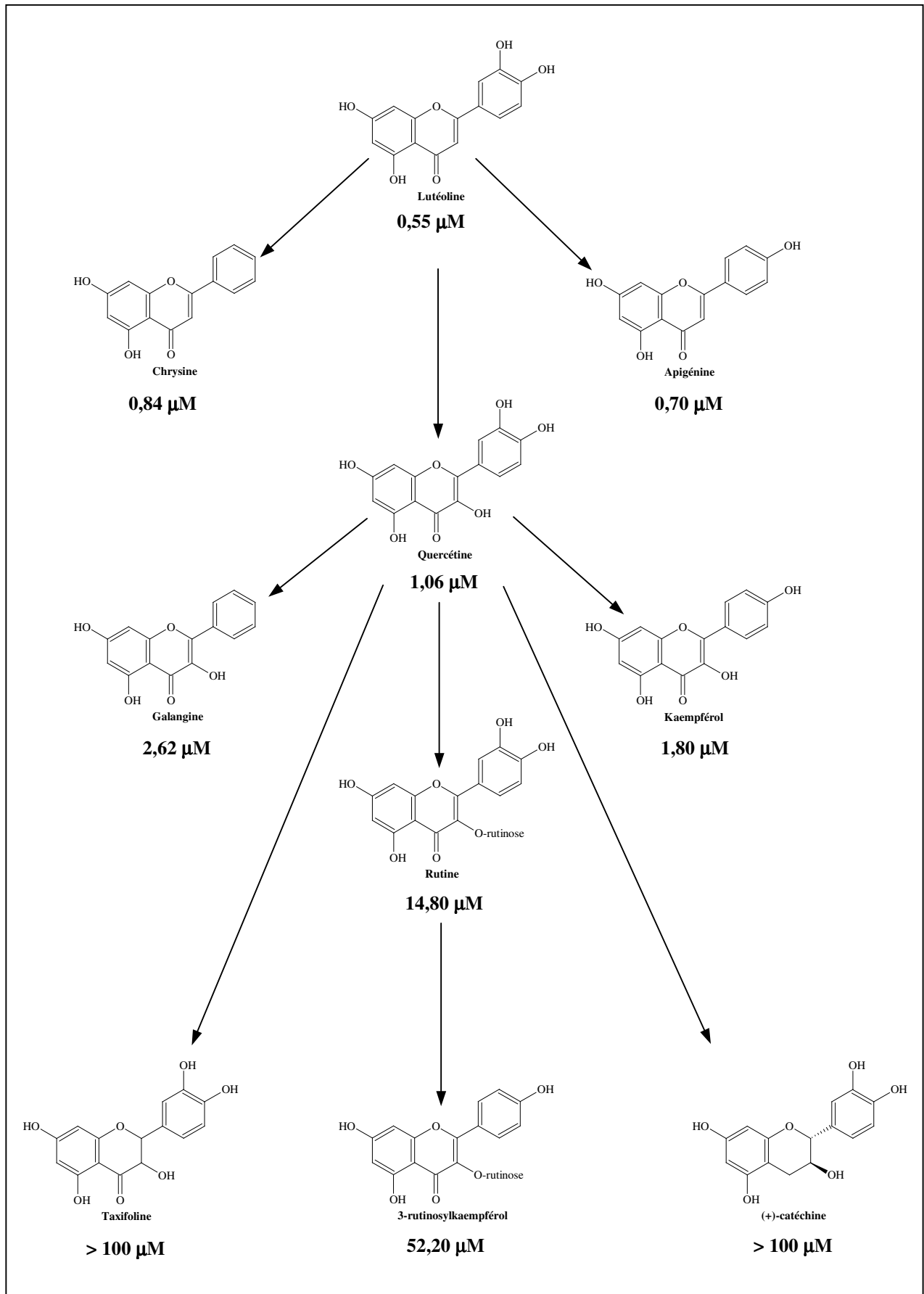
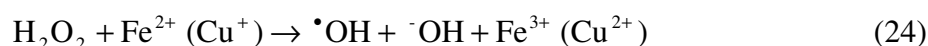


Figure 5: Relation structure activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la xanthine oxydase (les valeurs sont les IC₅₀) (d'après *Cos, 1998*).

III.1.2. CHELATION DES IONS METALLIQUES

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris, 1995 ; Brown, 1998).

Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont montré les résultats suivants (Van Acker, 1996) :

- Le flavonol (3, 5-OH; 7, 3', 4'-OEtOH) possède une activité supérieure à celle du (3-OGlu; 5-OH; 7, 3', 4'-OEtOH), ce qui indique l'importance du groupement 3-OH.
- Le (3-OGlu, 5-OH; 7, 4'-OEtOH; 3'-OH) est moins actif que le (3-OGlu, 5-OH; 7-OEtOH; 3', 4'-OH). Ceci démontre l'efficacité d'un groupement catéchol sur le cycle B (3', 4'-OH).
- La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés dans ce travail.

On peut résumer (**Figure 6**) les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (i) un noyau catéchol sur le cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

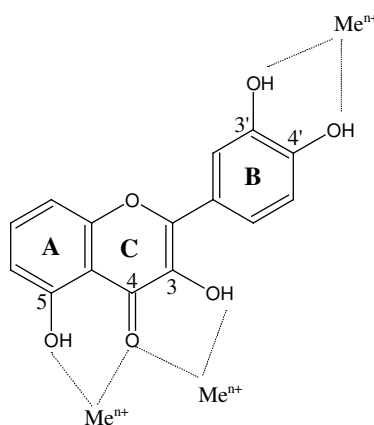


Figure 6 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}). (D'après Van Acker, 1996)

III.1.3. PIEGEAGE DES RADICAUX LIBRES

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (*Jovanovic, 1994*), les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où R^\bullet représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy (Fl-O^\bullet) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Figure 7**).

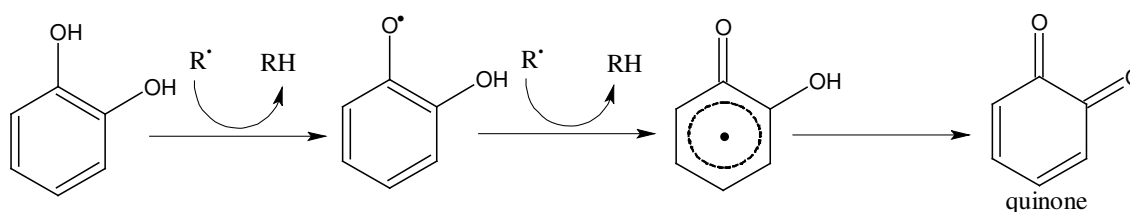


Figure 7 : Piégeage des ROS (R^\bullet) par les flavonoïdes.

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple $\text{Fl-O}^\bullet / \text{Fl-OH}$ mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy.

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (*Jovanovic, 1994 ; Van Acker, 1996 ; Rice-Evans, 1996, Cotelle, 1996 ; Cao, 1997 ; Bors, 1997, Cos, 1998 ; Dugas 2000, Pietta, 2000*).

Rice-Evans et ses collaborateurs ont développé un test basé sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cation chromophore, acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) (*Rice-Evans, 1996*). L'activité des flavonoïdes

est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend essentiellement de leur structure.

a) Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxy phénols

Les molécules de la **Figure 8** représentent trois flavonoïdes avec 5 groupes hydroxyles aux mêmes positions : la quercétine, un flavonol ; la catéchine, un flavan-3-ol; et la cyanidine, un anthocyane. L'activité de la quercétine (4,72 mM) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (2,4 mM). Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C2-C3 et une fonction 4-oxo. La cyanidine avec une structure conjuguée, a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine. Ces résultats démontrent l'importance de la présence d'un cycle C insaturé, qui permet la délocalisation des électrons.

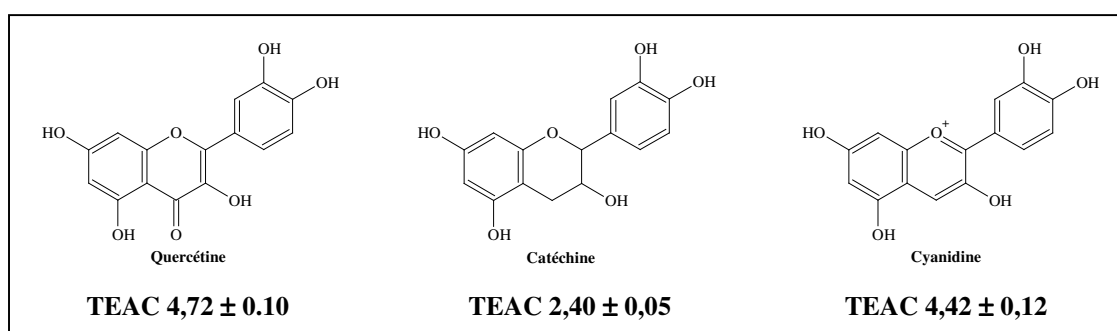


Figure 8 : Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxy phénols. Les valeurs sont exprimées en mM (*Rice-Evans, 1996*)

b) Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B

La morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyle en ortho) (**Figure 9**). Ces résultats démontrent l'importance de la structure ortho-diphénolique du

cycle B. La présence d'un troisième groupe OH sur le cycle B (myricétine) diminue légèrement l'activité antioxydante.

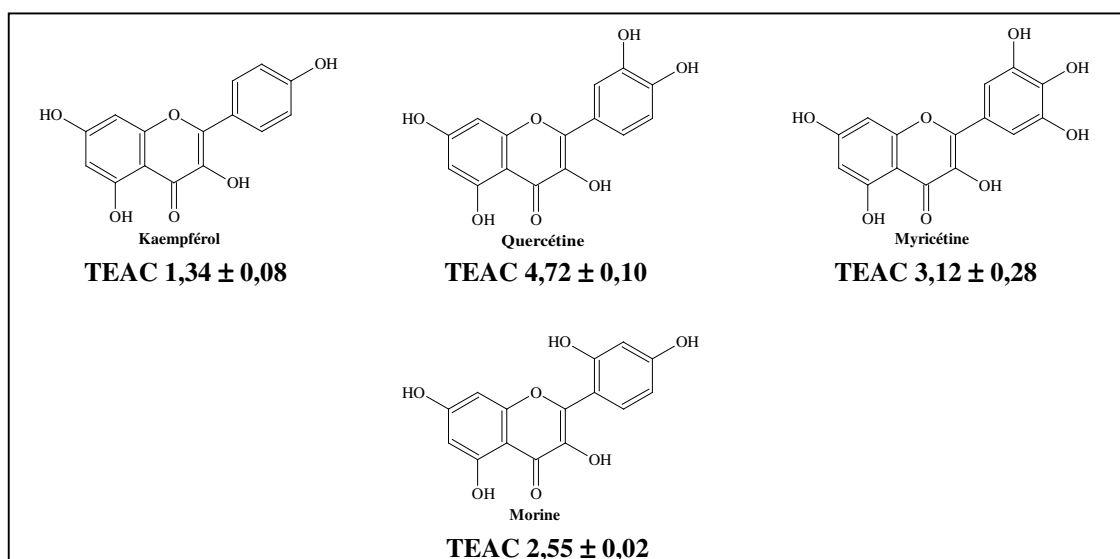


Figure 9 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols. Les valeurs sont exprimées en mM (*Rice-Evans, 1996*).

Pour les flavones, un cycle B dihydroxylé en ortho est aussi important pour l'activité antioxydante (**Figure 10**). En effet, les deux flavones, apigénine (3'-OH) et chrysin (sans groupement OH sur le cycle B) ont presque la même valeur de TEAC (**Figure 10**).

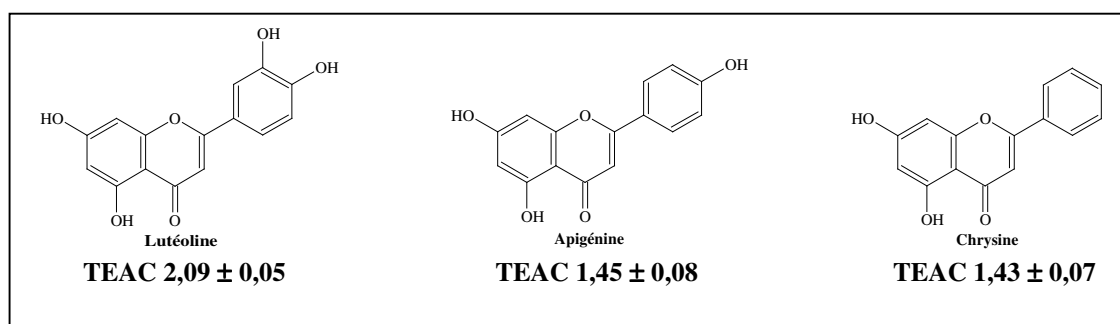


Figure 10 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones. Les valeurs sont exprimées en mM (*Rice-Evans, 1996*).

c) Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et la double liaison C2-C3

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante à 2,4 mM et 2,1 mM, respectivement (**Figure 11**). Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 adjacente à la fonction 4-oxo.

L'importance de la double liaison est confirmée en comparant l'activité de la quercétine avec celle de la taxifoline. En effet, cette dernière, sans double liaison (dihydroflavonol), est deux fois moins active que son analogue flavonol, la quercétine (**Figure 11**).

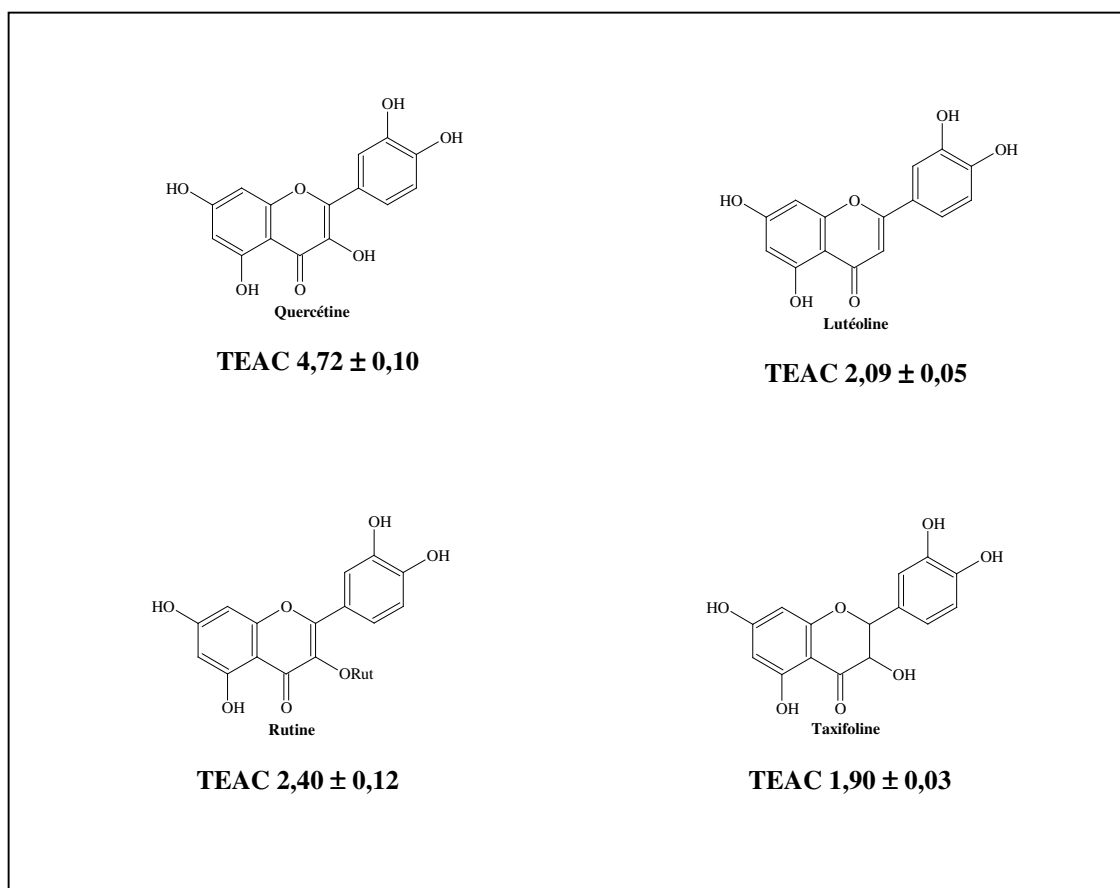


Figure 11 : Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3. Les valeurs sont exprimées en mM (*Rice-Evans, 1996*).

d) L'effet de la glycosylation sur l'activité des flavones et flavanones

La comparaison de la naringénine avec le naringoside (**Figure 12**) montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine), et la lutéoline avec son 3',7-diglucosides (**Figure 12**).

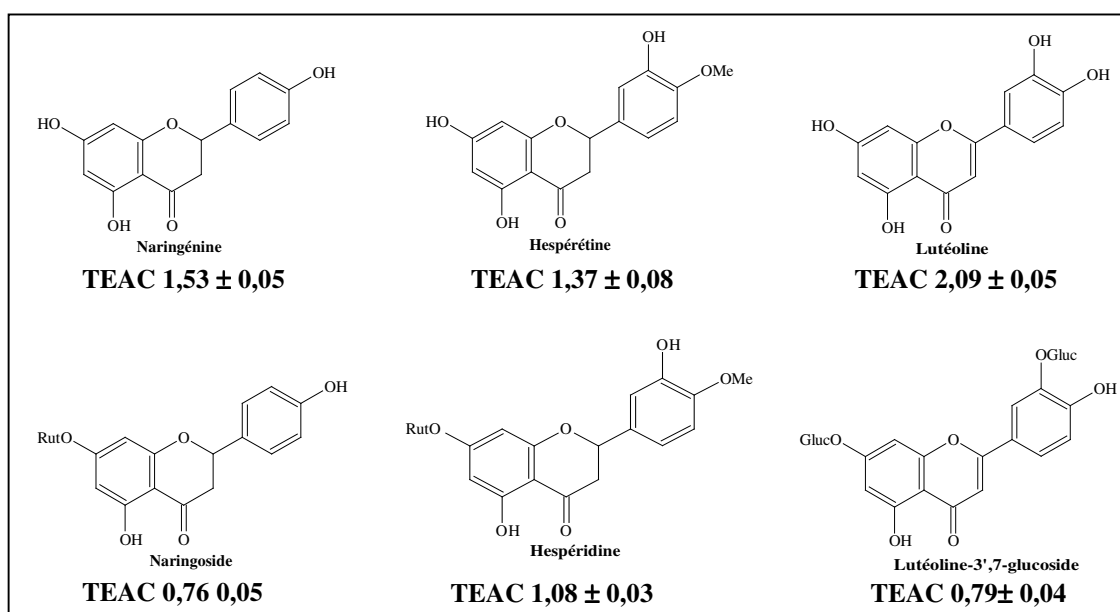


Figure 12 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones. Les valeurs sont exprimées en mM (*Rice-Evans, 1996*).

e) Anthocyanidols

Le cyanidol, un équivalent de la quercétine, est le composé le plus actif de ce type de flavonoïdes (**Figure 13**). L'élimination du groupe 3'-OH (pélargonidol) diminue le potentiel antioxydant comme c'est le cas pour le kaempférol en comparaison avec la quercétine. L'insertion d'un groupe méthoxyle en position 3' du cycle B (péonidol) augmente légèrement l'activité mais celle-ci reste toujours moins importante qu'avec un groupement catéchol (cycle B di-orthophénolique).

Le cyanidol, le delphinidol et le malvidol ont tous la même activité, ce qui montre qu'un cycle B trisubstitué ne semble pas être très important pour l'activité antioxydante des anthocyanidols (**Figure 13**).

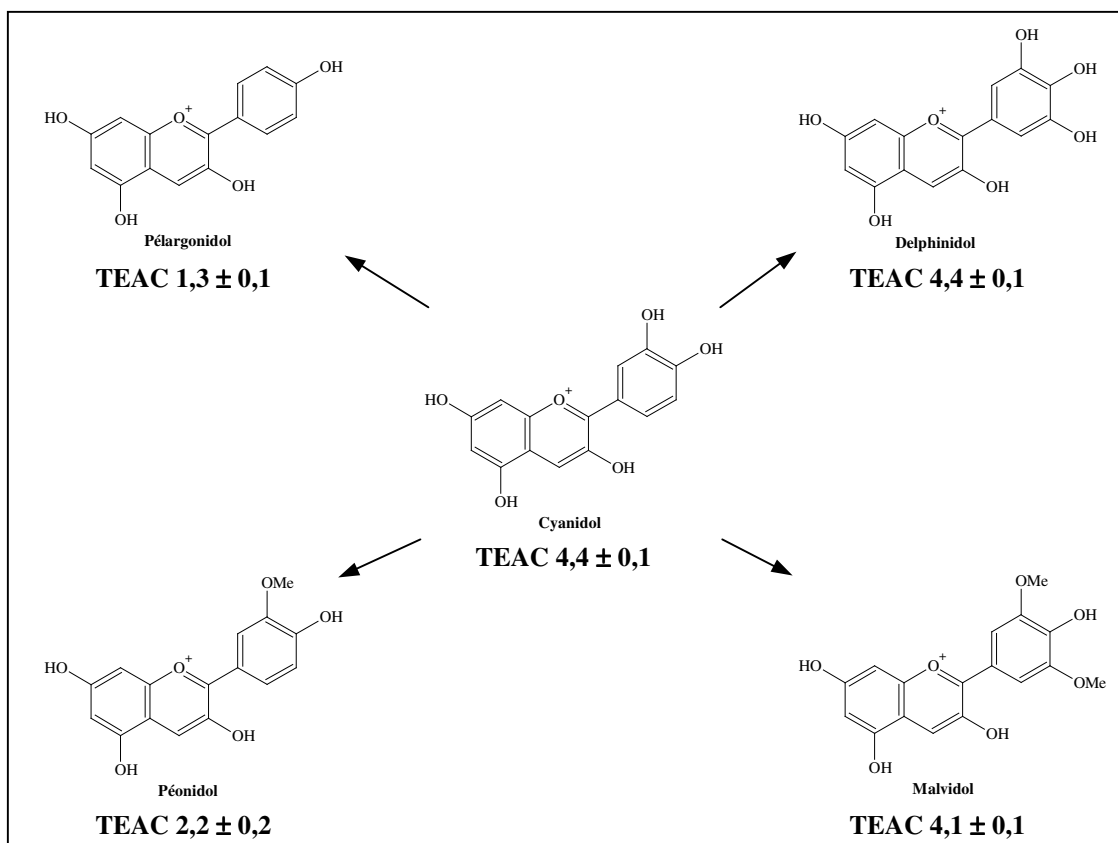


Figure 13 : Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidols. Les valeurs sont exprimées en mM (*Rice-Evans, 1996*).

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants:

1. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
2. La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
3. La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (**Figure 14**).

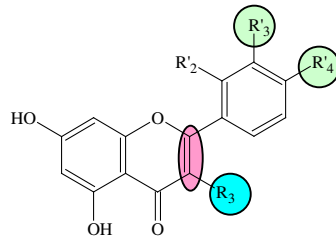


Figure 14 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

III.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses.

III.2.1. EFFETS ANTIALLERGIQUES

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺-dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (*Di Carlo, 1999*).

III.2.2. EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes (*Landolfi, 1984*). Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de

fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

III.2.3. EFFETS ANTI-ULCEREUX

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes (*Di Carlo, 1999*).

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel (*Izzo, 1996*). En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

III.2.4. EFFETS ANTICANCEREUX

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale (*Bracke, 1991*). Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (*Larocca, 1994*). La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres (*Di Carlo, 1999*). En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène (*Scutt, 1987*) et inhibe l'activité de la collagénase (*Makimura, 1993*).

III.2.5. D'AUTRES EFFETS BIOLOGIQUES

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (*Chaudhry, 1983*). Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (*Ong, 1997 ; Ong, 2000*).

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (*Hertog, 1993*).

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés (*Chu, 1992*).

CHAPITRE III

LA TECHNIQUE DE L'IRRADIATION : APPLICATION A LA
CONSERVATION DES ALIMENTS

LA TECHNIQUE D'IRRADIATION : APPLICATION A LA CONSERVATION DES ALIMENTS

INTRODUCTION

Les produits alimentaires sont périssables. En effet, l'infection bactérienne peut altérer les aliments et par la suite causer des maladies d'origine alimentaire. C'est pourquoi les scientifiques de l'industrie alimentaire cherchent continuellement des méthodes efficaces pour réduire l'altération en inhibant ou en détruisant les micro-organismes pathogènes afin de rendre les aliments plus sûrs tout en les gardant propres à l'alimentation humaine.

Depuis la fin du XVIII^e siècle, les techniques de conservation les plus utilisées sont le traitement par la chaleur (stérilisation, pasteurisation) et par le froid (réfrigération et surgélation). Dans les années soixante, il y a eu l'apparition d'un autre mode de préservation semblable à la pasteurisation, il s'agit de l'irradiation. C'est un procédé non chimique qui consiste à exposer les aliments à un rayonnement ionisant. Les premiers essais ont été réalisés sur les pommes de terre en 1960 afin d'éviter leur germination. Depuis, les autorités de 40 pays et nations ont autorisé l'irradiation de plus de 200 catégories d'aliments allant des épices aux grains en passant par la viande, les fruits et les légumes (*Urbain, 1986 ; IAEA, 2002*).

Dans une première partie, nous présenterons les fondements des techniques d'irradiation, puis nous montrerons ses applications sur les produits alimentaires.

I. CONSERVATION DES ALIMENTS PAR IRRADIATION

Rares sont les produits alimentaires animaux ou végétaux qui sont consommés à l'état naturel. Tous les produits ont été cueillis, conservés plus ou moins longtemps et pour certains cuisinés avant d'être consommés. Or, dans la plupart des cas, les tissus qui constituent les denrées évoluent de l'état vivant vers un état de décomposition qui est le processus naturel à partir du moment où la plante est récoltée ou l'animal abattu. Afin de freiner la décomposition, l'homme utilise divers procédés dont certains sont ancestraux comme le séchage au soleil, le fumage et la fermentation contrôlée. Ces méthodes ancestrales de conservation furent les seules utilisées jusqu'au début du 19^{ème} siècle, où Nicolas APPERT (1810) découvrit que le chauffage dans une boîte fermée conduisait à une longue conservation. Il fallut ensuite plus de 40 ans pour que Louis PASTEUR (1857) explique que le chauffage détruisait les micro-organismes et que la boîte close évitait toute contamination ultérieure. En 1868, Charles TELLIER venait d'ajouter la technique de congélation qui devenait ensuite la technique la plus importante et la plus utilisée à nos jours.

Dans les dernières années, des progrès considérables ont été accomplis dans le domaine de l'alimentation grâce à tout un faisceau de connaissances acquises par de nombreuses disciplines scientifiques : microbiologie, physiologie, biochimie, toxicologie, chimie et physique. L'exploitation rationnelle de ces connaissances a permis le développement de nombreux procédés de conservation comme la lyophilisation, l'emballage sous vide ou sous atmosphère contrôlée et enfin le traitement par rayonnements ionisants. Toutes ces techniques ont pour objectif principal d'éliminer les agents microbiens responsables des maladies d'origine alimentaire.

I.1. FACTEURS D'ALTERATION DES PRODUITS ALIMENTAIRES

Le degré d'altération d'un aliment n'est une notion simple qu'en terme de perte de qualité. Ces altérations résultent d'une action progressive de toute une série de facteurs agissant isolément ou simultanément sur une ou un ensemble de propriétés initiales considérées comme essentielles dans l'appréciation de la qualité. On peut rencontrer :

- Des altérations physiques : chocs, blessures et modifications d'état.
- Des altérations chimiques : oxydation.

➤ Des altérations biochimiques : soit d'origine interne sous l'action d'enzymes, soit d'origine externe : fermentation et développement des micro-organismes pathogènes.

1.1.1. LES ALTERATIONS D'ORIGINES INTERNES : ACTIONS ENZYMATIQUES

Catalyseurs d'un grand nombre de processus chimiques et biochimiques, les enzymes jouent un rôle très important dans le métabolisme cellulaire et dans la croissance de toutes les cellules vivantes. Elles ne sont pas modifiées par les réactions et peuvent alors servir très longtemps. L'action catalytique des enzymes permet à ces réactions d'évoluer rapidement aux températures et aux concentrations physiologiques. Dans les tissus vivants, ces réactions se modifient avec l'âge et conditionnent le phénomène de maturation. Ces différentes réactions sont couplées entre elles pour former des chaînes métaboliques qui, dans des conditions physiologiques normales, agissent régulièrement sans qu'il y ait accumulation de produits intermédiaires de métabolisme. Cette régulation métabolique précise est fragile et pourrait être bouleversée très facilement par la modification de facteurs extérieurs telle la température. Comme conséquence, il y aura un déséquilibre de la chaîne enzymatique résultant de l'accumulation de certains produits intermédiaires. Si parmi ceux-ci, il en est qui présentent un mauvais goût ou une odeur désagréable, leur accumulation pourra entraîner la dépréciation des qualités de l'aliment. Ces qualités peuvent être conservées en ralentissant les réactions enzymatiques par un abaissement de température. Mais certaines enzymes peuvent garder une activité même à des températures très basses et sous forme congelée. D'où la nécessité d'une inactivation, même pour les produits destinés à la surgélation.

Par ailleurs, lorsque les tissus végétaux sont hachés, broyés ou subissent tout autre traitement qui détruit les parois cellulaires sans inactiver les enzymes, celles-ci seront alors libres d'agir plus efficacement que dans les tissus vivants où leur action est plus contrôlée. De cette façon un facteur naturel de contrôle de l'activité enzymatique aura ainsi été supprimé. Il y a donc nécessité pour ce type de produit de réaliser dans les brefs délais l'inhibition des enzymes par un traitement thermique.

1.1.2. LES ALTERATIONS D'ORIGINES EXTERNES

Elles sont dues aux agents externes provoquant des réactions chimiques et biochimiques sans faire intervenir les enzymes internes. Par exemple, les réactions physico-chimiques résultent de l'action catalytique d'agents physiques (la lumière) ou chimiques (les

ions métalliques). Les réactions biochimiques, quant à elles, peuvent résulter de l'action de micro-organismes et de leurs enzymes. Pour croître et se multiplier, ces micro-organismes doivent se nourrir. La croissance des micro-organismes est conditionnée par la nature du substrat mais aussi par des facteurs physiques et chimiques du milieu tels que, par exemple, la teneur en eau et la présence de l'air.

Les micro-organismes sont classés, d'une manière générale, en bactéries, moisissures et levures. La plupart d'entre eux peuvent être détruits à des températures situées au voisinage du point d'ébullition de l'eau. Certains sont, cependant, doués d'une résistance à la chaleur nettement plus élevée que celles des cellules végétales.

Les bactéries

Les bactéries sont classées, suivant la température de leur croissance, en psychrophiles (entre 2° C et 10° C), mésophiles (entre 20° C et 45° C) et thermophiles (entre 50° C et 75° C). C'est surtout ce dernier type de bactéries résistantes à la chaleur qui peuvent se développer et produire des altérations.

Les levures

En se développant en milieu acide riche en hydrates de carbone, les levures sont très répandues sur les fruits et les fleurs. Elles sont des agents d'altération typiques des conserves de fruits insuffisamment chauffées. Certaines levures peuvent se développer dans des milieux très sucrés, et constituent par la suite la flore fermentante des marmelades et des fruits au sirop. La plupart des levures se développent en l'absence d'air, et souvent les traitements thermiques de pasteurisation suffisent à les détruire.

Les moisissures

Avec une activité assez semblable à celle des levures, les moisissures se développent en présence d'air, quasi exclusivement en surface et présentent une faible résistance thermique.

En général, toutes les altérations, qu'elles soient physiques, chimiques ou biochimiques, sont plus ou moins importantes en fonction principalement :

- de la protection physique des produits contre les chocs, la lumière et le contact de l'air (une des fonctions de l'emballage),
- de la température (réfrigération, congélation, température ambiante),
- de la teneur en eau des produits,
- et bien évidemment de la durée du stockage.

I.2. TRAITEMENT PAR IRRADIATION IONISANTE

L'irradiation des aliments est un mode de préservation semblable à la pasteurisation. Alors que cette dernière utilise la chaleur pour détruire les micro-organismes, l'irradiation utilise l'énergie sous forme d'un rayonnement ionisant.

I.2.1. RAYONNEMENTS IONISANTS

Le principe de la dualité onde-corpuscule explique que l'on peut décrire un rayonnement comme la propagation dans l'espace d'une onde ou de particules.

Un rayonnement ionisant est un rayonnement dont l'énergie est suffisante pour ioniser les atomes et les molécules qu'il rencontre sur son chemin, c'est-à-dire pour leur arracher un ou plusieurs électrons. Dans le cas où l'apport d'énergie fournie par le rayonnement est trop faible pour éjecter l'électron hors de l'atome cible, on dit que le rayonnement est non ionisant (la lumière visible, les micro-ondes et les ondes radioélectriques).

Les divers types de rayonnements ionisants sont :

- **Les particules α** : ce sont des noyaux d'hélium He^{2+} émises par des éléments radioactifs naturels tels que l'uranium et le radium, ainsi que par certains éléments artificiels. Ces particules ont une capacité de pénétration si faible qu'elles peuvent être arrêtées par une feuille de papier.

- **Les particules β** : ce sont des électrons qui ont une grande énergie cinétique positive ou négative. Comme ils sont plus petits que les particules α , ils ont un pouvoir de pénétration plus élevé.

- **Les électrons accélérés** : ils s'obtiennent à l'aide de générateurs électriques dont le principe de fonctionnement et la technologie déterminent les caractéristiques du faisceau

d'électrons émis. Cependant, pour ce qui concerne les traitements ionisants appliqués dans l'industrie agro-alimentaire, l'énergie des électrons mis en œuvre est limitée à 10 MeV.

➤ **Les rayons X** : ils résultent du freinage, à l'aide d'une cible constituée d'un métal lourd (par exemple, tungstène), d'électrons préalablement accélérés. L'interaction de ces électrons avec les atomes de la substance se traduit par un ralentissement des particules incidentes. Une fraction notable de l'énergie cinétique perdue par ces électrons se convertit plus ou moins en chaleur. Une autre partie est rayonnée hors de la cible sous la forme de photons X dont l'énergie peut être variable.

➤ **Les rayonnements γ** : ils sont émis par les noyaux radioactifs. Leur énergie est donc bien déterminée. Pour ioniser les denrées alimentaires, on utilise principalement comme sources de rayonnements le Cobalt 60 (^{60}Co) ou le Césium 137 (^{137}Cs) :

✓ Le cobalt 60, utilisé dans notre travail comme une source de rayonnement γ , possède un excès relatif de neutrons. En conséquence, il se désintègre par radioactivité β^- pour donner le nickel 60 (^{60}Ni) sous la forme excitée. Ce noyau fils se désexcite en émettant deux rayonnements γ d'énergies différentes (1,17 MeV et 1,33 MeV) (**Figure 15**).

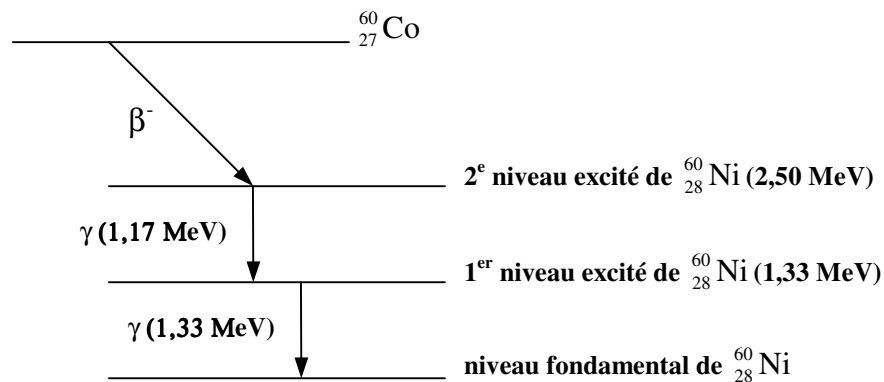


Figure 15 : Schéma de désintégration radioactive du ^{60}Co .

✓ Le césium 137 (^{137}Cs) se désintègre également par rayonnement β^- pour aboutir au baryum 137 (^{137}Ba). Lors de cette transformation, 5% seulement des noyaux de césium conduisent directement au baryum 137 à son état fondamental, alors que 95% se désintègrent pour donner le baryum 137 à l'état excité qui, à son tour, émet un photon γ de 0,662 MeV en revenant à son état stable.

1.2.2. RAYONNEMENTS IONISANTS UTILISES DANS LE TRAITEMENT DES ALIMENTS

Les rayonnements particulaires doivent présenter, pour ioniser le milieu traversé, un pouvoir de pénétration suffisant, ce qui élimine les particules α .

Les neutrons, en raison de leur absence de charge, possèdent un pouvoir de pénétration supérieur à celui des particules chargées et lourdes. Cependant, ils n'interagissent que très faiblement avec les électrons orbitaux des atomes de la matière irradiée. En effet, leur énergie cinétique se trouve principalement absorbée de manière progressive par leur interaction avec les noyaux de ces atomes. Une telle interaction est susceptible de créer des noyaux radioactifs au sein du milieu rencontré, ce qui rend évidemment ces particules impropres à une utilisation dans le domaine agro-alimentaire.

L'examen des valeurs des énergies d'ionisation des principaux atomes constituant la matière vivante (à savoir 13,58 eV pour l'hydrogène, 11,24 eV pour le carbone, 14,24 eV pour l'azote, et 13,57 eV pour l'oxygène) montre que les rayonnements possédant une énergie inférieure à une dizaine d'électrons-Volts ne peuvent pas provoquer l'ionisation des milieux biologiques soumis à leur action.

Les rayonnements γ issus du cobalt 60 ou du césium 137 ont tous des énergies très supérieures aux énergies d'ionisation des atomes cités ci-dessus, par conséquent, ils peuvent provoquer l'ionisation de la matière qu'ils rencontrent.

Les rayons X caractérisés par des longueurs d'ondes inférieures à 0,1 μm sont aussi capables de déclencher le phénomène d'ionisation. En revanche, les ondes radioélectriques, l'ultraviolet, la lumière visible, l'infrarouge et les micro-ondes ne manifestent aucun pouvoir ionisant.

L'application de l'irradiation en agro-alimentaire consiste alors à exposer des aliments, pour un temps donné, à un faisceau d'électrons, rayons X ou dans la plupart des cas, des rayons γ . A l'inverse des micro-ondes qui ont pour effet de produire de la chaleur, de cuire la

nourriture, l'irradiation n'entraîne pas une élévation marquée de la température de l'aliment. C'est pourquoi le processus d'irradiation est souvent appelé pasteurisation froide.

Tout comme certains consommateurs qui pensaient initialement que les aliments cuits au four à micro-ondes pouvaient être radioactifs, d'autres pensent également que les aliments irradiés peuvent devenir radioactifs. Cette opinion s'avère inexacte parce que les rayonnements utilisés dans le traitement des aliments par irradiation (rayonnement γ , rayons X ou électrons accélérés) ne peuvent en aucun cas perturber le noyau de l'atome. Ils n'agissent qu'au niveau des couches électroniques et ne peuvent absolument pas induire dans la matière irradiée le phénomène de radioactivité.

L'irradiation des aliments a été étudiée et testée beaucoup plus que tout autre procédé de préparation ou de conservation des aliments. Il a été montré qu'elle comporte plusieurs bénéfices dont les suivants :

- Elle détruit les bactéries telles que *Escherichia coli* et les moisissures qui contaminent les aliments et causent leur altération, et par conséquent permet de retarder le mûrissement et la maturation des fruits et des légumes et en prolonge la durée de conservation de plusieurs semaines à la température ambiante.

- Elle inhibe la croissance des insectes nuisibles dans les fruits et les légumes secs, la farine et les grains.

- Elle détruit les germes pathogènes dans les viandes, en particulier porc et volaille fortement contaminés par *Salmonella* ou *Campylobacter*.

- Elle a aussi l'avantage indéniable de remplacer l'utilisation d'agents de fumigation, notamment du dibromure d'éthylène interdit depuis 1984, et d'autres agents de stérilisation comme l'oxyde d'éthylène et les nitrites. Ces substances chimiques peuvent favoriser le développement de cancers, et l'irradiation dans ce sens pourrait remplacer ces éléments.

Les aliments sont alors irradiés dans une chambre aux murs épais contenant une source de rayonnements ionisants qui passent à travers l'aliment et détruisent les insectes, les bactéries et les autres micro-organismes. Quel que soit le type de rayonnement utilisé (faisceau d'électrons, rayons X ou γ), le processus est le même : l'énergie contenue dans les rayons est transférée aux molécules du produit alimentaire irradié, ce qui permet de convertir les atomes et les molécules en ions et radicaux. Ces espèces ioniques et radicalaires perturbent

les fonctions normales des différents micro-organismes et diminuent leur activité et par conséquent, ils ne peuvent plus causer l'altération de l'aliment.

1.2.3. DEFINITION DE LA DOSE

On définit la dose absorbée comme étant la quantité d'énergie absorbée par unité de masse du matériau irradié :

$$D = \frac{E}{m}$$

L'unité de dose est le Gy :

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$$

Comme pour d'autres traitements physiques tels que le traitement thermique qui dépend de la température, les effets des rayonnements varient avec la dose appliquée. Ces effets diffèrent d'un micro-organisme à l'autre et d'un aliment à l'autre. Les doses les plus couramment utilisées en agro-alimentaire varient de 0,10 kGy à 30 kGy. Selon le but recherché, on distingue trois applications (**Tableau 2**) (*Urbain, 1986*) :

- Application à faibles doses (inférieures à 1 kGy), en vue de la décontamination et l'inhibition de la germination.
- Application à des doses moyennes (de 1 à 10 kGy) pour augmenter la durée de conservation.
- Application à fortes doses (de 10 à 30 kGy) afin d'éliminer les germes pathogènes.

a) Traitement à faibles doses : inhibition de la germination et désinsectisation

Le traitement des oignons, pommes de terre, échalotes et ails a montré que de faibles doses, entre 50 et 150 Gy, permettent un contrôle efficace de la germination. Ces doses ne provoquent pas d'effets indésirables sur le produit. Elles sont fonction de la variété et de la maturité. L'ionisation est remarquablement efficace si le traitement s'effectue pendant la période de dormance, généralement le mois suivant la récolte.

Les effets des rayonnements sur les insectes ravageurs sont fonction du stade de développement et de l'espèce. L'ionisation à des doses comprises entre 0,15 et 1 kGy, est utilisée pour la désinsectisation de denrées stockées telles que céréales, noix, fruits et légumes

secs et farines. A la différence de la fumigation chimique, un avantage décisif de l'ionisation réside dans la capacité à traiter les œufs des insectes cachés dans les grains ou les fruits. L'utilisation d'une dose minimale de 0,15 kGy est de plus en plus reconnue par les autorités de quarantaine comme un procédé valable pour la désinsectisation, en particulier pour les fruits tropicaux et subtropicaux.

Tableau 2 : Les doses utilisées en agro-alimentaire (*Urbain, 1986*).

	Dose (kGy)	Effet	Aliments
Faibles Doses	0,05 - 0,15	Inhibition de la germination	Pommes de terre Oignons, ails
	0,15 - 0,50	Désinsectisation et déparasitage	Céréales Fruits frais et secs Poisson et viande
	0,50 - 1,0	Ralentissement des processus physiologiques	Fruits et légumes
Doses Moyennes	1,0 - 3,0	Prolongation de la conservation	Poissons frais Fraises framboises
	1,0 - 7,0	Elimination des micro-organismes pathogènes	Fruits de mer Raisins, fraises Volaille et viande
	10,0 - 30,0	Décontamination des ingrédients alimentaires	Epices
Fortes Doses	30,0 - 50,0	Stérilisation industrielle	Viande, volaille

b) Traitement à doses moyennes

De nombreux ingrédients secs (en particulier les épices et les herbes aromatiques), fruits et légumes peuvent être contaminés par des micro-organismes parfois pathogènes pour l'homme. L'ionisation de ces aliments à des doses comprises entre 1 et 10 kGy réduit la charge microbienne de 10^3 , voire 10^5 germes par gramme, essentiellement des bactéries, des levures ou des moisissures. En conséquence, la durée de vie de ces produits se trouve augmentée. En France, l'ionisation à des doses de 3 kGy, 5 kGy, 9 kGy, 10 kGy et 11 kGy est

autorisée pour la débactérisation et l'augmentation de la durée de conservation, respectivement, des fraises, la farine de riz, la gomme arabique, des légumes déshydratés et des épices (Vasseur, 1991).

Un aliment traité par irradiation devient stérile lorsqu'il « absorbe » une dose provoquant la destruction de 90% de micro-organismes qu'il contient. Cette dose est appelée Dose de Réduction Décimale (DR 10) ou Dose Létale 90 (DL 90). Elle varie d'un micro-organisme à l'autre et également avec la nature du milieu (pH, présence d'oxygène). Dans le **Tableau 3**, nous avons regroupé la DR 10 des principaux micro-organismes rencontrés dans les produits alimentaires.

Tableau 3 : La dose de réduction décimale (DR 10) de micro-organismes fréquemment rencontrés dans les produits alimentaires (Urbain, 1986).

Micro-organismes	Espèces	DR 10 (kGy)
Bactéries	<i>Lactobacillus</i>	0,15
	<i>Micrococcus</i>	0,70
	<i>Pseudomonas</i>	0,06
	<i>Escherichia coli</i>	0,10
	<i>Salmonella</i>	0,70
	<i>Campylobacter</i>	0,08 - 0,16
	<i>Listeria</i>	0,2 - 1,10
Moisissures	Spores de <i>Penicillium</i>	0,40
	Spores de <i>Cladosporium</i>	1,30
Virus	Polio myélite	14,00

c) Traitement à fortes doses

L'emploi de doses stérilisantes, de plusieurs dizaines de kilograys, demande dans la majorité des pays, une dérogation particulière. De ce fait, les applications sont aujourd'hui limitées à quelques cas spécifiques. Sachant qu'une dose minimum de 20 kGy est nécessaire pour une sécurité microbiologique, les doses utilisées sont très élevées et peuvent atteindre 50 kGy. La viande, le poisson, les légumes, les mélanges de céréales, les plats complets et les boissons en poudre peuvent être ainsi stérilisés. Les conditions de traitement telles que température et emballage sont extrêmement importantes pour la qualité finale de l'aliment; ainsi la plupart des stérilisations par ionisation se font sur le produit congelé afin d'éviter le

développement d'odeurs désagréables. L'aliment traité est généralement conditionné dans un emballage adéquat pour éviter toute recontamination ou toute altération par des agents extérieurs.

I. 3. APPLICATIONS DE L'IONISATION AUX FRUITS ET LEGUMES

I.3.1. FRUITS

Depuis la découverte de la technique du traitement des aliments par irradiation, un très grand nombre d'espèces ont été soumises expérimentalement aux rayonnements ionisants. Citons, entre autres, les fraises, les pommes, les pêches et nectarines, les fruits rouges, les oranges, la châtaigne, les prunes et les raisins.

a) Fraises

C'est le fruit qui incontestablement a été jusqu'à présent le plus étudié pour l'application du traitement ionisant. Les essais entrepris montrent que l'ionisation permet de limiter nettement le développement des moisissures affectant les fraises. Les effets de l'irradiation diffèrent d'une variété à l'autre. Par exemple, le *Tioga* ou *Selecta* d'origine américaine montrent une grande résistance à l'ionisation ainsi des doses plus élevées ont été appliquées sans modification de la qualité de l'aliment. Par contre, des variétés comme *Fayette*, *Red Gontlet* ou *Brighton* supportent moins bien l'effet des rayonnements. Ceux-ci affectent, en effet, la texture des fraises qui s'amollit permettant la croissance rapide des micro-organismes encore présents après l'ionisation.

Les essais entrepris en France montrent que la variété *Gorella* peut être conservée dans un aspect de fraîcheur entre 4 et 6° C pendant au moins 10 jours. Cette variété doit être traitée dans les 24 ou 48 heures après la récolte avec des doses allant de 1,7 à 2,6 kGy. Cependant, des doses plus élevées, des délais de traitement plus tardifs ou des niveaux thermiques de conservation plus hauts entraînent la modification des qualités organoleptiques ou limitent le potentiel de survie après récolte et donc imposeraient une commercialisation à plus court terme (4 à 6 jours).

Afin de diminuer les doses nécessaires au contrôle des pourritures, on a envisagé d'appliquer des traitements combinés. Ainsi, à l'ionisation on a associé des traitements thermiques. En effet, un traitement à 40° C pendant 10 minutes permet de réduire la dose

efficace de 2 à 1 kGy et de n'avoir que 2% de fraises atteintes de pourritures après 7 jours d'entreposage à + 5° C contre 44% pour le témoin.

b) Framboises

Comme pour les fraises, les essais ont été réalisés sur plusieurs variétés de framboises. Les meilleurs résultats sont obtenus sur la variété *Neeker* à une dose de 1 kGy. Là aussi des traitements à une dose de 2 ou 3 kGy affectent très fortement la physiologie et les qualités organoleptiques des framboises malgré leur action limitant très nettement le développement des micro-organismes pathogènes, bactéries et moisissures. On a observé également que l'association avec un entreposage au froid reste indispensable. Par exemple, un facteur de 3 est obtenu entre le pourcentage d'altérations d'une framboise irradiée à 1 kGy et conservée à + 4° C (5%) et celui correspond à une conservation à la température ambiante (15%).

c) Pruneau

Cet aliment très riche en sucre présente un terrain favorable pour le développement des micro-organismes. Le traitement par rayonnement ionisant à des doses de 6 à 8 kGy permet de lutter efficacement contre ces atteintes. L'ionisation provoque aussi un assouplissement de la texture et n'altère pas les autres caractéristiques organoleptiques du produit.

d) Pommes et poires

Quoique le principal intérêt du traitement des pommes et des poires par irradiation réside dans la lutte contre des larves d'insectes de type *Leucoptera* à des faibles doses de 0,6 kGy, un traitement de 2 ou 3 kGy permet aussi de limiter efficacement le développement de moisissures comme le *Gloesporium*, le *Penicillium* ou le *Botrytis*. Cependant, à ces doses on a observé des modifications indésirables telles que ramollissement de la chair ou accélération de la maturation.

e) Mangue et papaye

Pour ces deux espèces, il apparaît que le traitement le plus efficace est la combinaison d'une ionisation à 0,7 kGy et un trempage dans de l'eau à 50° C pendant une dizaine de

minutes. Ce traitement permet de réduire significativement les problèmes d'insectes, de moisissures et assure un retard de maturation. Il en résulte que leur qualité peut être maintenue pendant quelques jours, surtout lorsque les fruits sont conservés sous froid à 11° C.

1.3.2. LEGUMES

Les légumes sont plus fermes et moins fragiles que les fruits, ainsi ils se prêtent souvent mieux au traitement ionisant que les fruits. De nombreuses espèces ont été soumises à l'ionisation, citons par exemple, oignons, ails, échalotes, pommes de terre et champignons.

a) Pommes de terre

Les pommes de terre ont été les premiers légumes soumis aux essais du traitement ionisant par Brunelet et Vidal au cours des années 1960. Les résultats ont montré que le traitement avec une faible dose de 0,1 kGy permet d'inhiber la germination et d'assurer une parfaite conservation pendant une période d'un an des tubercules à + 10° C.

b) Ails, oignons et échalotes

Les essais entrepris sur ces aliments ont montré que l'application doit être pratiquée dans les 2 à 3 semaines qui suivent la récolte. Les effets sont comparables à ceux obtenus pour la pomme de terre. Pour des échalotes contenant respectivement 72% et 100% de bulbes germés, l'ionisation avec une dose de l'ordre de 0,1 kGy permet de diminuer le nombre de germinations à 5% et 10%, respectivement. Après irradiation, une conservation à froid (+ 10° C) assure un maintien de qualité pendant plusieurs mois.

c) Champignons

Les champignons sont trop sensibles à plusieurs facteurs tels que la lumière, la température et l'humidité, et par conséquent, ils perdent leur qualité en 2 à 3 jours. Un traitement par irradiation en combinaison avec emballage plastique permet d'augmenter la durée de conservation de 4 à 5 jours.

I.4. EFFET DE L'IRRADIATION SUR LES FLAVONOÏDES PRESENTS DANS LES FRUITS

I.4.1. FRAISES

Les fraises sont caractérisées par une courte durée de vie. Pour les conserver, neuf pays ont autorisé leur irradiation avec une dose maximale de 3 kGy (IAEA, 2002). Cette dose permet de multiplier la durée de vie des fraises par un facteur 2. Pour les fraises irradiées, des modifications de texture et de couleur sont observées (IAEA, 2002). Ceci est une preuve visible que l'irradiation peut provoquer des changements structuraux des groupes moléculaires constituant ces fruits.

Pour étudier un tel processus, des fraises fraîches sont irradiées à température ambiante avec des doses allant de 1 à 6 kGy (Breitfellner, 2002 ; Breitfellner, 2003). Les échantillons irradiés et non irradiés sont hachés puis dissous dans le méthanol.

L'analyse, par CLHP et LC-MS, des échantillons non irradiés a montré la présence d'acides phénoliques (acide 4-hydroxybenzoïque, acide *p*-coumarique, acide caféique et acide gallique) et de flavonoïdes (kaempférol-3-O-glucoside, quercétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-galactoside, (+)-épicatéchine et (+)-catéchine) (**Figure 16**).

Après irradiation, les auteurs ont observé que l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide gallique ne sont pas affectés par l'irradiation, en revanche la concentration d'acide 4-hydroxybenzoïque augmente linéairement avec la dose (**Figure 17**).

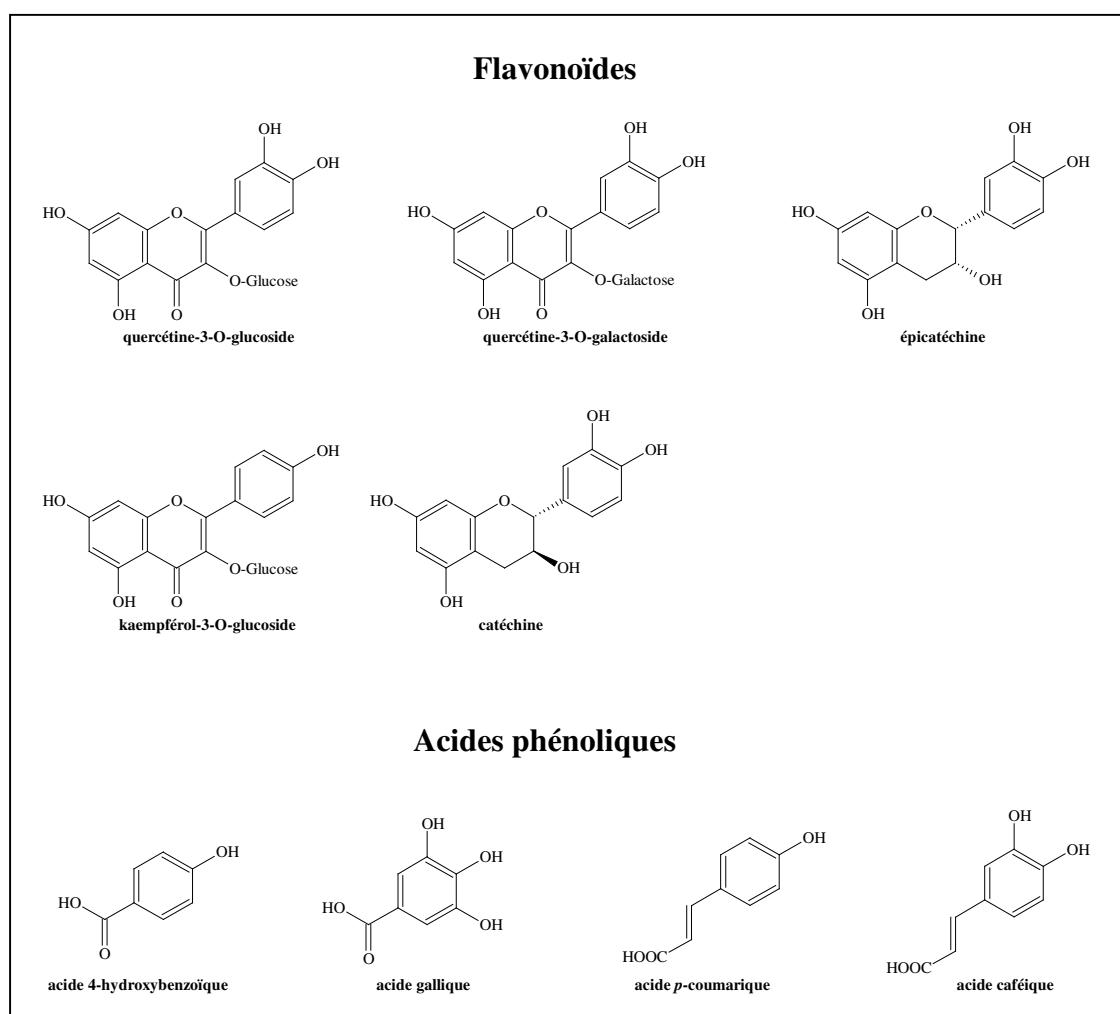


Figure 16 : Structures chimiques de flavonoïdes et d'acides phénoliques présents dans les fraises (*Breitfellner, 2002 ; Breitfellner, 2003*).

En ce qui concerne les flavonoïdes, la concentration de la (+) catéchine, de la (+)-épicatechine et du kaempférol-3-O-glucoside diminue significativement au cours de l'irradiation (**Figure 17**). En outre, l'irradiation n'a montré aucun effet sur la concentration de la quercétine-3-O-glucoside et de la quercétine-3-galactoside malgré l'application d'une dose supérieure à 6 kGy.

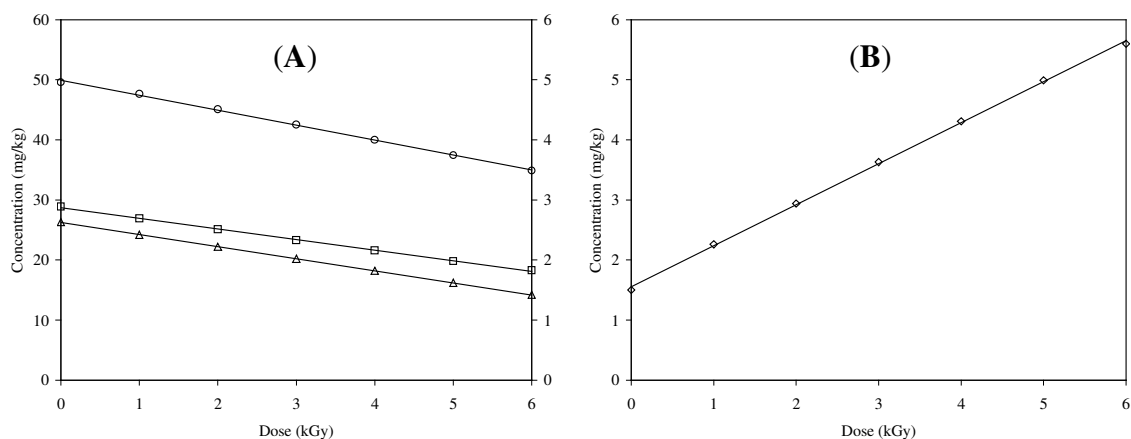


Figure 17 : (A) Dégradation de la (+)-catéchine (O, échelle gauche), de la (+)-épicatéchine (□) et du kaempférol-3-glucoside (Δ) (échelle droite) et (B) formation d'acide 4-hydroxybenzoïque (◇) présents dans la fraise en fonction de la dose appliquée (Breitfellner, 2003).

1.4.2. CLEMENTINE

La clémentine est également une source importante de flavonoïdes tels que les flavanones glycosylées et les flavones polyméthoxylées (**Tableau 4**) (Oufedjikh, 2000).

Tableau 4 : Structures chimiques des flavonoïdes présents dans la clémentine (**Figure 1**) (Oufedjikh, 2000).

Flavonoïdes	Substituants des flavones et flavanones						
	3	5	6	7	8	3'	4'
ériocitrine		OH		ORut		OH	OH
narirutine		OH		ORut			OH
hespéridine		OH		ORut		OH	OCH ₃
didymine		OH		ORut			OCH ₃
scutélarine		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃			OCH ₃
isoscutélarine		OCH ₃		OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃
tangéretine		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃
sinensétine		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃	OCH ₃
nobilétine		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
quercétogétine	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		OCH ₃
heptaméthoxyflavone	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

Oufedjikh et ses collaborateurs ont étudié par CLHP l'effet de l'irradiation γ sur ce fruit. Avec une dose de 0,3 kGy, ils ont montré que les concentrations de flavanones glycosylées et de flavones polyméthoxylées présentes dans l'échantillon irradié sont deux fois inférieures à celles présentes dans le témoin (fruit non irradié). Ceci constitue le seul élément de cette étude qui permet de montrer que l'irradiation entraîne la dégradation de ces flavonoïdes, en revanche aucune information sur le mécanisme de dégradation n'a été proposé.

Pour les flavones méthoxylées, les auteurs ont observé que plus le nombre de groupements méthoxyles constituant la molécule est important, plus sa dégradation est importante (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Relation entre le degré de dégradation des flavonoïdes polyméthoxylés présents dans la clémentine et le nombre de groupements méthoxyles les constituant. La dose d'irradiation est de 0,3 kGy et les concentrations sont exprimées en mg/100 g (*Oufedjikh, 2000*).

Flavonoïdes	nombre de groupes méthoxyles	Concentration avant irradiation	Concentration après irradiation	% de dégradation
scutélarine	4	1,41	1,21	14,2
isoscutélarine	4	2,00	1,71	14,5
tangéretine	5	5,70	4,57	19,8
sinensétine	5	1,44	1,14	20,8
nobilétine	6	5,92	4,70	20,6
quercétogétine	6	0,77	0,57	26,0
heptaméthoxyflavone	7	0,85	0,60	29,4

A partir de ces études, nous constatons clairement que l'irradiation affecte les flavonoïdes présents dans les aliments et, par conséquent, elle peut conduire à la formation de substances chimiques appelées produits radiolytiques, qui n'ont pas été identifiés. Dans notre travail, nous irons plus loin dans l'étude des réactions physico-chimiques permettant de comprendre la formation de ces produits.

CHAPITRE IV

RADIOLYSE DES SOLUTIONS

RADIOLYSE DES SOLUTIONS

INTRODUCTION

La radiolyse est l'ensemble des transformations chimiques provoquées dans la matière par l'absorption de l'énergie d'un rayonnement ionisant. Ces transformations sont dues aux interactions des photons incidents avec les molécules de la matière irradiée. Elles sont quantifiées par le rendement radiolytique G donné par l'équation (éq. 1) (*Fricke, 1966*) en $\mu\text{mol J}^{-1}$:

$$G = \frac{\Delta M}{D \times \rho} \times 10^6 \mu\text{mol J}^{-1} \quad (\text{éq. 1})$$

où ΔM est la concentration en mol/l (M), D est la dose et ρ la densité du milieu irradié.

Cette partie du manuscrit porte sur la description de la radiolyse de l'eau, principal constituant de la matière vivante, ainsi que celle du méthanol et de l'éthanol, très largement utilisés en physico-chimie comme solvants. Nous évoquerons également la radiolyse des solutions (soluté/solvant).

I. LES ÉTAPES DE LA RADIOLYSE DES LIQUIDES

Lorsqu'un liquide, noté RH , est soumis à un rayonnement, l'étape primaire est l'excitation ou l'ionisation du solvant :



Il existe alors dans le milieu une distribution de molécules excitées (RH^*) ou ionisées ($RH^{+\bullet}$). R peut représenter des groupements aussi divers que OH (pour l'eau), OCH_3 (pour le méthanol), OCH_2CH_3 (pour l'éthanol). Il est évident que les quantités de $RH^{+\bullet}$ et d'électrons formées sont égales, et que la quantité de RH détruite est égale à la somme de RH^* et de paires ($RH^{+\bullet}$, e^-) formées, dites géminées.

Les paires géminées, séparées par des distances courtes, subissent une attraction coulombienne mutuelle, d'autant plus forte que le cation géminé est fortement chargé, et une partie d'entre elles se recombine.

Dans les liquides polaires comme l'eau et les alcools, les électrons perdent leur énergie cinétique par collision avec les molécules du solvant en provoquant d'autres ionisations et excitations. Ils deviennent thermalisés puis solvatés (e_s^-). Cette étape de solvation est d'autant plus lente que les molécules sont grandes et que la viscosité du liquide est élevée.

Dans le même temps, RH^* et RH^+ se dissocient ou réagissent avec RH pour donner naissance à des radicaux libres. Cette étape dure un temps inférieur à la picoseconde pour l'eau et les alcools (méthanol et éthanol). La diffusion n'a pas le temps d'intervenir, c'est pourquoi les espèces primaires (radicaux libres et e_s^-) créées par radiolyse sont initialement groupées sur le lieu de formation, les grappes. Ceci favorise leurs réactions mutuelles qui sont en compétition avec la diffusion.

A l'étape suivante, au terme de la diffusion (stade homogène – 10^{-9} s), le bilan typique en produits radiolytiques (radicalaires et moléculaires) à la fin de cette étape est donc :



II. RADIOLYSE DE L'EAU

En chimie sous rayonnement, l'eau a été, depuis les origines de cette discipline, le solvant le plus étudié. Comme nous venons de l'évoquer, l'eau liquide irradiée se décompose principalement en produits radicalaires notamment e_{aq}^- (électron hydraté), H^\bullet , HO^\bullet et moléculaires H_2 et H_2O_2 (Buxton, 1987 ; Cobut, 1994 ; Cobut, 1996 ; Jay-Gerin, 2000). Le mécanisme permettant la formation de ces entités est présenté sur la **Figure 18**. Leurs rendements radiolytiques, déterminés au stade homogène par les différents groupes de recherche, sont donnés dans le **Tableau 6**.

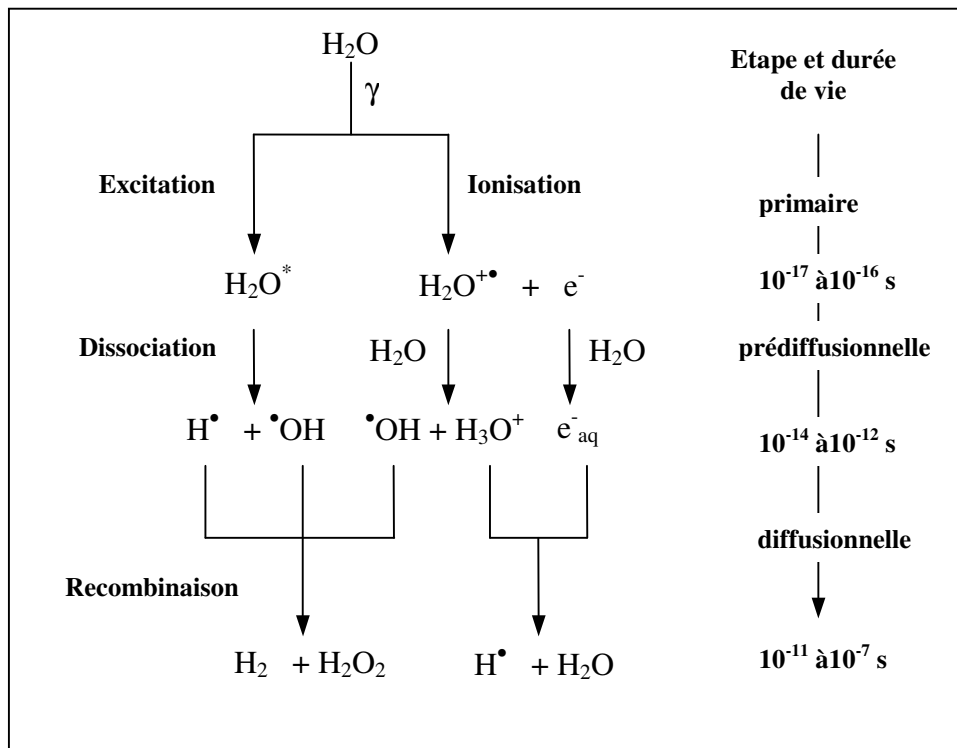


Figure 18 : Radiolyse de l'eau (Buxton, 1987 ; Cobut, 1994 ; Cobut, 1996 ; Jay-Gerin, 2000).

Tableau 6 : Rendements radiolytiques des espèces radicalaires et moléculaires formées lors de la radiolyse de l'eau (Buxton, 1987 ; Cobut, 1994 ; Cobut, 1996 ; Jay-Gerin, 2000).

Espèce	e^-_{aq}	H^\bullet	HO^\bullet	H_2	H_2O_2
Rendement ($\mu\text{mol J}^{-1}$)	0,27	0,06	0,27	0,04	0,07

III. RADIOLYSE DU METHANOL

La radiolyse des alcools a également été un sujet très étudié. Le méthanol semble particulièrement intéressant à divers égards. D'une part ce solvant offre, par ses caractéristiques physico-chimiques, la possibilité d'établir des comparaisons utiles avec l'eau. D'autre part, le méthanol peut être utilisé comme solvant pour étudier la radiolyse de nombreux solutés non solubles dans l'eau, tel que les flavonoïdes. Ceci nécessite une bonne connaissance du mécanisme de radiolyse de ce solvant.

Les résultats obtenus par diverses équipes de recherche (*Baxendale, 1972; Pikaev, 1989; Getoff, 1993*) ont montré que le mécanisme des réactions se déroulant lors de l'irradiation du méthanol (**Figure 19**) est semblable à celui de l'eau.

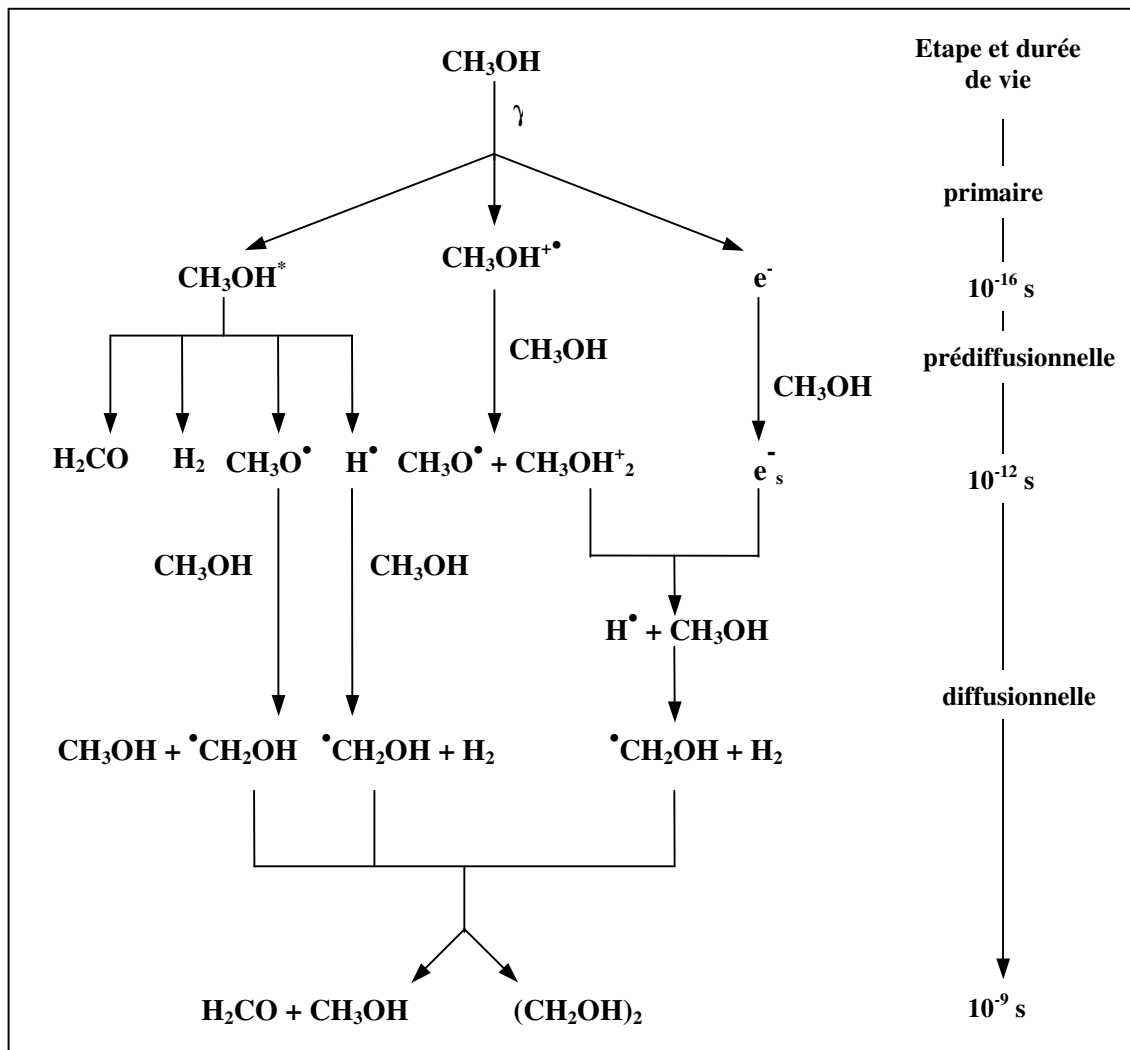
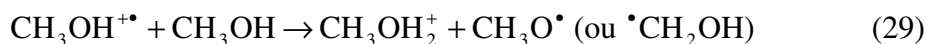


Figure 19 : Radiolyse du méthanol (*Lind, 1979 ; Wargon, 1972; Shiotani, 1976; Getoff, 1992 ; Getoff, 1993*).

Le passage du rayonnement engendre l'ionisation primaire :



suivie par la réaction très rapide de transfert de proton (*Shiotani, 1976*) :



Il a été montré que dans les premières étapes, $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ se forme préférentiellement par rapport à $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ (*Wargon, 1972; Sargeant, 1974; Schlick, 1976; Shiotani, 1976; Lind, 1979; Getoff, 1993*).

Quant à l'électron éjecté, comme dans le cas de l'ionisation de l'eau, il perd son énergie par ionisations et excitations successives et devient thermalisé, puis solvaté (e_s^-) :



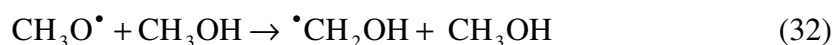
Le temps d'apparition de cette espèce radiolytique a été calculé par plusieurs groupes de recherche (*Taub, 1962; Chase, 1975; Wang, 1980; Hirata, 1990; Pépin, 1994; Shi, 1995*). Il est de l'ordre de 6-10 ps.

Dans le même temps, les molécules excitées CH_3OH^* se dissocient et conduisent, soit à la formation de H^\bullet et $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$, soit à la formation d'hydrogène moléculaire et de formaldéhyde :

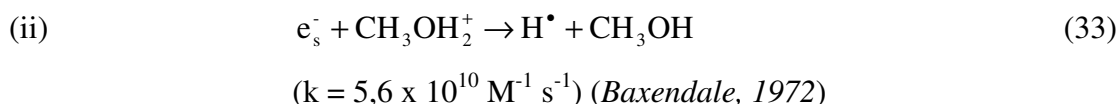


En résumé, 10 ps après l'absorption du rayonnement, le méthanol irradié devient un mélange composé principalement de CH_3OH_2^+ , de e_s^- , de H^\bullet et de radicaux $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$, équivalents des radicaux $\bullet\text{OH}$ formés lors de la radiolyse de l'eau. Ces espèces radiolytiques peuvent réagir ensuite soit avec le solvant soit entre elles pour donner d'autres entités. Les réactions suivantes sont alors envisageables :

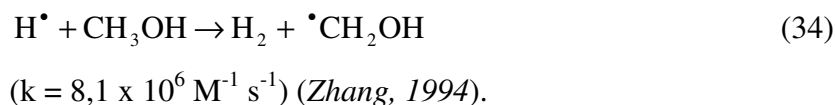
(i) le radical oxydant $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ conduit, par réaction avec le méthanol, au radical isomère $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ thermodynamiquement plus stable (*Shiotani, 1976*) :



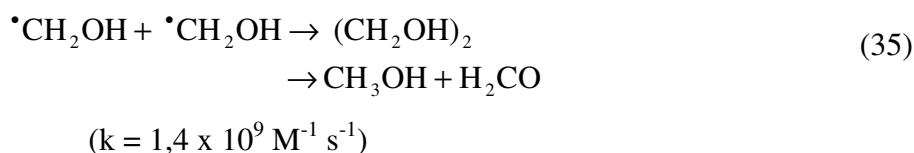
La constante de vitesse de cette réaction est $k = 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (*Ellison, 1972*).



suivie de la disparition de H^\bullet selon :



(iii) le radical $\bullet CH_2OH$, peut lui aussi disparaître conduisant à des produits stables tels que l'éthylène glycol $(CH_2OH)_2$ et le formaldéhyde (H_2CO) suivant les réactions de dismutation (*Getoff, 1993*) :



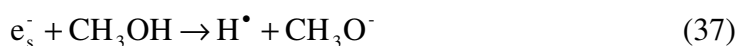
Pour le méthanol, comme pour l'eau, il est nécessaire de connaître la durée de vie des zones hétérogènes. On a constaté que le rendement de e_s^- initial est de l'ordre de $0,35 \mu\text{mol J}^{-1}$ à 30 ps, puis décroît jusqu'à environ $0,2 \mu\text{mol J}^{-1}$ à 1 μs (*Sauer, 1965; Bronskill, 1970; Baxendale, 1972; Johnson, 1977a; Kalachandra, 1983*). L'homogénéisation des espèces présentes dans le milieu semble alors survenir vers 50 ns, ce qui est sensiblement plus rapide que pour la radiolyse de l'eau où l'étape homogène commence vers 0,1 μs (*Buxton, 1987; Cobut, 1994*).

Si l'on continue à développer le parallèle avec la radiolyse de l'eau, l'électron solvaté subit diverses réactions, et tout d'abord, sa dismutation :



D'après Fletcher et Richards, la valeur de la constante de vitesse de cette réaction est de l'ordre de $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (*Fletcher, 1971*). En adoptant la même valeur, Johnson et Salmon ont montré que cette réaction de dismutation de e_s^- ne peut pas intervenir d'une façon notable dans les zones hétérogènes (*Johnson, 1977a ; Johnson, 1977b*).

En outre, les électrons solvatés peuvent réagir sur le solvant suivant la réaction :



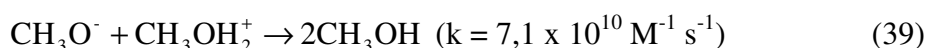
($k = 8,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (*Johnson, 1977a ; Johnson, 1977b*).

Les électrons solvatés peuvent également réagir avec le radical $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ (*Johnson, 1977a ; Johnson, 1977b*) :



($k = 8,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

L'ion résiduel CH_3O^- peut intervenir dans une réaction de neutralisation acido-basique donnant la formation de méthanol (*Fowles, 1971*) :



En conclusion, 10^{-9} s après l'absorption du rayonnement, le méthanol irradié devient un mélange de produits moléculaires (H_2 , $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ et H_2CO) et radicalaires (e_s^- , H^\bullet , $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ et $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$). Ces espèces réagissent entre elles durant leur coexistence et, par conséquent, les valeurs de leurs rendements radiolytiques ne sont pas indépendantes. Elles vérifient, à chaque instant, une relation traduisant la décomposition radiolytique du méthanol (*Getoff, 1993*) :

$$G(e_s^-) + 2G(\text{H}_2) + G(\text{H}^\bullet) = G(\bullet\text{CH}_2\text{OH}) + 2G((\text{CH}_2\text{OH})_2) + 2G(\text{H}_2\text{CO}) \quad (\text{éq. 2})$$

Étant donnée la complexité du mécanisme des réactions mises en jeu, il est difficile d'évaluer expérimentalement le rendement de chaque entité radiolytique pour un temps précis, en particulier pour les espèces radicalaires e_s^- , H^\bullet , $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ et $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$. En se reposant sur les résultats obtenus par de nombreux auteurs (*Baxendale, 1972 ; Shiotani, 1976 ; Lind, 1979 ; Getoff, 1992 ; Getoff, 1993 ; Zhang, 1994*), les rendements radiolytiques communément admis pour les différentes espèces formées lors de la radiolyse du méthanol sont répertoriés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Rendements radiolytiques des espèces radicalaires et moléculaires formées lors de la radiolyse du méthanol (*Baxendale, 1972 ; Shiotani, 1976 ; Lind, 1979 ; Getoff, 1992 ; Getoff, 1993 ; Zhang, 1994*).

Espèce	e_s^-	H^\bullet	$\text{CH}_3\text{O}^\bullet$	$\bullet\text{CH}_2\text{OH}$	H_2	H_2CO	$(\text{CH}_2\text{OH})_2$
Rendement ($\mu\text{mol J}^{-1}$)	0,20	0,10	0,36	0,44	0,56	0,20	0,32

IV. RADIOLYSE DE L'ÉTHANOL

Depuis les années soixante, les chimistes du domaine de l'irradiation ont montré un grand intérêt pour la radiolyse de l'éthanol (Taub, 1962; Shiotani, 1976; Jin, 1996; Wang, 1999). En réunissant les données expérimentales disponibles dans la littérature, on a constaté qu'il y a une grande analogie avec la radiolyse du méthanol (Figure 20).

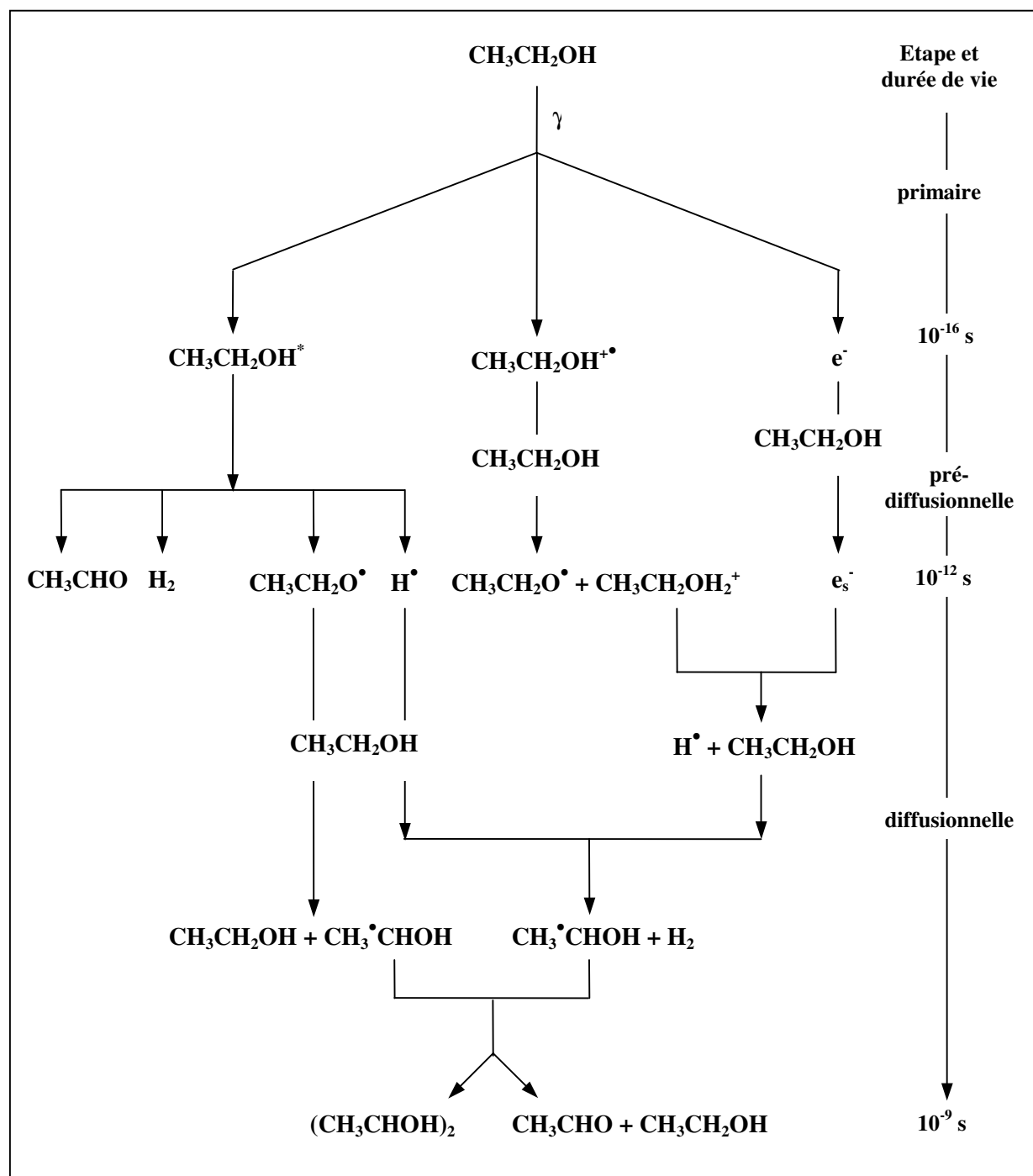
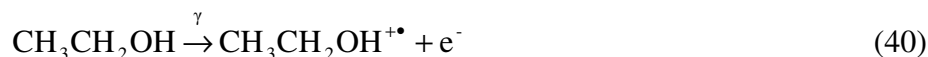


Figure 20 : Radiolyse de l'éthanol (Taub, 1962; Shiotani, 1976; Jin, 1996; Wang, 1999).

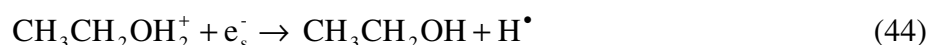
Quand l'éthanol est soumis aux rayonnements γ , les réactions suivantes se produisent initialement :



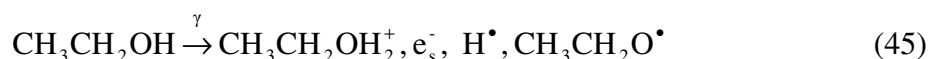
L'électron éjecté, comme son homologue issu de la radiolyse du méthanol, perd son énergie par excitations et ionisations successives et devient un électron solvaté (e_s^-) :



Les cations $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}^{+\bullet}$ réagissent très rapidement avec les molécules d'éthanol et conduisent à la formation d'autres espèces radiolytiques :

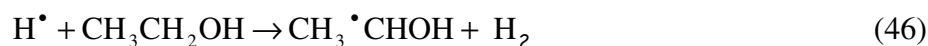


Il est possible de résumer la radiolyse de l'éthanol au stade initial par :



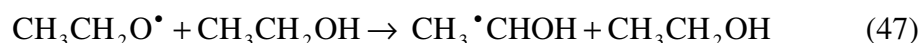
Ce sont ces espèces primaires qui contribuent par la suite à la formation d'autres entités radiolytiques, soit en réagissant entre elles, soit avec le solvant.

Par exemple, H^\bullet réagit avec une molécule d'éthanol et conduit à la formation du radical 1-hydroxyéthyl ($\text{CH}_3^\bullet\text{CHOH}$: HER) et d'une molécule d'hydrogène :



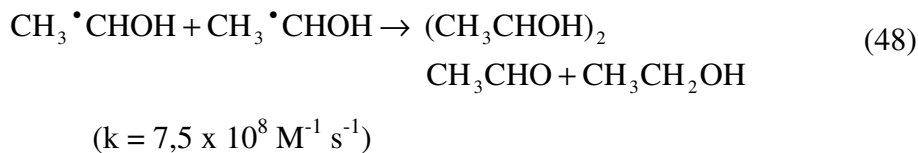
$$(k = 1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$$

Une autre voie de formation de HER est la réaction d'isomérisation du radical éthoxy :



$$(k = 1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$$

En suite, par recombinaison de deux radicaux HER, on a formation du 2,3-butandiol et de l'acétaldéhyde :



En résumé, à l'étape homogène (10^{-9} s) l'éthanol irradié se décompose en espèces radicalaires (e^-_s , H^\bullet , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$, $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH}$) et moléculaires (H_2 , $(\text{CH}_3\text{CHOH})_2$, CH_3CHO). Ces différentes espèces sont quantifiées par leurs rendements radiolytiques (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Rendements radiolytiques des espèces radicalaires et moléculaires formées lors de la radiolyse de l'éthanol (*Taub, 1962; Shiotani, 1976; Jin, 1996 ; Wang, 1999 ; Sun, 1999*).

Espèce	e^-_s	H^\bullet	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$	$\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH}$	H_2	CH_3CHO	$(\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH})_2$
Rendement ($\mu\text{mol J}^{-1}$)	0,17	0,15	0,30	0,38	0,47	0,24	0,21

V. COURBE DE DILUTION

Lorsque le solvant contient un soluté, celui-ci intervient dans la radiolyse. Si le soluté est dilué, il ne réagit qu'en phase homogène. Mais s'il est concentré, il peut intervenir dans l'étape diffusionnelle. Si le soluté est encore plus concentré, il peut être directement ionisé par le rayonnement, c'est ce qu'on appelle l'effet direct.

L'ensemble des réactions d'oxydo-réduction entre le soluté et les espèces radiolytiques du solvant se traduit par le rendement de disparition du soluté, noté $G(-S)$ et donné par la formule (éq. 1). La courbe représentant l'évolution de cette grandeur en fonction de la concentration du soluté (courbe de dilution) a, dans la plupart des cas, l'allure indiquée sur la **Figure 21** (*Ferradini, 1983*).

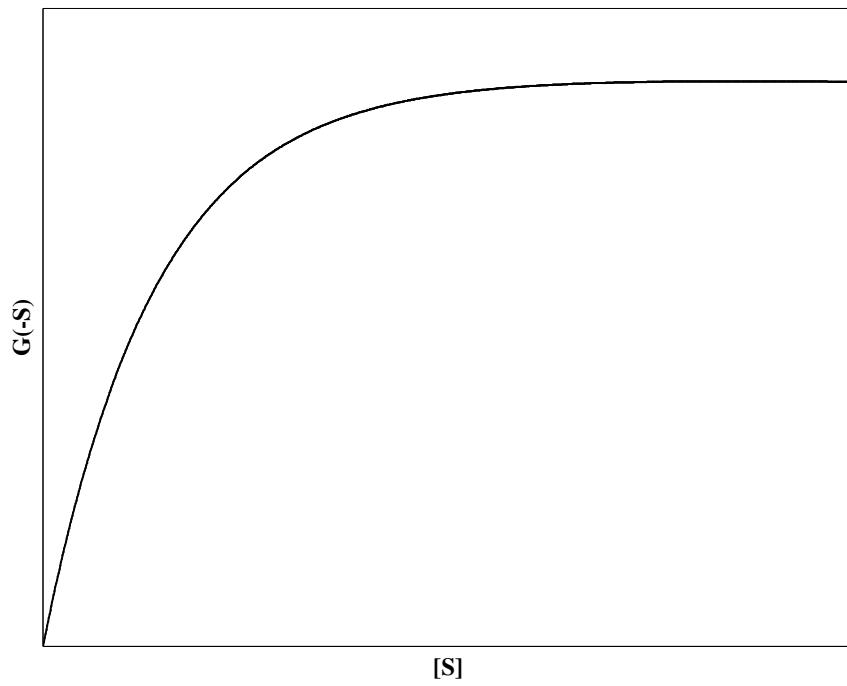


Figure 21 : Courbe de dilution

On observe que le rendement croît d'abord avant d'atteindre un plateau. Ceci est dû à la capture de l'ensemble des espèces radiolytiques du solvant, par le soluté.

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE V

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. IRRADIATION

I.1. APPAREILLAGE

Nous avons utilisé un irradiateur expérimental de type Oris installé à la Faculté de Pharmacie de Limoges en 1987. Il est constitué du :

➤ une chambre d'irradiation : elle est sous forme d'un cylindre en acier de hauteur de 30 cm et de diamètre 12 cm. C'est ici que les produits à irradier sont chargés.

➤ une partie fixe : dite corps de l'irradiateur, où sont placées les sources de Cobalt 60.

➤ une partie mobile : appelée ascenseur, destinée à effectuer par coulissement les opérations d'ionisation des produits.

➤ un dispositif de chaîne et roues dentées : entraîné par un moteur, il permet la montée et la descente de l'ascenseur.

➤ un dispositif de contrepoids : maintient l'équilibre dans toutes les positions et assure la sécurité de l'opérateur pendant l'introduction ou la récupération des produits irradiés.

➤ une armoire de commande contenant :

- un commutateur à clé « arrêt – marche »
- une minuterie permettant de programmer le temps d'irradiation.
- une commande montée – descente de l'ascenseur avec possibilité d'arrêt momentané.
- une commande d'arrêt d'urgence qui permet la mise hors tension de l'appareil.

I.2. CHOIX DES CONCENTRATIONS

Nous avons vu (chapitre IV) que si la concentration du soluté est inférieure à 7×10^{-3} M, celui-ci ne réagit qu'avec les espèces radiolytiques du solvant présents dans l'étape homogène. Les concentrations étudiées sont alors : 5×10^{-5} M, 10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M et 5×10^{-3} M.

I.3. MODE OPERATOIRE

Les différents flavonoïdes sont solubilisés dans le méthanol, l'éthanol ou des mélanges eau/alcools. Ensuite, 1 ml de chaque solution est irradié, dans des tubes en plastique fermés par un septum, avec des doses allant de 0,2 kGy jusqu'à 20 kGy. Les solutions ne sont pas désaérées. Ce mode opératoire est appliqué pour toutes les concentrations précédemment mentionnées.

Pour l'étude de la radiolyse dans des mélanges eau/alcools, quatre pourcentages sont utilisés : 10/90%, 15/85%, 20/80% et 25/75%.

II. LES ANALYSES DES ECHANTILLONS IRRADIES

II.1. APPAREILLAGE

Les solutions irradiées sont analysées en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP). Nous avons utilisé un appareil de marque Waters équipé avec :

- une pompe quaternaire modèle 600.
- un détecteur UV/visible à barrette de diodes PDA 996.
- un contrôleur modèle 600.

Le système CLHP est combiné avec un logiciel (Millennium) qui permet de gérer la phase mobile de l'injection en cours, d'analyser et stocker les résultats ainsi obtenus.

II.2. MODE OPERATOIRE

Pour chaque flavonoïde (quercétine, morine, kaempférol, galangine, myricétine, lutéoline, apigénine, chrysine, taxifoline, éridictyol, catéchine, naringénine, rutine et astragaline), 20 µl sont injectés avant et après irradiation dans le système CLHP en utilisant une colonne analytique C18 µBondapack (10µm : granulométrie des particules, 250 x 4,6 mm : longueur x diamètre).

La phase mobile est constituée par du méthanol (**A**) et de l'eau contenant 1% d'acide acétique (**B**).

Les analyses sont effectuées en utilisant le gradient suivant :

Temps (min)	Débit (ml/min)	A (%)	B(%)
0	1	20	80
40	1	80	20

Pour la galangine, nous avons adopté un protocole différent, avec un gradient allant de 30% A jusqu'à 90% A.

III. PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS IRRADIÉS

La purification des produits irradiés est effectuée à l'aide du même système CLHP mais en utilisant une colonne semi-préparative C18 μ Bondapack (10 μ m : granulométrie des particules, 100 x 25 mm : longueur x diamètre).

La phase mobile est la même que celle utilisée avec la colonne analytique.

Le gradient adopté est le suivant :

Temps (min)	Débit (ml/min)	A (%)	B(%)
0	5	20	80
60	5	80	20

IV. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLOGIQUES

Les produits de radiolyse sont identifiés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par spectroscopie de masse couplée à un système CLHP (LC-MS).

IV.1. RMN

Les analyses RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker 400 MHz DPX Avance

Les spectres proton (^1H) et carbone (^{13}C) sont mesurés dans le méthanol deutéré (CD_3OD) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne.

Les positions des différents protons et carbones sont assignées à partir des spectres mono et bidimensionnel :

- COSY : $^1\text{H} - ^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy,
- HMQC : $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple Quantum Coherence,
- HMBC : $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

IV.2. LC-MS

Le couplage LC-MS est constitué du module de séparation Alliance Waters 2690 relié à un détecteur UV à barrettes de diodes PDA 996 de chez Waters et du spectromètre de masse ZMD de chez Micromass muni d'une source d'ionisation à pression atmosphérique fonctionnant en mode électrospray. L'ensemble est piloté par un ordinateur grâce au logiciel Masslynx .

La séparation est réalisée avec une colonne Nucléosil C18 (3,5 μm : granulométrie des particules, 100 x 2 mm : longueur x diamètre), en adoptant un mode isocratique de 40% **A** et 60% **B** à un débit de 0,2 ml/min pendant 25 min. Le volume injecté est 2 μl .

L'acquisition en spectrométrie de masse se fait en électrospray positif (ES^+) et électrospray négatif (ES^-) avec une tension du cône maintenue à 40 V pour ES^+ et - 40 V pour ES^- . Le débit de gaz de nébulisation (N_2) est fixé à 400 l/h. L'acquisition des spectres se fait en mode courant ionique total.

V. MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante des composés étudiés au cours du présent travail est évaluée en mesurant leur capacité à inhiber le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH).

L'activité anti-superoxyde est mesurée par chimiluminescence, alors que l'activité anti-DPPH est mesurée par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE).

V.1. ACTIVITE ANTI-SUPEROXYDE ET CHIMILUMINESCENCE

V.1.1. APPAREILLAGE

L'appareil utilisé est un luminomètre de type LUMAT LB 9507 (EG & Berthold). Il est constitué de :

➤ Deux injecteurs automatiques : leur rôle est de faciliter le travail du manipulateur en injectant automatiquement deux réactifs dans le milieu réactionnel. Les injections des autres réactifs se font manuellement à l'aide de micropipettes.

➤ Une chambre de mesure : c'est dans celle-ci, parfaitement étanche à toute lumière extérieure, que l'échantillon est placé. Elle doit être comme une chambre noire car c'est ici où les réactions se déroulent.

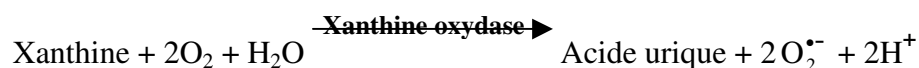
➤ Un détecteur de lumière : c'est un photomultiplicateur qui a pour rôle de convertir les photons formés dans la chambre de mesure en impulsions électriques. Ces impulsions sont comptabilisées en unité relative de lumière (URL).

L'appareil est couplé à un ordinateur, et les résultats sont traités et affichés par un logiciel de traitement des données.

V.1.2. PRINCIPE

La chimiluminescence, comme son nom l'indique, est l'étude de réactions chimiques accompagnées par une émission de la lumière. La technique est basée sur l'utilisation d'un luminophore, molécule luminescente qui, en réagissant avec un radical libre, émet de la lumière.

Dans notre cas, nous avons utilisé la lucigénine comme luminophore. Le radical superoxyde, quant à lui, est généré par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase précédemment décrit (chapitre I, réaction 3) :



L'introduction de la lucigénine dans ce milieu réactionnel, va entraîner sa réaction avec le radical superoxyde et conduire à la formation d'un produit intermédiaire, un

dioxéthane, qui se décomposera ensuite en deux molécules N-méthylacridone sous sa forme excitée (**Figure 22**).

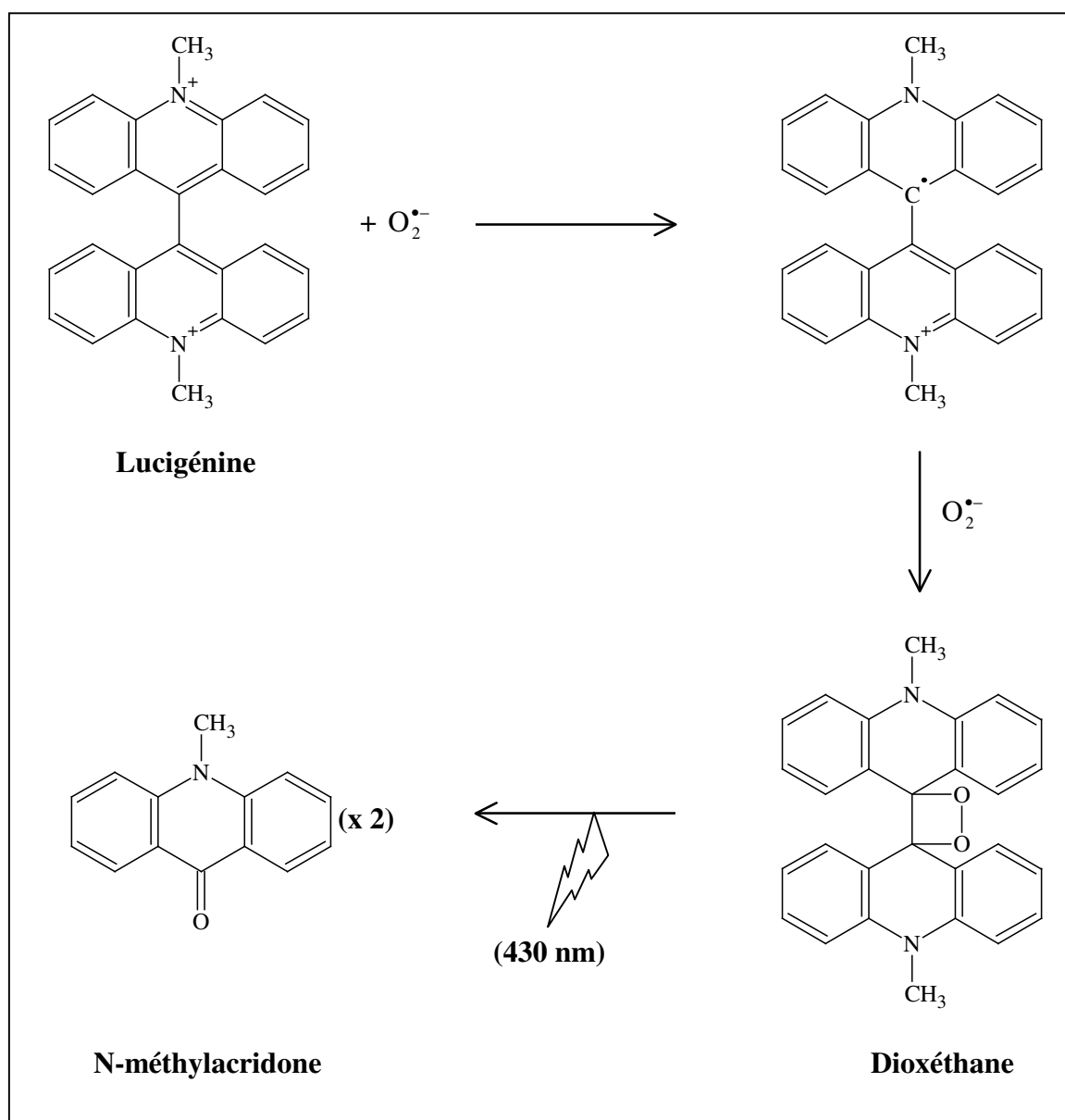


Figure 22 : Mécanisme de la réduction de la lucigénine par le radical superoxyde.

Lorsque le N-méthylacridone se stabilise en passant de l'état excité à l'état fondamental, il émet des photons sous forme d'onde lumineuse. C'est cette quantité de lumière que l'on mesure à l'aide du luminomètre. Elle est proportionnelle au nombre de radicaux superoxydes présents dans le milieu réactionnel. La valeur enregistrée par le luminomètre est considérée alors comme le signal de « *référence* ».

Pour mesurer l'activité anti-superoxyde d'un composé, on l'introduit dans la solution contenant la lucigénine et le système générateur du radical superoxyde. Le composé peut agir selon deux mécanismes. D'une part, en inhibant l'enzyme et diminuant ainsi le nombre de radicaux formés. D'autre part, par piégeage direct avec radicaux superoxydes en compétition avec la lucigénine. La nouvelle valeur enregistrée par le luminomètre est considérée comme le signal « *test* ».

En absence d'enzyme (xanthine oxydase), le luminomètre détecte une lumière résiduelle, le signal « *bruit de fond* ».

V.1.3. MODE OPERATOIRE

Dans un tube à hémolyse de 12 mm de diamètre et de 75 mm de hauteur, nous avons mélangé :

- 400 µl de PBS (pH = 7,4, NaCl [120 mM], KCl [2,7 mM], tampon phosphate [10 mM]).
- 5 µl du composé à tester (pour le *signal test*) ou de méthanol (pour le *signal référence*). Différentes concentrations du composé sont testées.
- 20 µl de xanthine oxydase à 0,5 U/ml.

Le tube est immédiatement placé dans la chambre de mesure puis nous avons rajouté, grâce aux deux injecteurs automatiques :

- 60 µl de xanthine à 2 mM.
- 50 µl de lucigénine à 1 mM.

Ce milieu réactionnel est resté incubé dans la chambre de mesure pendant 90 secondes, puis la mesure est effectuée sur une durée de 60 secondes.

V.1.4. CALCUL DU POURCENTAGE D'INHIBITION

L'activité antioxydante d'un produit est exprimée en pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{réf} - \text{test}}{\text{réf} - \text{bdf}} \times 100 \quad (\text{éq. 4})$$

Où, réf, test et bdf représentent respectivement le signal de « *référence* », le signal « *test* » et le signal « *bruit de fond* ».

L'activité d'un antioxydant peut être caractériser par une grandeur appelée la IC_{50} : concentration de l'antioxydant qui permet l'inhibition de 50% du signal de référence.

La IC_{50} permet de comparer l'activité de différents composés antioxydants. Il est à noter que plus la IC_{50} est petite plus l'antioxydant a une activité plus importante.

Pour déterminer la IC_{50} , nous avons calculé dans un premier temps le % d'inhibition pour différentes concentrations. Ensuite, en utilisant le logiciel Winreg, l'équation du tracé qui correspond le mieux aux points expérimentaux est déterminée. C'est à partir de cette équation que la IC_{50} est calculée.

V.2. ACTIVITE ANTI-DPPH ET RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

Ce test est basé sur la mesure de la capacité des produits étudiés au cours de notre travail à inhiber le radical DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl). Une telle étude est effectuée en utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE). Découverte en 1945 par Zavoïsky, la RPE est une technique spectroscopique qui permet de détecter les espèces radicalaires.

V.2.1. PRINCIPE DE LA RPE

Basée sur les principes de la mécanique quantique, la technique consiste à mesurer l'absorption d'une onde électromagnétique traversant une solution soumise à un champ magnétique.

En mécanique quantique, un électron est caractérisé par sa masse (m_e), sa charge (e) son moment magnétique (μ_e) et son moment angulaire intrinsèque (vecteur de spin, noté \mathbf{S} et de norme égale $\frac{1}{2}$). A ce dernier est associé un nombre quantique m_s dont les valeurs sont fixées par les lois de la mécanique quantique, à savoir :

$$-\|\mathbf{S}\| \leq m_s \leq \|\mathbf{S}\| \quad (\text{éq. 5})$$

Dans cette inégalité, $\|\mathbf{S}\|$ représente la norme de \mathbf{S} .

Sachant que la différence entre deux valeurs de m_s est égale 1, celui-ci ne peut prendre que les valeurs : $-\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{2}$.

Le moment magnétique est lié à \vec{S} par l'équation :

$$\vec{\mu}_e = -g_e \cdot \beta \cdot \vec{S} \quad (\text{éq. 6})$$

Où :

g_e est le facteur de Landé (2,0023)

β est le magnéton de Bohr ($9,27 \times 10^{-24} \text{ A.m}^2$).

Lorsque l'électron est placé dans un champ magnétique \vec{B} , il se trouve animé autour de l'axe d'orientation de celui-ci avec une énergie donnée par la relation :

$$E = -\vec{\mu}_e \cdot \vec{B} = g_e \beta \vec{S} \cdot \vec{B} \quad (\text{éq. 7})$$

Sachant que m_s représente la projection de \vec{S} sur l'axe d'orientation de \vec{B} , alors :

$$E = g_e \beta m_s B, \text{ où } B \text{ est le module de } \vec{B}$$

On déduit que l'énergie d'un électron soumis à un champ magnétique peut prendre, selon la valeur de m_s , deux valeurs égales et de signes opposés :

$$E_1 = -\frac{1}{2} g_e \beta B \quad (\text{éq. 8})$$

$$E_2 = +\frac{1}{2} g_e \beta B \quad (\text{éq. 9})$$

La transition de l'électron entre ces deux états énergétiques peut être stimulée par l'application d'un champ de radiofréquence (d'énergie $h\nu$) perpendiculairement au champ magnétique \vec{B} .

Dans le cas où $h\nu$ est égale à la différence d'énergie, $\Delta E = E_2 - E_1 = g_e \beta B$, se produit le phénomène de résonance. Ainsi, la mesure de ΔE est la base de la RPE.

Pour faire apparaître la résonance, on peut procéder de deux manières :

➤ on garde une valeur fixe pour le champ magnétique B et on fait varier la fréquence de l'onde électromagnétique.

➤ on fixe une valeur pour la fréquence de l'onde électromagnétique et on fait varier le champ magnétique.

V.2.2. LE RADICAL DPPH

Ce radical (**Figure 23**), stable au cours du temps, est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé X (Cotelle, 1996 ; Trouillas, 2003).

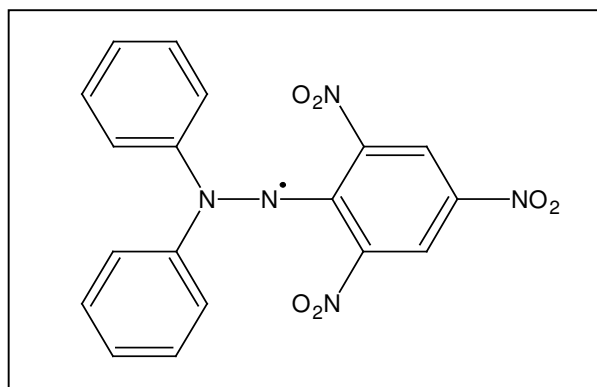


Figure 23 : Structure chimique du radical DPPH

Le spectre caractéristique du radical DPPH est représenté sur la **Figure 24**.

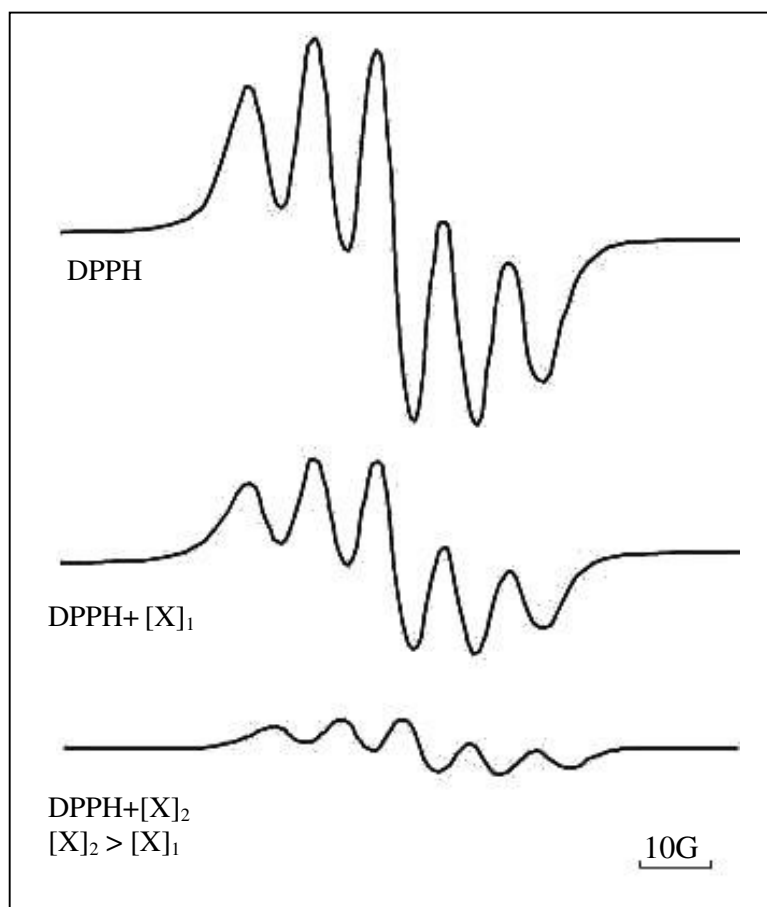


Figure 24 : Evolution du spectre RPE du radical DPPH en fonction de la concentration antioxydant X.

Si le composé X a une activité anti-DPPH, une réduction du nombre de radicaux aura lieu, entraînant ainsi une baisse mesurable de l'amplitude du spectre RPE. Plus le composé antioxydant est concentré plus la baisse du signal est importante (**Figure 24**).

La double intégrale du signal, quantité proportionnelle au nombre de radicaux présents dans la solution, est utilisée pour une interprétation quantitative des spectres.

Nous avons utilisé un appareil de type BRUCKER ESP 300E pouvant délivrer un champ magnétique de 3500 G.

V.2.3. MODE OPERATOIRE

Dans un tube en plastique, 50 µl d'une solution éthanolique de DPPH (5×10^{-4} M) sont mélangés avec 50 µl du composé à tester. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur électrique pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans un micro-tube en quartz à l'aide d'une micropipette puis placé dans la cavité de la RPE. 3 min après, les spectres sont enregistrés sur le spectromètre en utilisant les paramètres suivants :

- modulation de fréquence : 100 kHz.
- fréquence micro-onde : 9,78 GHz.
- puissance micro-onde : 4 mW.
- modulation d'amplitude : 1, 97 G.
- temps de conversion : 5,12 ms.
- constante de temps : 10,24 ms.

Pour chaque composé à tester, cette manipulation est effectuée avec différentes concentrations et à température ambiante, chaque mesure est réalisée en 3 fois.

Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la double intégrale du signal RPE et à partir de l'équation :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{réf} - \text{test}}{\text{réf} - \text{bdf}} \times 100 \quad (\text{éq. 10})$$

Où « réf » est le signal de référence (DPPH + solvant), « test » est le signal test (DPPH + composé à tester), et « bdf » est le signal bruit de fond.

VI. MESURE DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE

En évaluant la capacité d'un composé X à piéger le radical superoxyde, nous avons utilisé comme générateur de radicaux, le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase. En réalité, la réaction entre le radical et le produit X n'est pas la seule qui peut avoir lieu. Le composé X peut réagir également avec l'enzyme et conduire à son inactivation, ce qui entraîne également une diminution du nombre de radicaux. Alors, il est important de mesurer la capacité de nos composés à inhiber la xanthine oxydase.

VI.1. METHODE

Après l'oxydation de la xanthine, il y a production d'acide urique (réaction 3, chapitre I), molécule caractérisée par un maximum d'absorption à 290 nm. 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 formé. Cette mesure est effectuée par spectrophotomètre.

Dans un premier temps, nous mesurons un signal témoin avec uniquement l'enzyme. Ensuite, nous rajoutons le composé à tester et nous suivons l'évolution du signal témoin. Les courbes obtenues représentent l'évolution de la formation d'acide urique en fonction du temps.

VI.2. MODE OPERATOIRE

La manipulation est réalisée en deux temps :

- Pour le signal témoin, elle est effectuée seulement avec la xanthine oxydase pour mesurer la production d'acide urique.
- Pour le signal test, le composé à tester est introduit.

Les mesures débutent 2 min après le mélange des réactifs, et nous étudions l'évolution de la densité optique d'acide urique en fonction du temps pendant une minute. Nous avons obtenu des droites.

Pour comparer l'activité inhibitrice des différents produits testés, nous avons calculé pour chacun la IC₅₀, à partir des pentes des droites précédentes, de la même manière que précédemment (voir test anti-superoxyde) en se basant sur l'équation suivante :

$$\%d'inhibition = \frac{\text{pente du } \textit{témoin} - \text{pente du } \textit{test}}{\text{pente du } \textit{témoin}} \times 100 \quad (\text{éq. 11})$$

Où, « *témoin* » est le signal témoin (obtenu uniquement avec la xanthine oxydase) et « *test* » est le signal test (obtenu en présence de l'antioxydant). Les mesures sont effectuées trois fois.

VII. MODELISATION MOLECULAIRE

La modélisation moléculaire consiste, en se basant sur les formalismes de la mécanique classique et de la mécanique quantique, à minimiser l'énergie de la molécule et obtenir ainsi les propriétés physico-chimiques correspondant à la conformation la plus stable.

VII.1. LES METHODES UTILISEES EN MODELISATION MOLECULAIRE

Il existe deux grands types de méthodes en modélisation moléculaire : les méthodes de mécanique moléculaire basées sur le mouvement des noyaux et les méthodes de chimie quantique basées sur le mouvement des électrons.

VII.1.1. LA MECANIQUE MOLECULAIRE

Dans ce cas, la molécule est considérée comme un ensemble de sphères (les atomes) connectées entre elles par des ressorts (les liaisons). Le mouvement des électrons est alors négligé et les interactions intermoléculaires (élongation des liaisons, angles de torsion, liaisons électrostatiques, liaisons de Van Der Waals) sont décrites par les lois de la mécanique classique. L'ensemble des constantes de forces décrivant ces interactions constitue ce que l'on appelle le champ de force. Il existe de nombreux champs de force, chacun construit pour des types d'interaction bien précis. Certains décrivent correctement les liaisons hydrogène, d'autres décrivent précisément les interactions existantes dans les protéines (AMBER, CHARMM, ...), etc. Les potentiels d'interaction sont issus de la mécanique classique. Il faut noter que la minimisation de l'énergie est calculée à 0 K. Pour prendre en compte le

paramètre température, on utilise les méthodes de dynamique moléculaire. Dans ce cas, on résout l'équation fondamentale de la dynamique :

$$m \frac{d\mathbf{v}}{dt} = \Sigma \mathbf{F} \quad (\text{éq. 12})$$

où $\Sigma \mathbf{F}$ est calculée avec les potentiels définis par le champ de forces choisi et \mathbf{v} est la vitesse des atomes (vibration, rotation).

Les méthodes de mécanique moléculaire ne donnent aucune information concernant les propriétés électroniques de la molécule. Cependant, elles donnent de très bons résultats pour les conformations avec un coût de calcul moindre.

VII.1.2. LA MECANIQUE QUANTIQUE

Ici, à la différence de la mécanique moléculaire, seul le mouvement des électrons est pris en compte en considérant l'ossature des noyaux fixes. Ce découplage du mouvement des noyaux et des électrons est possible parce que, les noyaux étant beaucoup plus lourds, on peut les considérer fixes lorsque les électrons se déplacent. Ceci constitue l'approximation de Born-Oppenheimer. Le mouvement des électrons ne peut pas être traité par la mécanique classique, il faut utiliser les formalismes de la mécanique quantique et résoudre l'équation de Schrödinger :

$$\mathbf{H} \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (\text{éq. 13})$$

\mathbf{H} est l'opérateur Hamiltonien, il contient l'opérateur énergie cinétique plus tous les opérateurs liés aux interactions électrons-noyaux et électrons-électrons.

E est l'énergie totale de la molécule.

Ψ est la fonction d'onde décrivant l'ensemble des électrons.

Pour résoudre cette équation, il existe différents types d'approximation.

Les méthodes semi-empiriques, par exemple, négligent certains types d'interaction comme les interactions à longue distance (cette distance pouvant varier selon le degré d'approximation). Ces méthodes sont moins coûteuses en terme de temps de calcul que les méthodes *ab initio* et DFT (Density Functional Theory), et certaines sont connues pour

donner des résultats proches de l'expérience. Nous utiliserons ici la méthode AM1 (Dewar, 1985).

VII.2. CONFORMATION

Pour obtenir la conformation la plus stable, il faut déterminer l'énergie la plus faible. Il faut alors étudier l'évolution de l'énergie en fonction de l'ensemble des coordonnées d'espace de la molécule. On parle de coordonnées de réaction ; leur nombre dépend du nombre de degrés de liberté dans la molécule. En général, on s'intéresse surtout aux angles de torsion, les angles et les distances étant plus aisément optimisés. On obtient alors une courbe de potentiel comme le montre la **Figure 25**. C'est de cette manière que nous avons procédé avec les flavonols pour lesquels nous avons observé la rotation du cycle B.

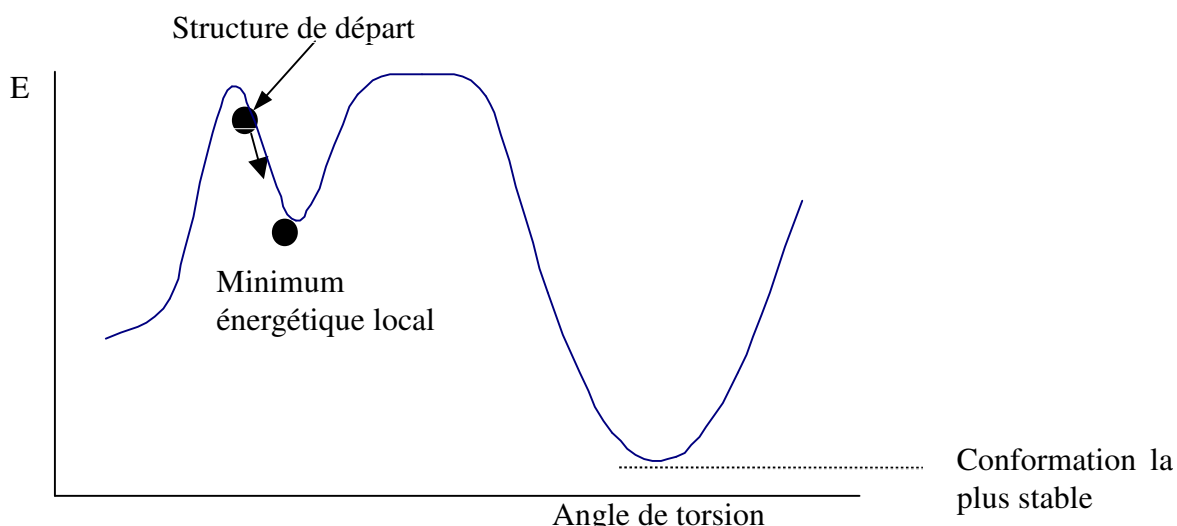


Figure 25 : Courbe de potentiel.

La conformation la plus stable correspond au puits de potentiel le plus profond, « le minimum absolu ».

Lorsqu'il existe deux angles de torsion à optimiser, il faut réaliser des courbes en trois dimensions, au delà, l'interprétation des courbes de potentiel est plus compliquée. On peut alors explorer l'ensemble des courbes de potentiel à l'aide de la dynamique moléculaire. C'est ce que nous avons choisi de faire avec les depsides pour lesquels le nombre d'angles de torsion à faire varier est trop important. Nous avons, en fait, utilisé la méthode de recuit simulé avec le champ de forces esff.

Cette méthode consiste, dans une première étape, à chauffer la molécule jusqu'à une température assez élevée (800 K) pour que les barrières d'énergie qui séparent les minima locaux et le minimum globale puissent être franchies. Ensuite, on refroidit la molécule jusqu'à une température de 300 K, et ceci par paliers successifs de 50 K. Chaque température est maintenue durant 100 ps, ce qui constitue un temps suffisant pour être représentatif. Ensuite, pour chaque étape, nous traçons le graphe de l'énergie en fonction du temps. La valeur la plus basse de l'énergie est ainsi enregistrée et la conformation correspondante est retenue pour l'étape suivante. Ces étapes sont répétées plusieurs fois afin de vérifier que l'on retombe bien sur la même conformation. La conformation obtenue à 300 K est à nouveau optimisée en mécanique moléculaire et en chimie quantique avec la méthodes AM1. Les calculs de mécanique et de dynamique moléculaire sont réalisés dans le module Discover 3 de Insight II v. 2000, et les calculs de chimie quantique sont effectués avec le programme MOPAC.

VII.3. RAPPELS SUR LES PROPRIETES ELECTRONIQUES DES MOLECULES ET DES RADICAUX

Les électrons d'une molécule sont autour des noyaux dans des orbitales. Selon la loi de Pauli, on ne peut loger sur ces couches électroniques que deux électrons, un de spin $-1/2$ et l'autre de spin $+1/2$ (**Figure 26**).

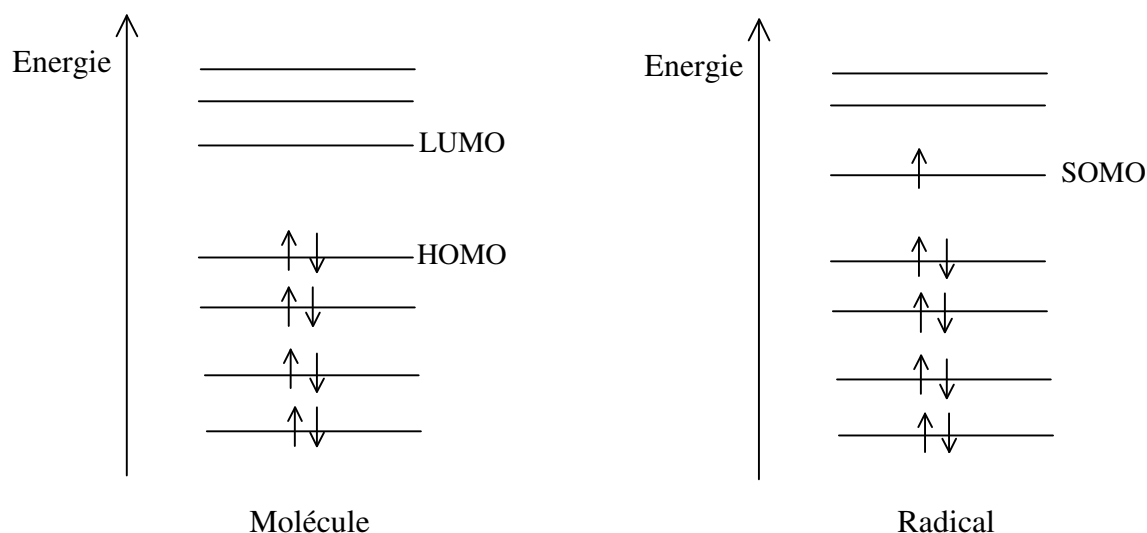


Figure 26 : Représentation des niveaux énergétiques.

Trois orbitales moléculaires vont retenir notre attention dans la suite de ce manuscrit, parce qu'elles sont impliquées dans les réactions redox qui nous intéressent.

➤ La HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital), c'est la dernière orbitale moléculaire occupée dans un système à couches fermées.

➤ La LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), c'est la première orbitale moléculaire inoccupée dans un système à couches fermées.

➤ La SOMO (Singlet Occupied Molecular Orbital), c'est l'orbitale moléculaire qui contient l'électron célibataire d'un système à couche ouverte, un radical.

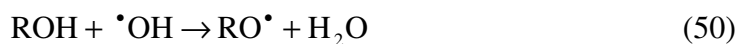
Elles sont impliquées de différentes manières dans les mécanismes redox régissant les activités anti-oxydantes.

Considérons un flavonoïde antioxydant, noté ROH, qui réagit avec un radical libre (par exemple, $\bullet\text{OH}$). Deux voies réactionnelles sont alors possibles :

➤ soit par transfert d'électron :



➤ soit par transfert d'un atome d'hydrogène,



Dans le premier cas, l'aptitude du flavonoïde à céder un électron est régie par le potentiel d'ionisation, c'est à dire l'énergie de la HOMO. De plus, la distribution de la HOMO sur l'antioxydant permet de connaître les sites où peuvent se produire ce transfert d'électrons. Les paramètres de la HOMO sont calculés à partir de la conformation la plus stable avec la méthode AM1. La répartition spatiale de la HOMO sera représentée comme un ensemble de boules dont le rayon dépend des coefficients LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) calculés. La représentation est réalisée avec le logiciel ZOA.

Au contraire, si la réaction se fait par transfert d'un atome d'hydrogène, l'activité antioxydante est évaluée par le calcul de l'énergie de dissociation ou BDE (Bond Dissociation Energy) de la liaison O-H. On calcule la BDE pour chaque groupement OH comme la différence entre la chaleur de formation de l'antioxydant et celle du radical $\text{RO}\bullet$ formé après la réaction (77). Les deux énergies sont calculées par la méthode AM1 et ceci pour chaque groupement OH présent sur l'antioxydant. Plus la BDE est petite, plus le groupement a une forte capacité à céder son atome d'hydrogène.

La SOMO est également impliquée dans cette réaction ; en effet, après le transfert d'hydrogène, il se forme le radical RO^\bullet . La répartition spatiale de la SOMO montre la délocalisation de l'électron célibataire. Plus la SOMO est délocalisée, plus le radical est stable, et plus on confirme *a posteriori* que le transfert d'hydrogène correspondant est un événement énergétiquement favorable.

CHAPITRE VI

RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS LE METHANOL ET
L'ETHANOL

RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS LE METHANOL ET L'ETHANOL

INTRODUCTION

La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux hydroxyle et superoxyde, précurseurs du stress oxydatif, a fait l'objet de nombreuses études adoptant différentes approches (Cotelle, 1996 ; Rice-Evans, 1995 ; Cos, 1998 ; Jovanovic, 1994 ; Pietta, 2000). L'une d'elles, développée par Jovanovic et ses collaborateurs, utilise la radiolyse pulsée (Jovanovic, 1994). Il s'agit d'irradier des flavonoïdes dans des solutions aqueuses en se plaçant à un pH basique pour augmenter la solubilité de ces molécules. Cette étude concerne, par conséquent, la réactivité des flavonoïdes avec les espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau.

Il nous est apparu important d'étudier également le comportement des flavonoïdes face aux espèces radiolytiques des alcools, notamment celles formées durant la radiolyse du méthanol et l'éthanol. C'est cette étude que nous présenterons dans le présent chapitre. Quatorze flavonoïdes parmi lesquels des flavonols, des flavones, des dihydroflavonols, des flavanones, des flavan-3-ols et des flavonoïdes glycosides ont été irradiés séparément dans le méthanol et l'éthanol.

I. RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS LE METHANOL

I.1. RADIOLYSE DE LA QUERCETINE

Nous avons irradié des solutions de quercétine dissoute dans le méthanol avec différentes concentrations (5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-3} M) et différentes doses allant de 0,2 kGy jusqu'à 20 kGy (Marfak, 2002 ; Marfak, 2003a). Les solutions n'étaient pas désaérées et le débit de dose était 0,22 Gy/s. Ces solutions ont ensuite été analysées par CLHP.

Sur la **Figure 27**, nous avons reporté les chromatogrammes d'une solution de quercétine à 5×10^{-3} M non irradiée (le contrôle) et irradiée avec les doses suivantes : 2 kGy,

4 kGy, 6 kGy, 8 kGy et 14 kGy. Nous observons que le pic de quercétine (temps de rétention : $t_r = 30$ min) diminue en fonction de la dose absorbée. 50% de quercétine est décomposée à une dose de 6 kGy, et la dégradation complète est effective pour 14 kGy.

En ce qui concerne les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), une dose de 4 kGy (pour 10^{-4} M) voire 2 kGy (pour 5×10^{-5} M) est suffisante pour causer une dégradation totale de la quercétine (**Figure 28**). Nous constatons que cette radiolyse est un processus qui dépend à la fois de la concentration et de la dose.

La disparition du pic de quercétine est accompagnée de l'apparition de nouveaux pics indiquant la formation de nouveaux composés (**Figure 27**). La surface de chaque pic augmente, d'une part, quand celle de la quercétine diminue, et d'autre part, en fonction de la dose appliquée. Parmi ces produits de radiolyse, QM1 ($t_r = 27$ min) est déterminé comme étant le produit majoritaire de la dégradation de la quercétine. Notons également la présence de composés minoritaires formés en faibles concentrations, tel que QM2 ($t_r = 12$ min).

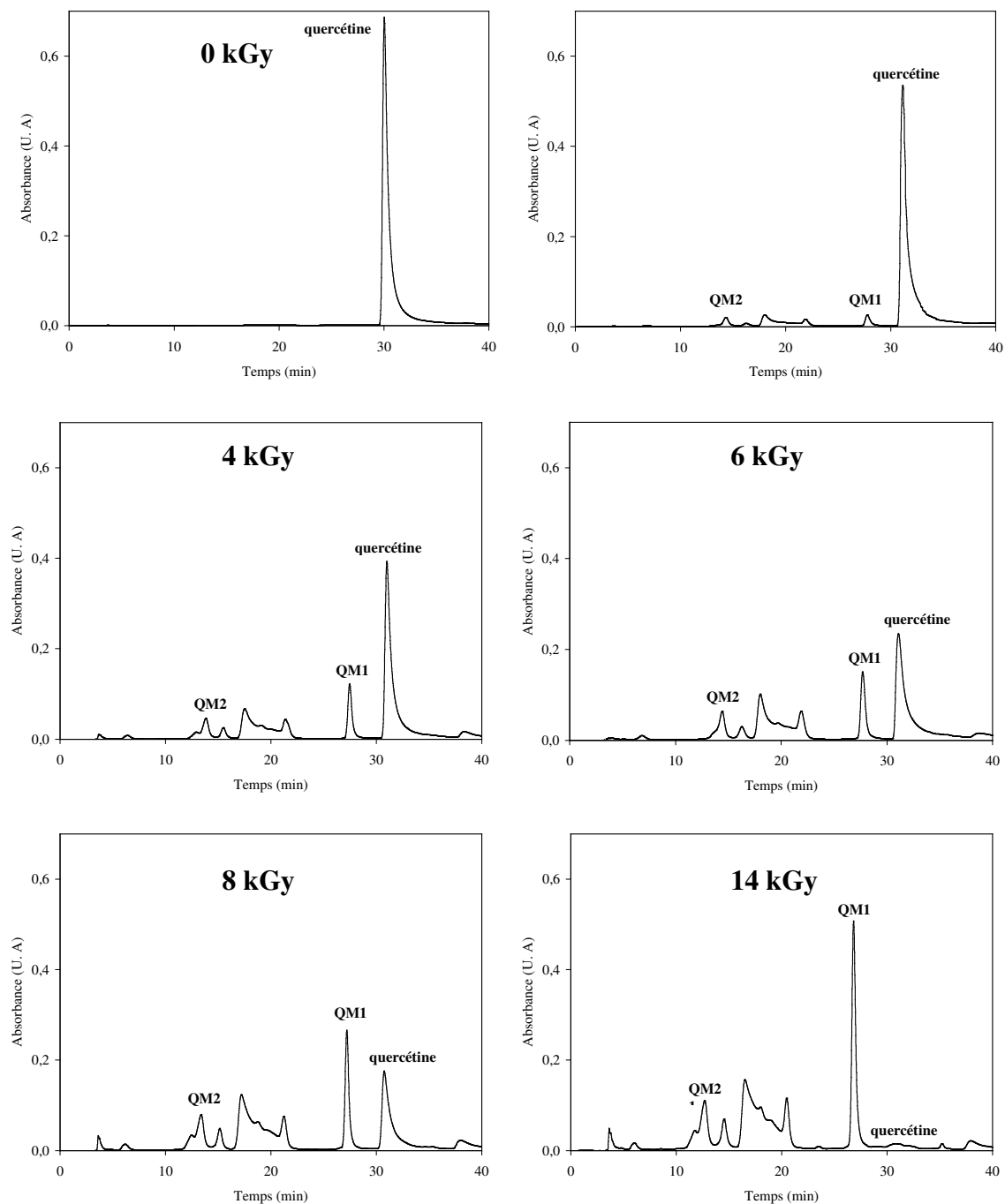


Figure 27 : Chromatogrammes obtenus par CLHP, enregistrés à 280 nm, d'une solution de quercétine (5×10^{-3} M) avant irradiation et après irradiation avec des doses de 2 kGy, 4 kGy, 6 kGy, 8 kGy et 14 kGy. Le débit de dose a une valeur de 0,22 Gy/s.

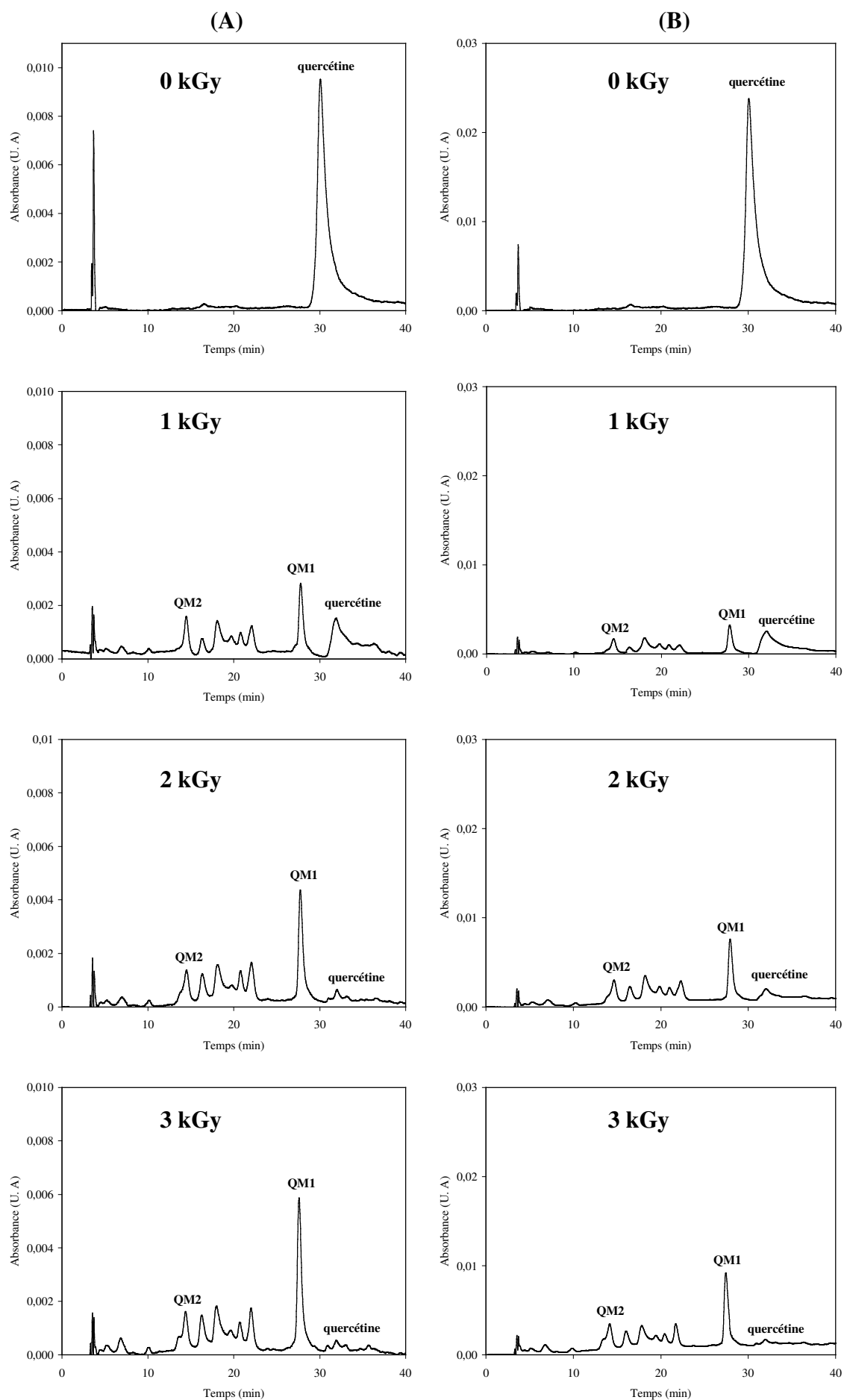


Figure 28 : Chromatogrammes de solutions de quercétine (5×10^{-5} M, colonne **A**) et (10^{-4} M, colonne **B**) irradiées avec des doses inférieures à 4kGy. Le débit de dose a une valeur de 0,22 Gy/s.

1.1.1. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES DE LA QUERCÉTINE

Afin d'identifier le produit majoritaire de dégradation (QM1), nous l'avons isolé en utilisant dans un premier temps la CLHP semi-préparative. 48 mg de quercétine en poudre sont dissous dans 31,8 ml du méthanol (solution de 5×10^{-3} M) et irradiés à 14 kGy, ce qui correspond au chromatogramme de la **Figure 29**. Dans ce système semi-préparatif, QM1 est élué entre 47 et 49 min. C'est cette fraction (F1) (**Figure 29**) que nous avons récoltée.

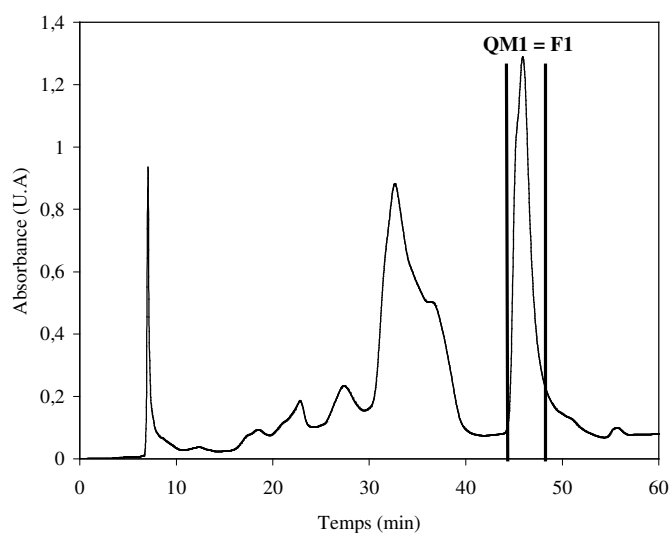


Figure 29 : Chromatogramme obtenu par CLHP semi-préparative d'une solution de quercétine à 5×10^{-3} M irradiée avec une dose de 14 kGy.

Après évaporation de F1, sous vide et à 45°C, nous avons obtenu 9,4 mg de matière. L'analyse par CLHP de cette fraction a révélé la présence d'un deuxième composé ($t_r = 12$ min) (**Figure 30**). Ce résultat était inattendu à cause de la différence importante entre le temps de rétention de ce composé et celui de QM1. De plus, en comparant le spectre UV de ce composé avec ceux des produits de radiolyse, nous avons observé qu'il correspond à celui de QM2 (**Figures 27 et 28**).

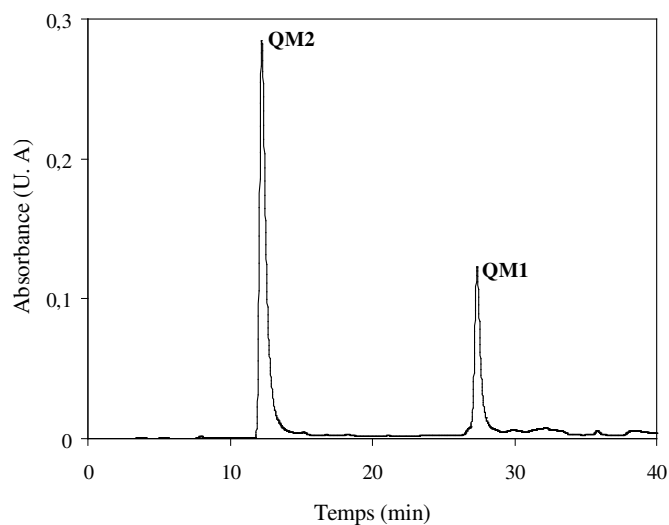


Figure 30 : Chromatogramme obtenu par CLHP après évaporation de la fraction F1, séparée à partir d'une solution de quercétine (5×10^{-3} M) irradiée avec une dose de 14 kGy.

Pour déterminer les structures chimiques des deux produits, nous avons ensuite effectué une seconde purification de F1 et nous avons obtenu 6,4 mg de QM2 et 3 mg de QM1. En réalité, les deux composés sont instables et nous verrons par la suite qu'un équilibre chimique s'établit entre QM1 et QM2.

a) Spectres UV de QM1 et QM2

Les spectres UV des deux composés possèdent deux bandes d'absorption entre 220-227 nm et entre 270-300 nm (**Figure 31**). Le spectre de la quercétine est caractérisé par deux bandes d'absorption $\lambda_{1\max} = 255,1$ nm et $\lambda_{2\max} = 367,7$ nm, attribuées respectivement aux conjugaisons entre les cycles A et C et entre les cycles B et C. Nous constatons que ces deux bandes d'absorption ont disparu. Ceci indique que le cycle C de la quercétine est détruit au cours de la radiolyse et n'existe plus dans les structures chimiques de QM1 et QM2.

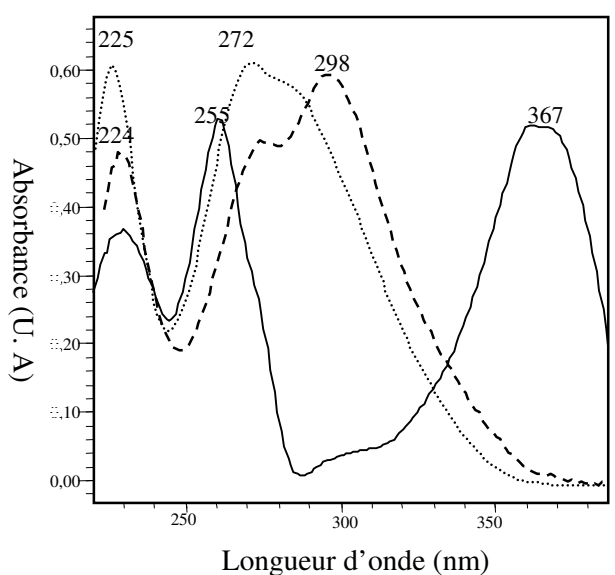


Figure 31 : Spectres d'absorption UV de la quercétine (trait plein) et des produits de radiolyse QM1 (trait en tirets) et QM2 (trait en pointillés). La concentration de chaque composé est 10^{-4} M.

b) Spectres RMN de QM1 et QM2

Ces composés sont identifiés par leurs spectres RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC.

Le composé QM2

Le spectre RMN du proton ^1H de QM2 (**Tableau 9**) correspond à cinq protons aromatiques:

- Deux protons à 6,24 ppm (d ; $J = 2,2$ Hz) et à 6,17 ppm (d ; $J = 2,2$ Hz) indiquant la présence d'un cycle A asymétrique.
- Trois protons à 7,58 ppm (d ; $J = 2,1$ Hz), à 7,56 ppm (dd ; $J = 2,1 ; 8,2$ Hz) et à 6,86 ppm (d ; $J = 8,2$ Hz) montrant la présence d'un deuxième cycle, appelé B.

Les positions de tous ces protons sont déterminées à partir du spectre COSY du couplage proton-proton (**Tableau 9**).

Le spectre carbone ^{13}C J_{mod} (**Tableau 9**) est constitué de :

➤ Trois groupes carbonyles : une fonction cétone (188,6 ppm, C-7), un groupe acide (165,8 ppm, C-8) et un groupe ester (165,9 ppm, C-7').

➤ Cinq carbones tertiaires (101,5 ppm, C-3 ; 104,7 ppm, C-5 ; 118,4 ppm, C-2' ; 116,1 ppm, C-5' ; 125,0 ppm, C-6').

➤ Sept carbones quaternaires dont cinq sont liés à un atome d'oxygène (168,1 ppm, C-2 ; 167,2 ppm, C-4 ; 155,5 ppm, C-6 ; 146,3 ppm, C-3' ; 152,7 ppm, C-4') et deux sont liés à un atome de carbone (105,5 ppm, C-1 ; 121,3 ppm, C-1').

Tableau 9. Spectres RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits QM1 et QM2 mesurés dans $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ (δ ppm; J Hz).

Position	^1H	COSY	^{13}C J_{mod} / HMQC	HMBC
Produit QM1				
1			105,6	
2			168,2	
3	6,27 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,7	C-1; C-5
4			167,7	
5	6,19 <i>d</i> (2,2)	H-3	105,0	C-1; C-3
6			155,4	
7			188,6	
8			165,5 ^a	
8-OCH ₃	3,44 <i>s</i>		53,2	C-8
1'			120,7	
2'	7,48 <i>d</i> (2,1)	H-6'	118,0	C-4'; C-6'; C-7'
3'			146,6	
4'			153,1	
5'	6,89 <i>d</i> (8,2)	H-6'	116,2	C-1'; C-3'
6'	7,50 <i>dd</i> (8,2; 2,1)	H-2'; H-5'	124,9	C-2'; C-4'; C-7'
7'			165,9 ^a	
Produit QM2				
1			105,5	
2			168,1	
3	6,24 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,5	C-1; C-5
4			167,2	
5	6,17 <i>d</i> (2,2)	H-3	104,7	C-1; C-3
6			155,5	
7			188,6	
8			165,8 ^b	
1'			121,3	
2'	7,58 <i>d</i> (2,1)	H-6'	118,4	C-4'; C-6'; C-7'
3'			146,3	
4'			152,7	
5'	6,86 <i>d</i> (8,2)	H-6'	116,1	C-1'; C-3'
6'	7,56 <i>dd</i> (8,2; 2,1)	H-2'; H-5'	125,0	C-2'; C-4'; C-7'
7'			165,9 ^b	

^{a,b} Les assignements peuvent être interchangeables

Les positions de tous les carbones tertiaires et quaternaires sont respectivement déterminées à partir des spectres HMQC et HMBC du couplage ^1H - ^{13}C (**Tableau 9**).

La connexion entre les cycles A et B est démontrée grâce aux indications suivantes :

(i) La valeur du déplacement chimique de C-2 (168,1 ppm), correspond à un carbone aromatique lié à un atome d'oxygène. En outre, le cycle A a une structure asymétrique, ce qui indique que C-2 est lié à un atome d'oxygène mais non hydroxylé. De plus, C-7' étant un groupe ester, nous démontrons la liaison C2-O-C7' (**Figure 32**).

(ii) Sur le spectre HMBC, nous avons observé deux taches de corrélation 3J entre les protons H-2'/H-6' et le carbonyle C-7' (**Figure 32**). De plus, C-1' est lié à un carbone. En se basant sur ces deux résultats, nous avons pu déterminer la liaison C7'-C1'.

Finalement, la connexion entre les cycles A et B est établie via la liaison C2-O-C7'-C1' (**Figure 32**).

La liaison C1-C7-C8, quant à elle, a pu être établie car, d'une part aucun proton n'est corrélé ni avec C-7 ni avec C-8, et d'autre part C-1 est lié à un carbone.

Finalement, QM2 est identifié comme acide 2-[4,6-dihydroxy-2-oxo(3,4-dihydroxybenzoyl)phényl]-2-oxo acétique (**Figure 32**) (*Marfak, 2002 ; Marfak, 2003a*).

Le composé QM1

En dehors du milieu d'irradiation, nous avons remarqué que QM2 se transforme au cours du temps en QM1. En effet, après avoir identifié QM2, celui-ci est solubilisé à nouveau dans le méthanol. Puisque QM2 n'est pas stable dans le méthanol, nous avons suivi son évolution au cours du temps par RMN et CLHP. Nous avons observé l'apparition, d'une part, de nouveaux signaux sur les spectres RMN proton et carbone de QM2, et d'autre part, d'un pic sur le chromatogramme CLHP de QM2. En analysant le spectre d'absorption UV de ce pic CLHP, nous avons déduit qu'il correspond à celui du composé QM1. Ces analyses RMN et CLHP ont montré également que QM1 augmente au cours du temps, alors que QM2 diminue.

Les spectres ^1H et ^{13}C de QM1 sont presque similaires à ceux de QM2 (**Tableau 9**). La seule différence observée est la présence d'un groupe méthoxyle pour QM1, représenté par un carbone à 53,2 ppm et un singulet de trois protons à 3,44 ppm. La position du méthoxyle est assignée par la tache de corrélation en 3J reliant les protons (3,44 ppm) avec le carbone C-8.

QM1 est alors identifié comme 3,5-dihydroxy-2-(7-méthoxyoxycarbonyl-7-oxo)phényl 3,4-dihydroxybenzoate (**Figure 32**) (Marfak, 2002 ; Marfak, 2003a).

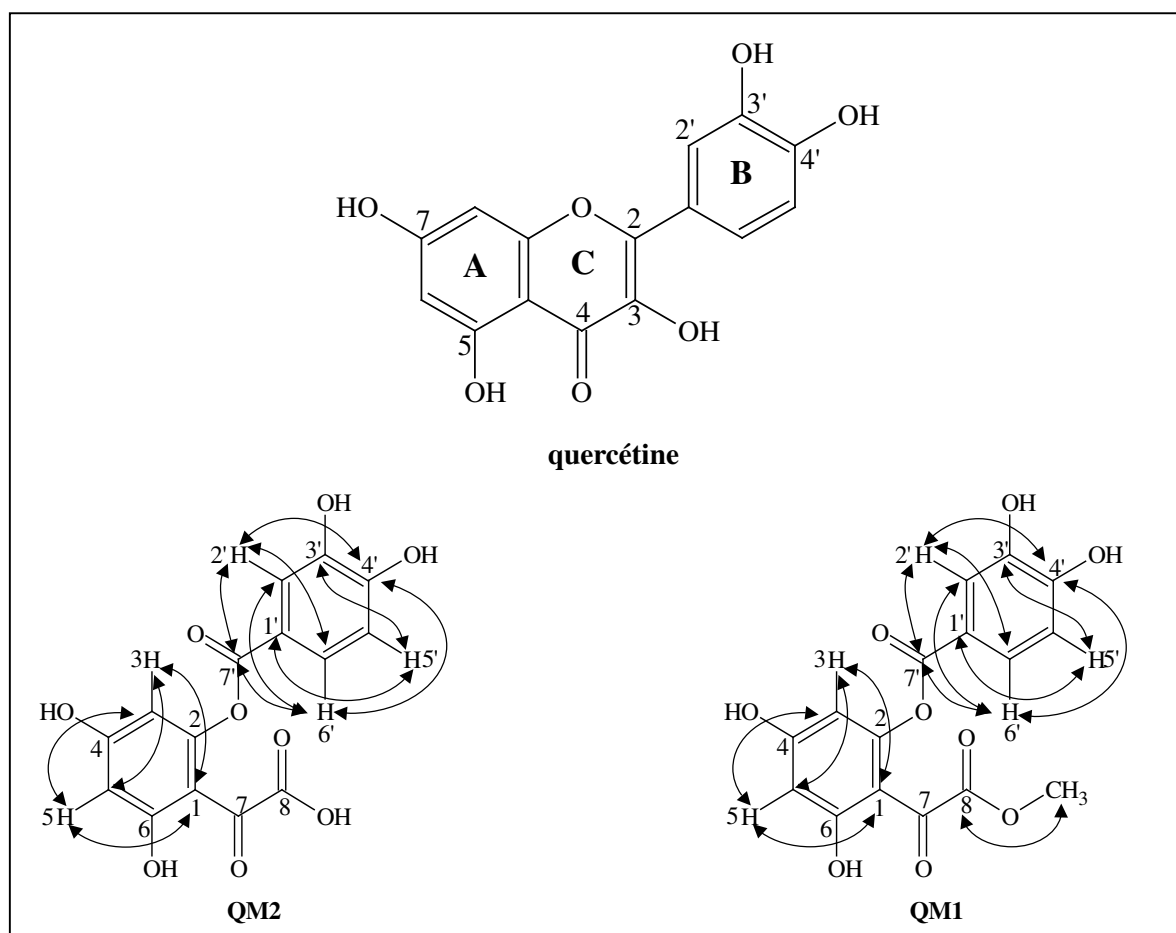


Figure 32 : Structures chimiques de QM1 et QM2 et corrélations $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (3J) (\longleftrightarrow) importantes observées sur les spectres HMBC.

c) Spectres de masse de QM1 et QM2

Les spectres de masse négatif et positif de QM2 possèdent respectivement deux ions moléculaires à m/z 333 $[\text{M} - \text{H}]^-$ et à m/z 357 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (**Figure 33**). Par conséquent, la formule moléculaire de QM2 est $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_9$ confirmant ainsi la structure obtenue par RMN.

La détection des ions moléculaires à m/z 347 $[\text{M} - \text{H}]^-$, à m/z 349 $[\text{M} + \text{H}]^+$ et à m/z 371 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, dans les spectres négatif et positif de QM1 (**Figure 33**), montre que sa formule moléculaire est $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9$, ce qui correspond à la structure déterminée par RMN.

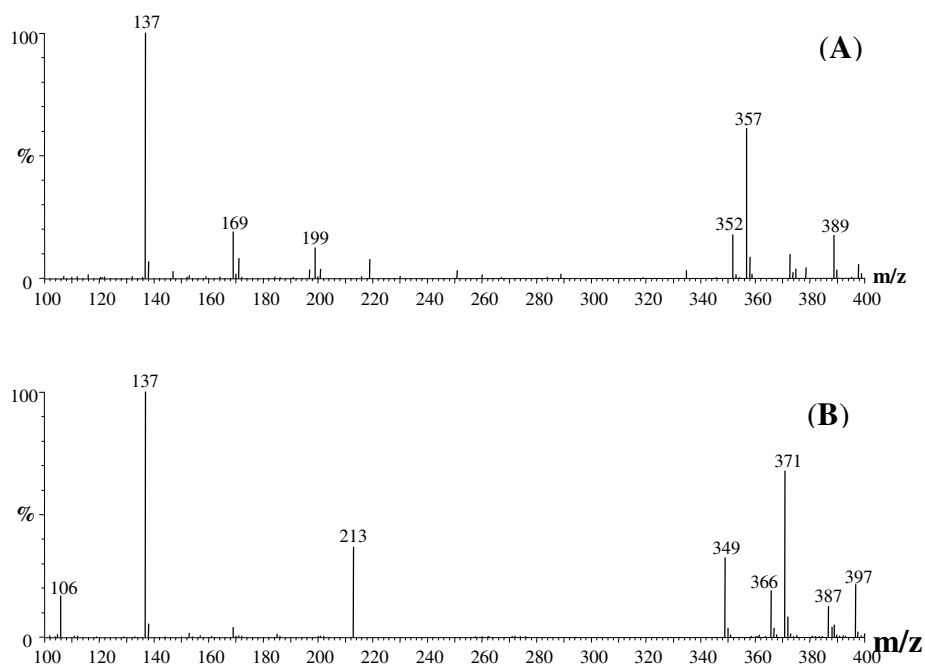


Figure 33 : Spectres de masse positifs des produits QM2 (A) et QM1 (B).

d) Confirmation de la connexion entre les cycles A et B de QM1 et de QM2

L'analyse d'un spectre de masse ne sert pas seulement à déterminer la masse moléculaire d'un produit, mais peut également fournir des informations supplémentaires sur la structure chimique du composé analysé.

Les spectres positifs de QM2 et QM1 ont montré la présence d'autres ions à m/z 137 (pour QM1 et QM2) et à m/z 199 (pour QM2), ainsi qu'à m/z 213 (pour QM1) (**Figure 33**). Sur la **Figure 34**, nous avons proposé un mécanisme de formation de ces fragments. Ceci nous permet de déterminer le site de connexion entre les cycles A et B constituant QM1 et QM2.

L'ion H^+ formé au cours de l'ionisation s'attache à la molécule (QM1 ou QM2) et conduit à la formation de l'ion moléculaire $[M + H]^+$ (**Figure 34**). Celui-ci se décompose pour donner le fragment à m/z 137 (il représente le cycle B, de QM1 ou de QM2, attaché à une fonction CO) et un composé intermédiaire CI qui représente le reste de la molécule $[M + H - 137]$. L'addition d'un autre ion H^+ à CI conduit à la formation des fragments à m/z 199 (à partir de QM2) et à m/z 213 (à partir de QM1).

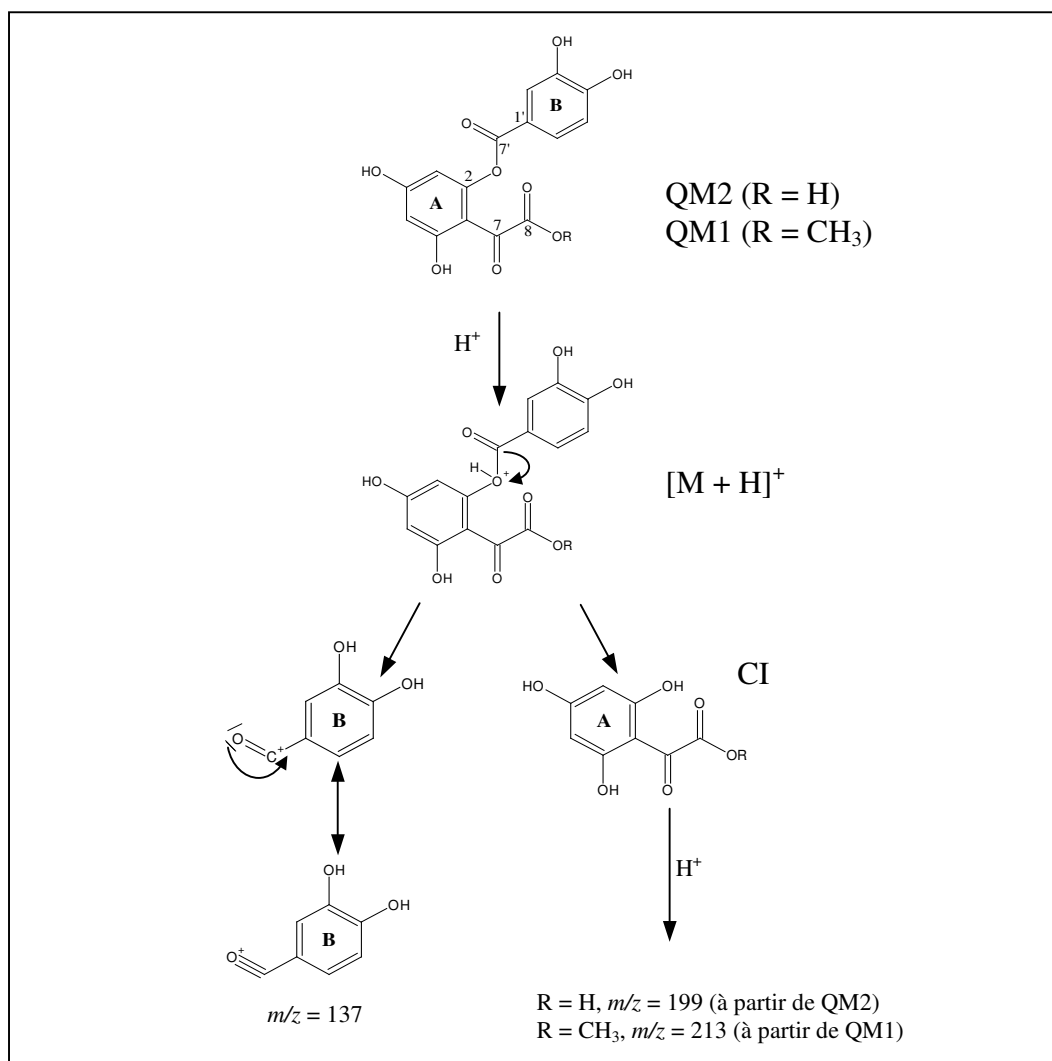


Figure 34 : Mécanisme proposé pour la formation des fragments à m/z 137 et à m/z 199 détectés sur le spectre de masse positif de QM2, et des fragments à m/z 137 et à m/z 213 détectés sur celui de QM1 (Marfak, 2002).

Nous observons que les trois fragments sont obtenus après le détachement des deux cycles A et B au niveau du carbone C-7'. Ceci montre que la connexion entre les cycles A et B de QM1 et de QM2 s'effectue au niveau de la liaison C2-O-C7'-C1', ce qui confirme le résultat déjà obtenu par les analyses RMN.

De plus, le fragment détecté à m/z 199 sur le spectre de QM2 est détecté pour QM1 à m/z 213. Cette différence confirme, d'une part, la liaison C7-C8 et, d'autre part, la présence du groupe OCH₃ lié au carbone en position 8 caractérisant QM1 (**Figure 32**). En effet, c'est la seule différence qui existe entre les structures chimiques de QM1 et QM2 puisque ce dernier est hydroxylé en cette position.

e) Equilibre chimique entre QM1 et QM2

Contrairement à QM1, identifié comme le produit majoritaire de la radiolyse de la quercétine, QM2 est formé en faibles concentrations et est de ce fait un produit minoritaire. En dehors du milieu d'irradiation, QM2 est aussi formé durant l'évaporation de l'éluant contenant QM1. En effet, ce dernier est collecté avec approximativement 30% d'eau et 70% de méthanol. Lors de l'évaporation, l'eau hydrolyse le groupe méthoxyle de QM1 conduisant ainsi à la formation de QM2. Lorsque QM2 est à nouveau solubilisé dans le méthanol, il est estérifié en QM1 (**Figure 35**).

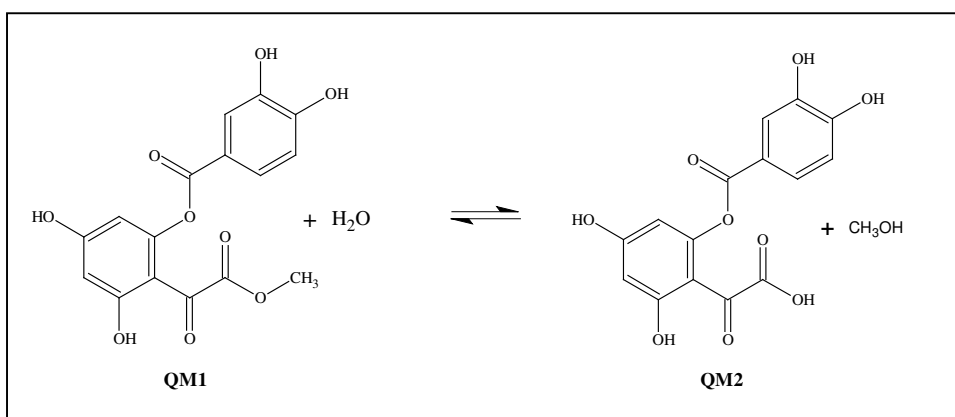


Figure 35 : Equilibre chimique entre QM1 et QM2.

f) Stabilité des produits de radiolyse au cours de l'irradiation

A ce niveau de notre étude, il est intéressant de savoir si QM1 et QM2 sont stables face à l'irradiation dans le méthanol. Pour démontrer ceci, nous avons étudié à nouveau la radiolyse dans le méthanol de QM1 et QM2 après les avoir purifiés.

Les analyses par CLHP des solutions avant et après irradiation ont montré que les deux composés ne se dégradent pas. QM1 et QM2 sont donc stables durant l'irradiation, ce qui montre que la réaction d'hydrolyse de QM1 en QM2 ne se produit qu'en présence de l'eau, et indépendamment de l'irradiation.

I.2. RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS LE METHANOL : GENERALISATION

Pour mieux comprendre le processus de radiolyse des flavonoïdes dans le méthanol, nous avons étudié la radiolyse de 13 autres molécules appartenants à différents groupes de flavonoïdes. Il s'agit de la morine, du kaempférol, de la myricétine, et de la galangine (des flavonols), de la lutéoline, de l'apigénine et de la chrysrine (des flavones), de la (\pm)-taxifoline (une dihydroflavonol), de la (\pm)-naringénine et du (\pm)-ériodictyol (des flavanones), de la (-)-épicatechine (une flavan-3-ol), de la rutine et l'astragaline (des flavonoïdes glycosides)

(Figure 36).

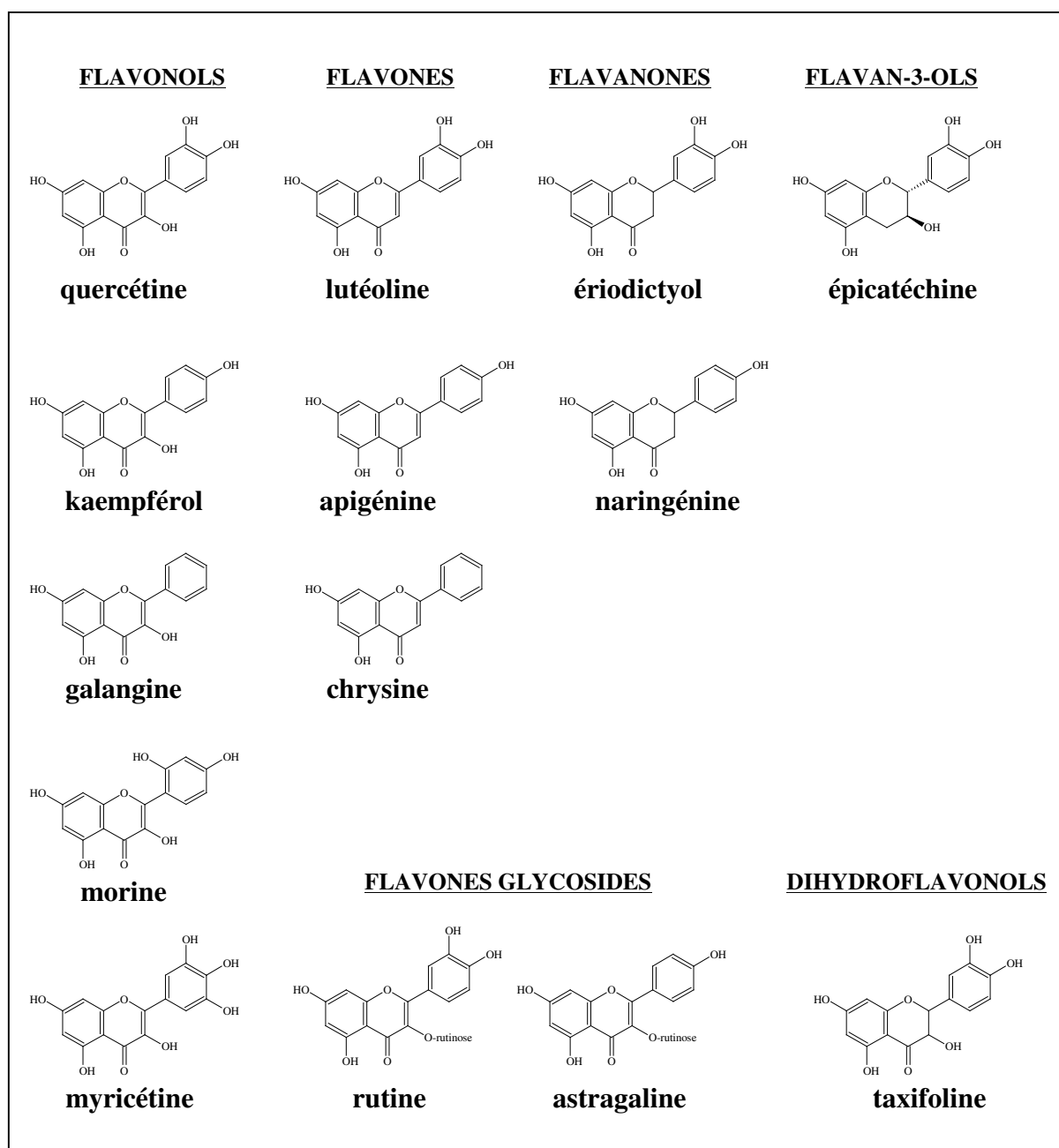


Figure 36 : Structures chimiques des flavonoïdes étudiés.

L'analyse des chromatogrammes obtenus avant et après irradiation de :

- la lutéoline, l'apigénine et la chrysine (des flavones : absence du groupe 3-OH),
- la (\pm)-taxifoline (une dihydroflavonol : présence du groupe 3-OH et absence de la double liaison C2-C3),
- la (\pm)-naringénine et le (\pm)-ériodictyol (des flavanones : absence simultanée de la double liaison C2-C3 et du groupe 3-OH),
- la (-)-épicatéchine (une flavan-3-ol : présence du groupe 3-OH et absence simultanée de la double liaison C2-C3 et de la fonction 4-oxo),
- la rutine et l'astragaline (flavonoïdes glycosides : l'hydrogène du groupe 3-OH est remplacé par un sucre),

ne montre pas de modifications bien que ces neuf flavonoïdes soient irradiés avec des doses supérieures à 20 kGy.

Ces résultats montrent que les flavones, les dihydroflavonols, les flavanones, les flavan-3-ols et les flavonoïdes glycosides ne se dégradent pas au cours de la radiolyse. En revanche, tous les flavonols étudiés (myricétine, morine, kaempférol et galangine) se sont dégradés. Nous déduisons que la présence simultanée du groupe 3-OH et de la double liaison C2-C3 joue un rôle important dans la dégradation des flavonoïdes.

Sur la **Figure 37**, nous avons reporté les chromatogrammes de la galangine ($t_r = 34$ min), du kaempférol ($t_r = 34$ min), de la morine ($t_r = 28$ min) et de la myricétine ($t_r = 28$ min) (5×10^{-3} M) avant irradiation (contrôles) et après irradiation avec une dose de 14 kGy. A cette concentration et à cette dose, les pics CLHP de ces flavonols ont pratiquement disparu à l'exception de la galangine (partiellement dégradée) caractérisée par un cycle B non substitué.

Nous observons également, comme nous l'avons décrit pour la quercétine, que la disparition de la morine, du kaempférol, de la galangine et de la myricétine au cours de la radiolyse est accompagnée de l'apparition de nouveaux produits radiolytiques (**Figure 37**).

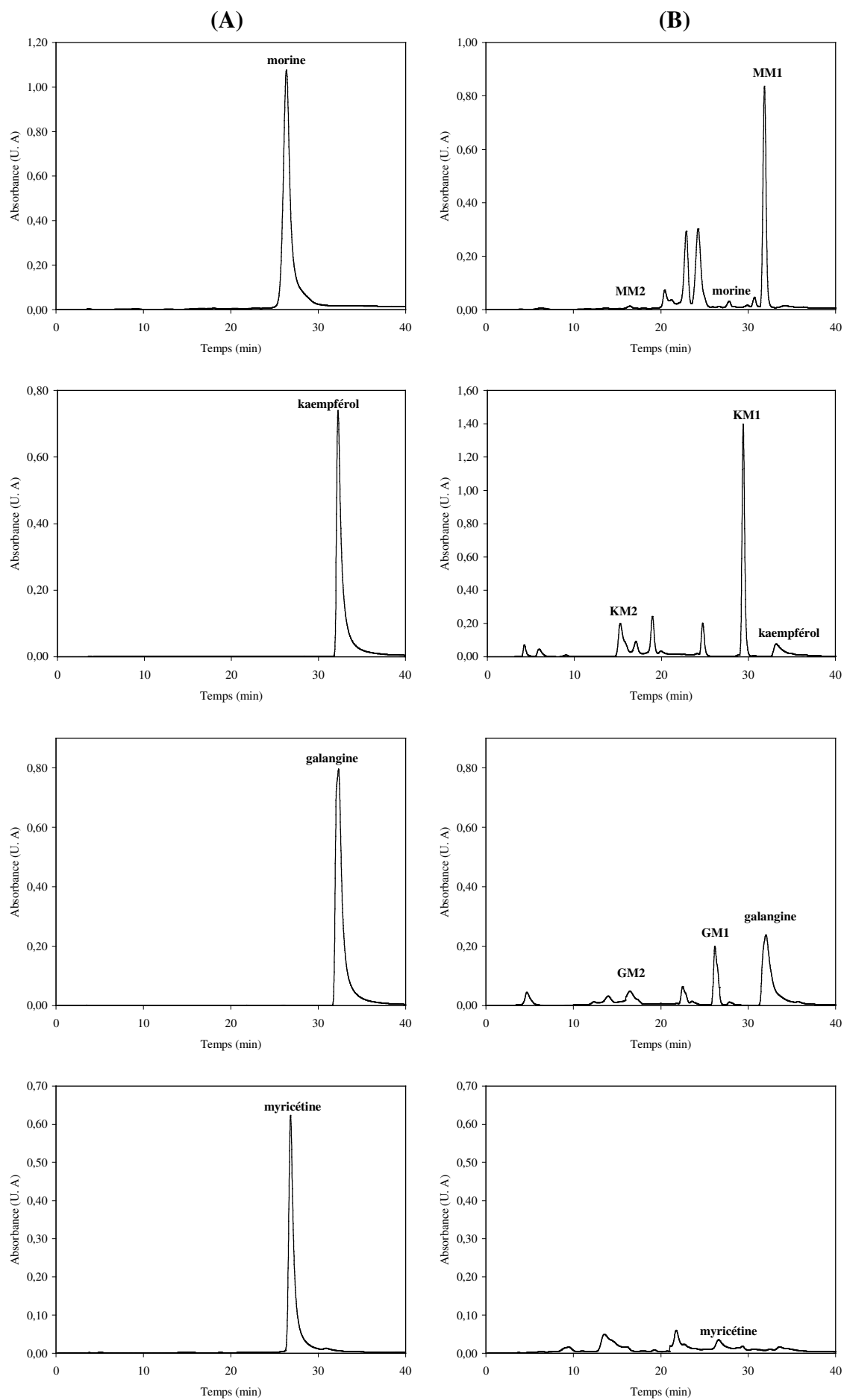


Figure 37 : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de la morine, du kaempférol, de la galangine et de la myricétine avant irradiation (colonne **A**) et après irradiation avec une dose de 14 kGy (colonne **B**). Le débit de dose est 0,22 Gy/s.

Nous avons mentionné préalablement que la radiolyse de la quercétine est un processus qui dépend à la fois de la concentration et de la dose. Autrement dit, pour les concentrations élevées (5×10^{-3} M), la dégradation totale de la quercétine n'est survenue qu'après l'application d'une dose importante (14 kGy). En outre, pour les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), l'irradiation avec des doses inférieures à 4 kGy est suffisante pour causer la dégradation complète de la quercétine. Le même résultat est enregistré pour la radiolyse de la morine, du kaempférol, de la galangine et de la myricétine.

La dégradation de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine conduit à la formation d'un produit majoritaire et d'autres produits minoritaires. Pour la myricétine, tous les composés de dégradation sont formés en faibles quantités et aucun produit majoritaire n'a été détecté. Ceci ne nous a pas permis de continuer l'étude de cette molécule. Pour la suite, nous ne présenterons que les résultats obtenus sur la radiolyse de la quercétine, la morine, le kaempférol et la galangine.

GM1 ($t_r = 26$ min), KM1 ($t_r = 30$ min) et MM1 ($t_r = 31$ min) sont détectés comme étant les produits majoritaires de la dégradation de la galangine, du kaempférol et de la morine, respectivement. D'autres composés sont formés en faibles quantités, notamment GM2 ($t_r = 16$ min), KM2 ($t_r = 16$ min) et MM2 ($t_r = 17$ min) (**Figure 37**).

GM1, KM1 et MM1 sont séparés, par CLHP semi-préparative, à partir de solutions méthanoliques (5×10^{-3} M) préparées avec 48 mg de galangine, de kaempférol ou de morine et irradiées avec une dose de 14 kGy. Les fractions récoltées sont ensuite évaporées sous vide et à 45°C. Les analyses CLHP de ces fractions ont montré, comme dans le cas de la quercétine, la présence de composés qui correspondent à GM2, KM2 et MM2. Ces molécules sont, là encore et comme nous le verrons après l'identification présentée dans les paragraphes suivants, issues de l'hydrolyse de GM1, KM1 et MM1.

1.2.1. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DES FLAVONOLS

a) Spectres UV/visible

Il est reconnu que la plupart des flavones et flavonols possèdent deux bandes d'absorption dans la région ultraviolet/visible : la Bande I entre 230 nm et 385 nm représentant la conjugaison entre les cycles B et C, et la Bande II allant de 240 nm jusqu'à 280 nm représentant la conjugaison entre les cycles A et C (*Markham, 1989*). Pour les flavonols, une augmentation dans le nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B induit un déplacement de la Bande I de 3 nm à 10 nm. Par exemple, les longueurs d'onde d'absorption de la galangine (aucun groupe OH sur le cycle B), du kaempférol (un groupe OH en position 4') et de la quercétine (deux groupes OH en positions 3' et 4') sont respectivement 359 nm, 364 nm et 367 nm (**Figure 38**).

Après la dégradation de la quercétine, de la galangine, du kaempférol et de la morine, nous avons observé que leurs produits de radiolyse possèdent qu'une seule bande d'absorption entre 250 nm et 300 nm (**Figure 38**). Ce résultat témoigne de la disparition des conjugaisons entre les cycles B et C, et entre les cycles A et C, ce qui indique l'ouverture du cycle C dans les produits de radiolyse.

b) Spectres RMN des produits de radiolyse

Les spectres RMN du proton des composés GM1, KM1, MM1, GM2, KM2 et MM2 sont presque similaires (**Tableaux 10, 11 et 12**). Ils diffèrent entre eux par le nombre de protons aromatiques : cinq pour MM1 et MM2, six pour KM1 et KM2, sept pour GM1 et GM2. En fait, ils sont tous constitués d'un cycle tétra substitué (cycle A) et d'un cycle B tri-substitué (MM1 et MM2), di-substitué (KM1 et KM2) et mono-substitué (GM1 et GM2).

Les spectres RMN du carbone de GM2, KM2 et MM2 ont tous montré la présence de 15 carbones aromatiques, alors que ceux de GM1, KM1 et MM1 ont révélé la présence d'un groupe méthoxyle supplémentaire (OCH₃) (**Tableau 10, 11 et 12**).

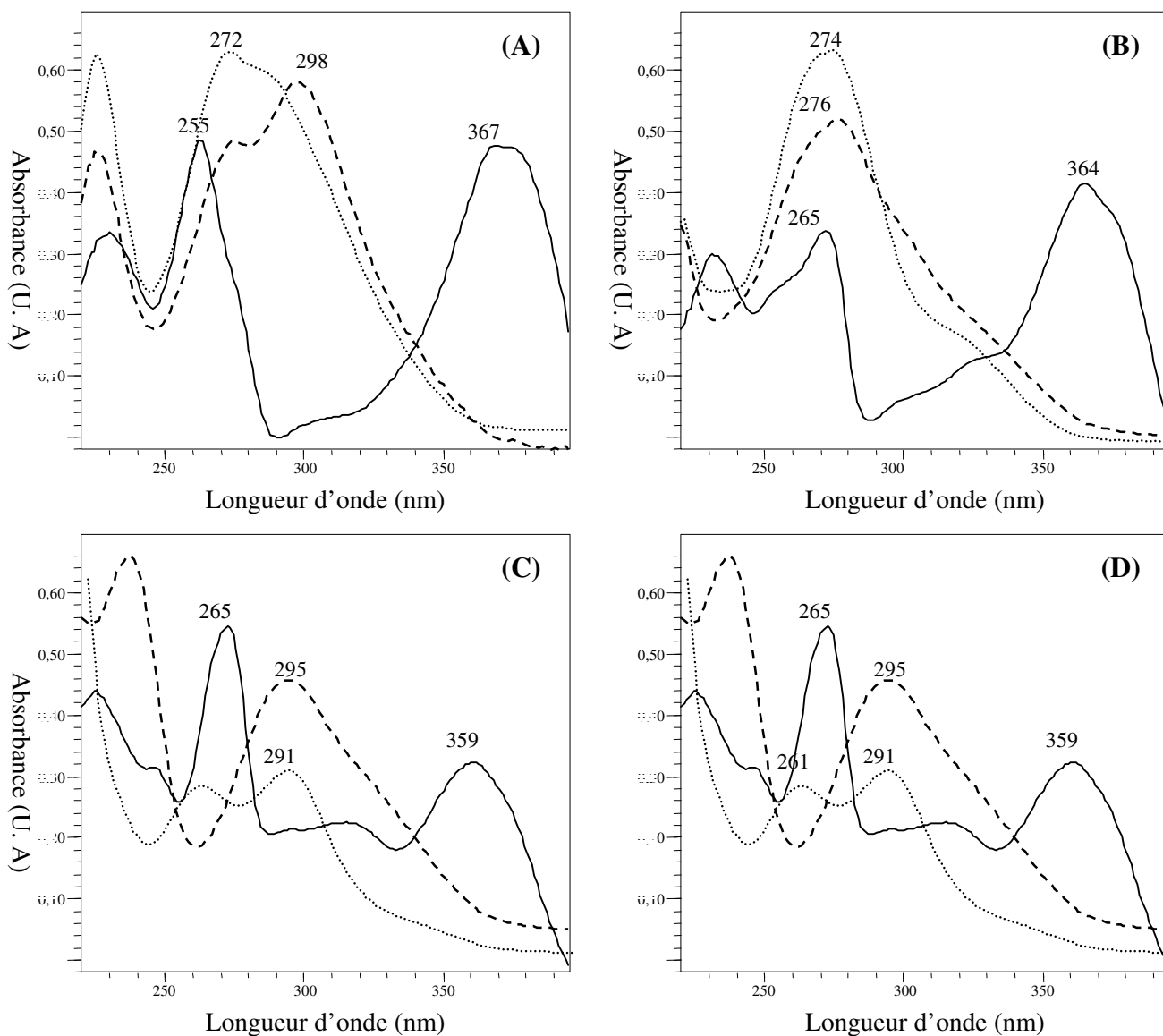


Figure 38 : Spectres UV/Visible de flavonols et de produits formés au cours de la radiolyse dans le méthanol. (A) : quercétine, QM1 et QM2, (B) : kaempférol, KM1 et KM2, (C) : galangine, GM1 et GM2, et (D) : morine, MM1 et MM2. Les flavonols (trait plein), QM1, KM1, GM1 et MM1 (trait en tirets), QM2, KM2, GM2 et MM2 (trait en pointillés). La concentration de chaque composé est 10^{-4} M.

Tableau 10. Spectres RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits KM1 et KM2 mesurés dans $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ (δ ppm; J Hz) (Marfak, 2003b).

Position	^1H	COSY	^{13}C J mod/ HMQC	HMBC
Produit KM1				
1			105,5	
2			167,5	
3	6,26 d (2,2)	H-5	101,6	C-1; C-5
4			168,0	
5	6,19 d (2,2)	H-3	104,8	C-1; C-3
6			155,4	
7			188,6	
8			165,4 ^a	
8-OCH ₃	3,46 s		53,3	C-8
1'			120,9	
2'	7,99 d (8,7)	H-3'	133,9	C-4'; C ₆ '/2'; C-7'
3'	6,88 d (8,7)	H-2'	116,5	C-1'; C ₅ '/3'
4'			164,8	
5'	6,88 d (8,7)	H-6'	116,5	C-1'; C ₃ '/5'
6'	7,99 d (8,7)	H-5'	133,9	C-4'; C ₂ '/6'; C-7'
7'			165,9 ^a	
Produit KM2				
1			105,7	
2			167,7	
3	6,27 d (2,2)	H-5	101,7	C-1; C-5
4			168,2	
5	6,21 d (2,2)	H-3	105,0	C-1; C-3
6			155,3	
7			188,6	
8			165,7 ^b	
1'			120,5	
2'	7,96 d (8,8)	H-3'	133,9	C-4'; C ₆ '/2'; C-7'
3'	6,92 d (8,8)	H-2'	116,6	C-1'; C ₅ '/3'
4'			164,8	
5'	6,92 d (8,8)	H-6'	116,6	C-1'; C ₃ '/5'
6'	7,96 d (8,8)	H-5'	133,9	C-4'; C ₂ '/6'; C-7'
7'			165,9 ^b	

^{a, b} Les assignments peuvent être interchangeables

Tableau 11. Spectres RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits MM1 et MM2 mesurés dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ (δ ppm; J Hz).

Position	^1H	COSY	^{13}C J mod/ HMQC	HMBC
Produit MM1				
1			105,3	
2			167,8	
3	6,24 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,8	C-1; C-5
4			168,2	
5	6,18 <i>d</i> (2,2)	H-3	104,6	C-1; C-3
6			154,6	
7			188,7	
8			165,6 ^a	
8-OCH3	3,42 <i>s</i>	CH ₃	53,2	C-8
1'			105,6	
2'			166,6	
3'	6,31 <i>d</i> (2,0)	H-5'	103,4	C-1'; C-5'
4'			168,3	
5'	6,43 <i>dd</i> (8,8; 2,0)	H-3'; H-6'	109,7	C-1'; C-3'
6'	7,67 <i>d</i> (8,8)	H-5'	134,4	C-2'; C-4'; C-7'
7'			165,8 ^b	
Produit MM2				
1			105,4	
2			167,6	
3	6,27 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,9	C-1; C-5
4			167,8	
5	6,21 <i>d</i> (2,2)	H-3	104,7	C-1; C-3
6			155,1	
7			188,6	
8			165,8 ^b	
1'			104,9	
2'			167,2	C-1'; C-5'
3'	6,35 <i>d</i> (1,8)	H-5'	103,7	
4'			168,5	
5'	6,41 <i>dd</i> (8,4; 1,8)	H-3'; H-6'	109,4	C-1'; C-3'
6'	7,64 <i>d</i> (8,4)	H-5'	133,8	C-2'; C-4'; C-7'
7'			165,9 ^b	

^{a, b} Les assignements peuvent être interchangeables

Tableau 12. Spectres RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits GM1 et GM2 mesurés dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ (δ ppm; J Hz).

Position	^1H	COSY	^{13}C J mod/ HMQC	HMBC
Produit GM1				
1			105,8	
2			167,4	
3	6,30 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,9	C-1; C-5
4			168,1	
5	6,25 <i>d</i> (2,2)	H-3	105,1	C-1; C-3
6			155,1	
7			188,2	
8			166,0 ^a	
8-OCH ₃	3,41 <i>s</i>		53,1	C-8
1'			130,5	
2'	8,18 <i>de</i> (7,2)	H-3'	131,4	C-4'; C ₆ '/2'; C-7'
3'	7,58 <i>te</i> (7,4)	H-2'; H-4'	130,0	C-1'; C ₅ '/3'
4'	7,73 <i>te</i> (7,5)	H-3'; H-5'	135,5	C-2'; C-6'
5'	7,58 <i>te</i> (7,4)	H-4'; H-6'	130,0	C-1'; C ₃ '/5'
6'	8,18 <i>de</i> (7,2)	H-5'	131,4	C ₂ '/6'; C-4'; C-7'
7'			165,6 ^b	
Produit GM2				
1			105,5	
2			168,1	
3	6,24 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,5	C-1; C-5
4			168,3	
5	6,17 <i>d</i> (2,2)	H-3	104,7	C-1; C-3
6			155,5	
7			188,6	
8			165,7 ^a	
1'			130,7	
2'	7,97 <i>de</i> (7,2)	H-3'	131,2	C-4'; C ₆ '/2'; C-7'
3'	7,56 <i>te</i> (7,4)	H-2'; H-4'	130,3	C-1'; C ₅ '/3'
4'	7,75 <i>te</i> (7,7)	H-3'; H-5'	135,8	C-2'; C-6'
5'	7,56 <i>te</i> (7,4)	H-4'; H-6'	130,3	C-1'; C ₃ '/5'
6'	7,97 <i>de</i> (7,2)	H-5'	131,2	C ₂ '/6'; C-4'; C-7'
7'			165,9 ^b	

^{a, b} Les assignements peuvent être interchangeables

Les positions des carbones tertiaires et quaternaires ainsi que celles des groupes méthoxyles sont déterminées par les mêmes procédures que celles utilisées lors de l'identification de QM1 et QM2 (**Tableaux 10, 11 et 12**).

Finalement, MM1, KM1, GM1, MM2, KM2 et GM2 sont identifiés respectivement comme (**Figure 39**) :

3,5-dihydroxy-2-(7-méthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl 2,4-dihydroxybenzoate.

3,5-dihydroxy-2-(7-méthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl 4-hydroxybenzoate.

3,5-dihydroxy-2-(7-méthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl benzoate.

acide 2-[4,6-dihydroxy-2-oxy(2,4-dihydroxybenzoyl)phényl]-2-oxo acétique.

acide 2-[4,6-dihydroxy-2-oxy(4-hydroxybenzoyl)phényl]-2-oxo acétique.

acide 2-[4,6-dihydroxy-2-oxy(benzoyl)phényl]-2-oxo acétique.

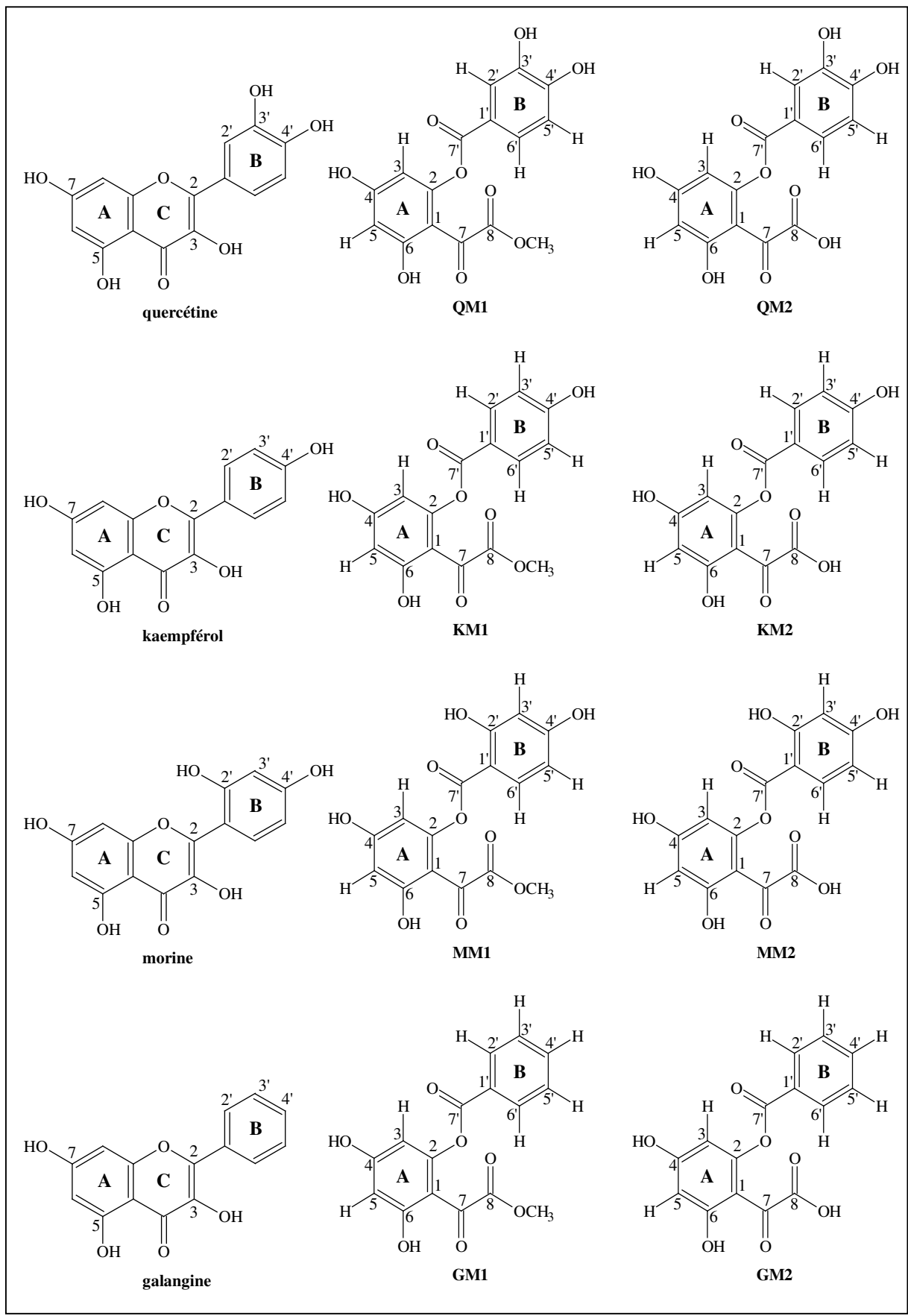


Figure 39 : Structures chimiques des produits issus de la radiolyse des flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine) dans le méthanol.

c) Confirmation par LC-MS

Les spectres de masse négatifs et positifs de MM1, KM1, GM1, MM2, KM2 et GM2 ont montré la présence des ions suivants :

- à m/z 347 $[M - H]^-$, à m/z 349 $[M + H]^+$ et à m/z 371 $[M + Na]^+$ (pour MM1),
- à m/z 331 $[M - H]^-$, à m/z 333 $[M + H]^+$ et à m/z 355 $[M + Na]^+$ (pour KM1),
- à m/z 315 $[M - H]^-$, à m/z 317 $[M + H]^+$ et à m/z 339 $[M + Na]^+$ (pour GM1),
- à m/z 333 $[M - H]^-$ et à m/z 357 $[M + Na]^+$ (pour MM2),
- à m/z 317 $[M - H]^-$ et à m/z 341 $[M + Na]^+$ (pour KM2),
- à m/z 301 $[M - H]^-$ et à m/z 325 $[M + Na]^+$ (pour GM2).

Ces résultats démontrent que les formules moléculaires de MM1, KM1, GM1, MM2, KM2 et GM2 sont respectivement $C_{16}H_{12}O_9$, $C_{16}H_{12}O_8$, $C_{16}H_{12}O_7$, $C_{15}H_{10}O_9$, $C_{15}H_{10}O_8$, $C_{15}H_{10}O_7$, ce qui confirme les structures chimiques obtenues par RMN.

D'un autre côté, d'autres ions sont également détectés sur les spectres positifs de MM1, MM2, KM1, KM2, GM1 et GM2, à savoir :

- à m/z 137 et à m/z 199 (pour MM1),
- à m/z 137 et à m/z 213 (pour MM2),
- à m/z 121 et à m/z 199 (pour KM1),
- à m/z 121 et à m/z 213 (pour KM2),
- à m/z 105 et à m/z 199 (pour GM1),
- à m/z 105 et à m/z 213 (pour GM2).

Rappelons que sur les spectres positifs de QM1 et QM2 (produits de dégradation de la quercétine), nous avons détecté la présence d'un fragment à m/z 137. Celui-ci représente le cycle B attaché à une fonction CO (**Figure 34**). Ce fragment est également observé sur les spectres positifs de MM1 et MM2. Ceci est dû à la structure du cycle B qui est di-substitué pour les quatre composés : MM1/MM2 (2', 4'-OH) et QM1/QM2 (3', 4'-OH).

Pour KM1/KM2 et GM1/GM2, nous avons la formation des fragments à m/z 121 et à m/z 105, respectivement. La différence de masse existant entre ces deux fragments et celui à m/z 137 (formé à partir de MM1/MM2 et QM1/QM2) est 16 et 32, ce qui correspond respectivement à la masse atomique de 1 et 2 atomes d'oxygène. Nous déduisons que les deux

fragments représentent une fonction CO attachée au cycle B de KM1/KM2 et de GM1/GM2, qui est respectivement mono- et non-hydroxylé. Ces résultats montrent que la connexion entre les cycles A et B s'effectue à travers la chaîne C2-O-C7'-C1' (**Figure 32**), ce qui renforce les conclusions des analyses RMN.

La série des composés MM2, KM2 et GM2 donne un fragment à m/z 199, alors que la série MM1, KM1 et GM1 donne un fragment à m/z 213. Cette différence de masse de 14 est due au fait que les composés de la deuxième série sont méthoxylés en position 8, tandis que les composés de la première série sont hydroxylés (**Figure 39**).

Nous constatons que tous ces composés se comportent de la même manière en spectroscopie de masse, ce qui nous permet de généraliser le mécanisme permettant la formation de tous les fragments cités ci-dessus (**Figure 40**).

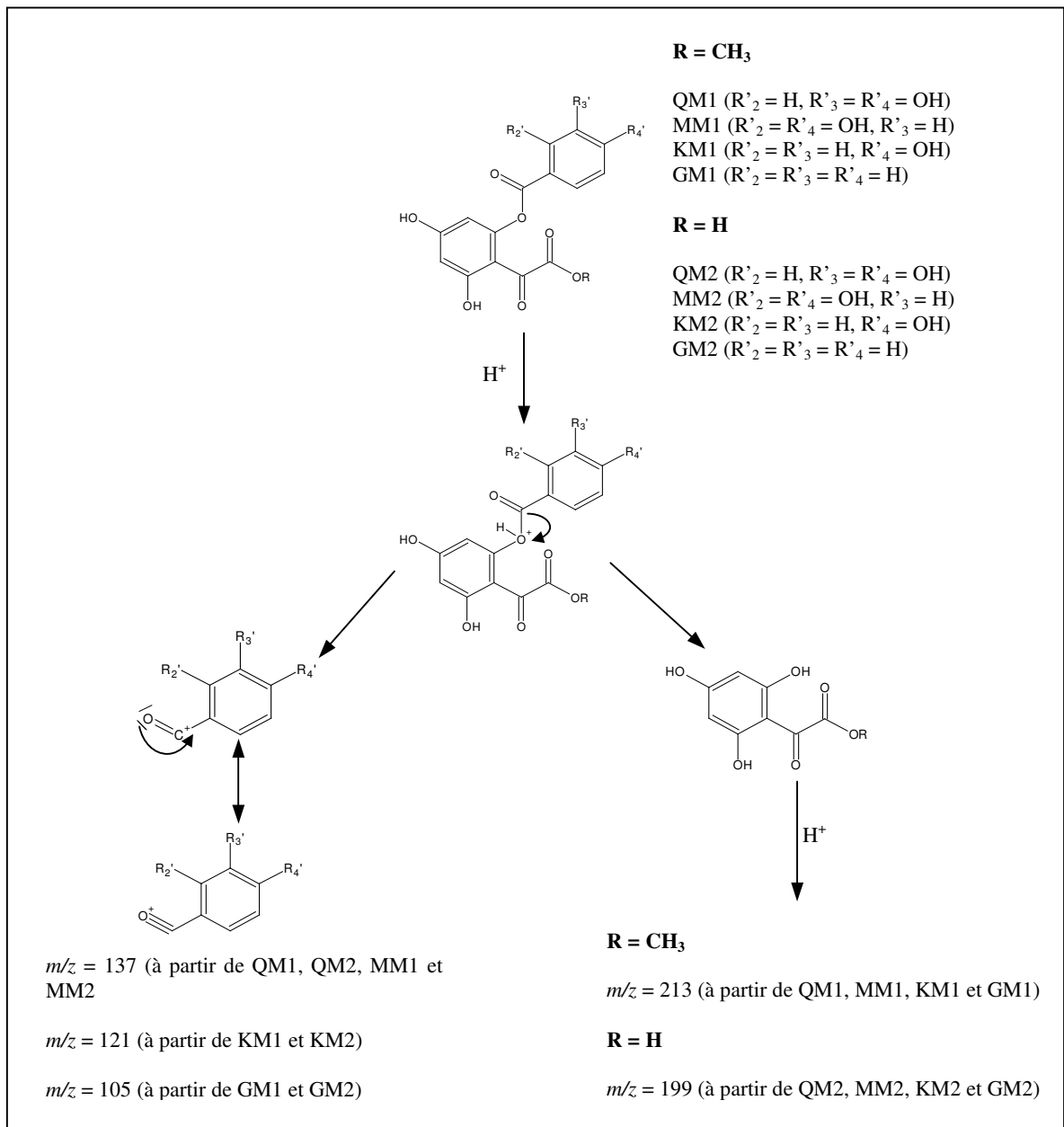


Figure 40 : Mécanisme proposé pour la formation des fragments détectés sur les spectres de masse positifs de QM1, MM1, KM1, GM1, QM2, MM2, KM2 et GM2.

II. RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS L'ÉTHANOL

Pour mieux comprendre le comportement des flavonoïdes en solution face au rayonnement et nous aider dans la recherche du mécanisme de transformation de flavonols, nous avons également étudié leur radiolyse dans l'éthanol (Marfak, 2003d). Nous avons adopté le même protocole que pour le méthanol, différentes concentrations allant de 5×10^{-5} M à 5×10^{-3} M et différentes doses allant de 0,2 kGy à 20 kGy.

De la même manière que pour les solutions méthanoliques, les flavones (lutéoline, chrysin, apigénine), les dihydroflavonols ((±)- taxifoline), les flavanones ((±)- naringénine, (±)- ériodictyol), les flavan-3-ols ((-)- épicatechine) et les flavonoïdes glycosides (rutine et astragaline) n'ont pas été dégradés après irradiation dans l'éthanol. En revanche, les flavonols sont à nouveau le seul groupe de flavonoïdes ayant subi une dégradation. En effet, les analyses CLHP ont montré que la disparition des flavonols est accompagnée de l'apparition de nouveaux pics indiquant la formation de nombreux composés. La **Figure 41** montre les chromatogrammes de la galangine ($t_r = 34$ min), du kaempférol ($t_r = 34$ min), de la quercétine ($t_r = 30$ min) et de la morine ($t_r = 28$ min) (5×10^{-3} M) avant irradiation (contrôles) et après irradiation avec une dose de 14 kGy. A cette concentration et à cette dose d'irradiation, les flavonols sont complètement dégradés, exceptée la galangine (cycle B non substitué) qui n'est que partiellement dégradée.

En ce qui concerne les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), une dose de 4 kGy est suffisante pour entraîner la disparition totale des pics CLHP correspondant aux molécules mères (témoin de leur dégradation complète). On se souvient que des résultats similaires ont été observés lors de l'irradiation des flavonols dans le méthanol.

Toujours en comparaison avec la radiolyse dans le méthanol, nous avons également observé que la quercétine, la morine, le kaempférol et la galangine sont transformés en produits majoritaires QE1 ($t_r = 28$ min), ME1 ($t_r = 33$ min), KE1 ($t_r = 32$ min) et GE1 ($t_r = 32$ min), respectivement (**Figure 41**). D'autres composés sont formés en faibles quantités.

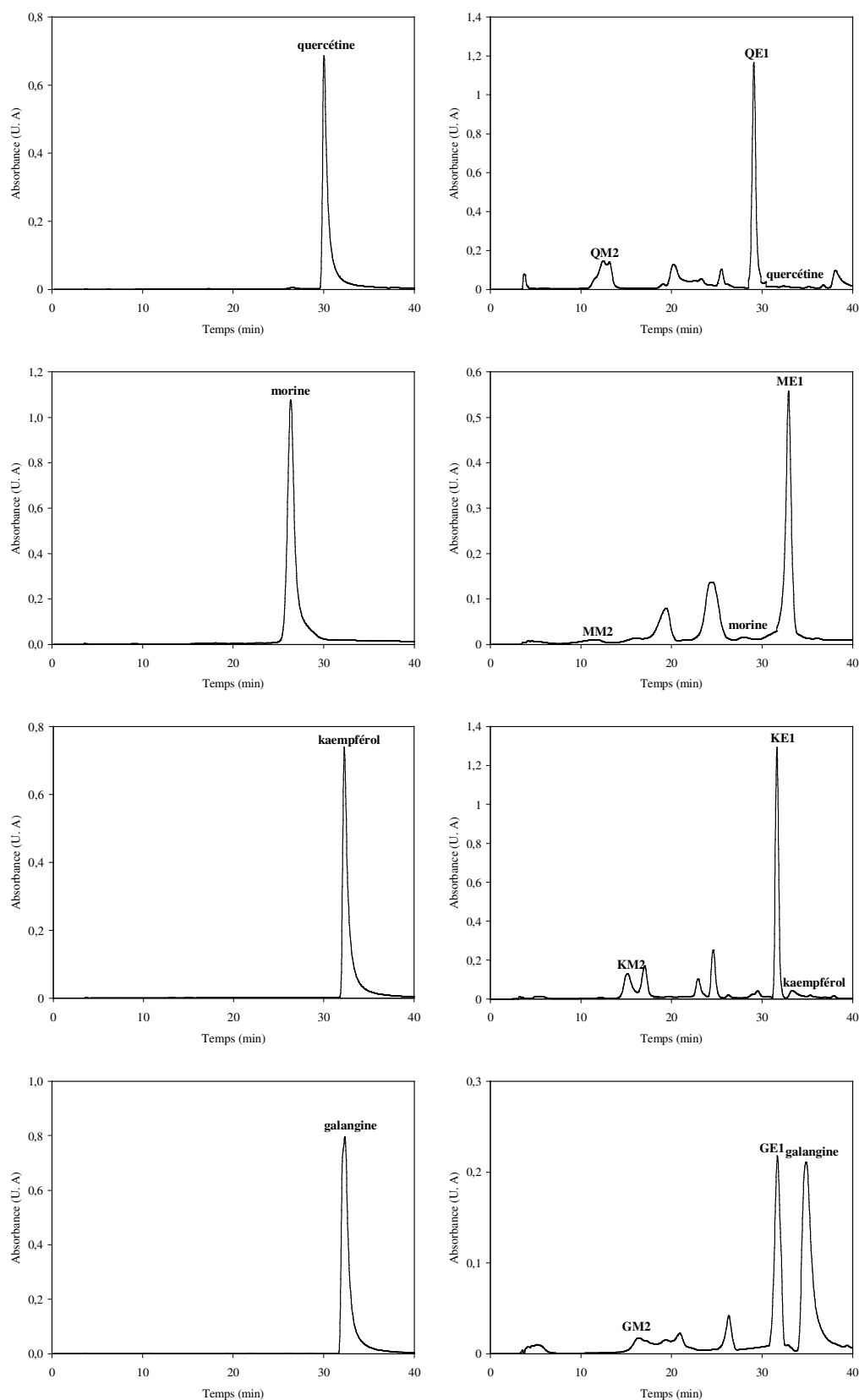


Figure 41 : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine (5×10^{-3} M) avant et après irradiation dans une solution éthanolique avec une dose de 14 kGy.

En utilisant la CLHP semi-préparative, QE1, ME1, KE1 et GE1 sont séparés à partir de solutions d'éthanol préparées avec 48 mg de quercétine, morine, kaempférol et galangine et irradiées avec une dose de 14 K Gy. Ensuite, les éluats sont évaporés à 45°C sous vide. Nous avons ainsi obtenu 12,5 mg de QE1, 8,4 mg de ME1, 11,6 mg de KE1 et 15,4 mg de GE1.

Au cours de la phase d'évaporation, nous avons observé que QE1, ME1, KE1 et GE1 sont transformés respectivement en QE2, ME2, KE2 et GE2 dont les spectres d'absorption UV-visible (**Figure 42**) sont identiques à ceux de QM2, MM2, KM2 et GM2 (**Figure 38**), produits déjà détectés comme étant des composés minoritaires de la dégradation dans le méthanol de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine, respectivement (**Figure 41**). Nous constatons, là encore, l'analogie entre la radiolyse des flavonols dans le méthanol et dans l'éthanol.

II.1. SPECTRES UV/VISIBLE DES PRODUITS RADIOLYTIQUES

Les spectres UV de QE1, KE1 et GE1 possèdent tous une bande d'absorption centrée vers 275-300 nm (**Figure 42**). Le spectre de QE1 diffère à ceux de KE1 et GE1 par la présence d'un épaulement à 280 nm. Le spectre d'absorption UV de ME1 présente deux pics de même intensité à 268 nm et 298 nm (**Figure 42**). Il est différent du spectre de MM1 (produit majoritaire de la dégradation de la morine dans le méthanol). L'ensemble de ces analyses indique la disparition du cycle C.

II.2. SPECTRES RMN DES PRODUITS RADIOLYTIQUES

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de QE1, ME1, KE1 et GE1 (**Tableaux 13 et 14**) sont presque similaires à ceux de QM1, MM1, KM1 et GM1 (produits majoritaires de la dégradation des flavonols dans le méthanol) (**Tableaux 10 et 11**). La seule différence enregistrée est la présence d'un groupe OCH_2CH_3 (pour les produits formés dans l'éthanol) à la place du groupe OCH_3 caractérisant les composés formés dans le méthanol. Les structures chimiques de QE1, ME1, KE1 et GE1 sont déterminées par les procédures RMN déjà détaillées, et confirmées par des analyses LC-MS à partir desquelles nous avons déterminé $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_9$, $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$, $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_8$, $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_9$ comme étant les formules moléculaires de ME1, GE1, KE1 et QE1, respectivement.

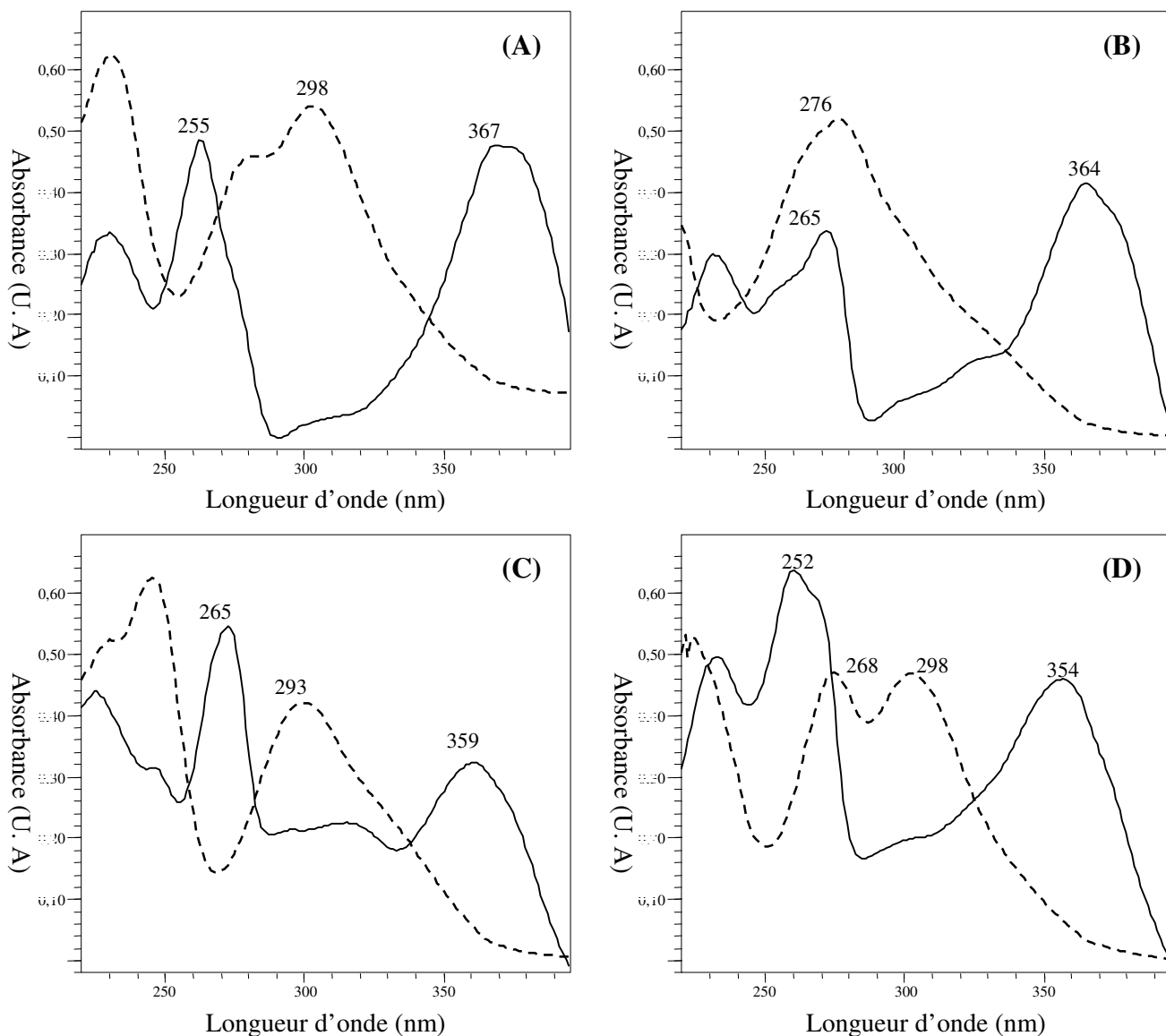


Figure 42 : Spectres d'absorption UV/Visible de flavonols et de produits formés au cours de la radiolyse dans l'éthanol. (A) : quercétine et QE1, (B) : kaempférol et KE1, (C) : galangine et GE1, et (D) : morine et ME1. Les flavonols (trait plein), QE1, KE1, GE1 et ME1 (trait en tirets). La concentration de chaque composé est 10^{-4} M.

Tableau 13. Spectres RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits QE1 et KE1 mesurés dans $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ (δ ppm; J Hz).

Position	^1H	COSY	^{13}C J mod/ HMQC	HMBC
Produit QE1				
1			105,4	
2			168,4	
3	6,18 <i>d</i> (1,7)	H-5	101,9	C-1; C-5
4			168,1	
5	6,10 <i>d</i> (1,7)	H-3	105,1	C-1; C-3
6			155,4	
7			189,2	
8			165,3 ^a	
8-OCH ₂	3,68 <i>q</i> (7,1)	CH ₃	63,2	C-8
CH ₃	0,96 <i>t</i> (7,1)	8-OCH ₂	14,3	
1'			120,7	
2'	7,43 <i>d</i> (1,6)	8-OCH ₂	118,3	C-4'; C-6'; C-7'
3'			146,8	
4'			153,3	
5'	6,79 <i>d</i> (8,3)	H-6'	116,2	C-1'; C-3'
6'	7,38 <i>dd</i> (8,3; 1,6)	H-2'; H-5'	124,7	C-2'; C-4'; C-7'
7'			165,8 ^b	
Produit KE1				
1			105,1	
2			167,7	
3	6,19 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,6	C-1; C-5
4			168,0	
5	6,10 <i>d</i> (2,2)	H-3	104,8	C-1; C-3
6			155,0	
7			188,7	
8			164,6 ^a	
8-OCH ₂	3,66 <i>q</i> (7,1)	CH ₃	62,8	C-8
CH ₃	0,95 <i>t</i> (7,1)	8-OCH ₂	14,0	
1'			120,0	
2'	7,83 <i>d</i> (8,7)	H-3'	133,5	C-4'; C _{6/2'} ; C-7'
3'	6,82 <i>d</i> (8,7)	H-2'	116,4	C-1'; C _{5/3'}
4'			164,8	
5'	6,82 <i>d</i> (8,7)	H-6'	116,4	C-1'; C _{3/5'}
6'	7,83 <i>d</i> (8,7)	H-5'	133,5	C _{2/6'} ; C-4'; C-7'
7'			165,0 ^b	

^{a,b} Les assignements peuvent être interchangeables

Tableau 14. Spectres RMN ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits ME1 et GE1 mesurés dans $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ (δ ppm; J Hz).

Position	^1H	COSY	^{13}C J mod/ HMQC	HMBC
Produit ME1				
1			105,7	
2			167,6	
3	6,29 <i>d</i> (2,0)	H-5	102,0	C-1; C-5
4			168,1	
5	6,23 <i>d</i> (2,0)	H-3	105,1	C-1; C-3
6			155,4	
7			188,6	
8			165,5 ^a	
8-OCH ₂	3,90 <i>q</i> (7,2)	CH ₃	63,5	C-8
CH ₃	1,17 <i>t</i> (7,2)	8-OCH ₂	14,2	
1'			104,5	
2'			167,2	
3'	6,37 <i>d</i> (1,6)	H-5'	103,8	C-1'; C-5'
4'			168,6	
5'	6,44 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	H-3'; H-6'	109,8	C-1'; C-3'
6'	7,75 <i>d</i> (8,0)	H-5'	133,6	C-2'; C-4'; C-7'
7'			165,8 ^b	
Produit GE1				
1			105,7	
2			167,5	
3	6,29 <i>d</i> (2,2)	H-5	101,9	C-1; C-5
4			168,0	
5	6,25 <i>d</i> (2,2)	H-3	105,0	C-1; C-3
6			155,1	
7			188,5	
8			165,6	
8-OCH ₂	3,78 <i>q</i> (7,1)	CH ₃	63,3	C-8
CH ₃	1,07 <i>t</i> (7,1)	8-OCH ₂	13,9	
1'			130,1	
2'	8,10 <i>de</i> (7,2)	H-3'	131,5	C-4'; C _{6/12} '; C-7'
3'	7,57 <i>te</i> (7,8; 6,5)	H-2'; H-4'	130,1	C-1'; C _{5/13} '
4'	7,72 <i>te</i> (6,4; 1,8)	H-3'; H-5'	135,6	C-2'; C-6'
5'	7,57 <i>te</i> (7,8; 6,5)	H-4'; H-6'	130,1	C-1'; C _{3/15} '
6'	8,10 <i>de</i> (7,2)	H-5'	131,5	C _{2/16} '; C-4'; C-7'
7'			165,6	

^{a, b} Les assignements peuvent être interchangeables

Finalemment, GE1, KE1, QE1 et ME1 sont identifiés respectivement comme (**Figure 43**) :

3,5-dihydroxy-2-(7-éthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl benzoate.

3,5-dihydroxy-2-(7-éthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl 4-hydroxybenzoate.

3,5-dihydroxy-2-(7-éthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl 3,4-dihydroxybenzoate.

3,5-dihydroxy-2-(7-éthoxyloxy-carbonyl-7-oxo)phényl 2,4-dihydroxybenzoate.

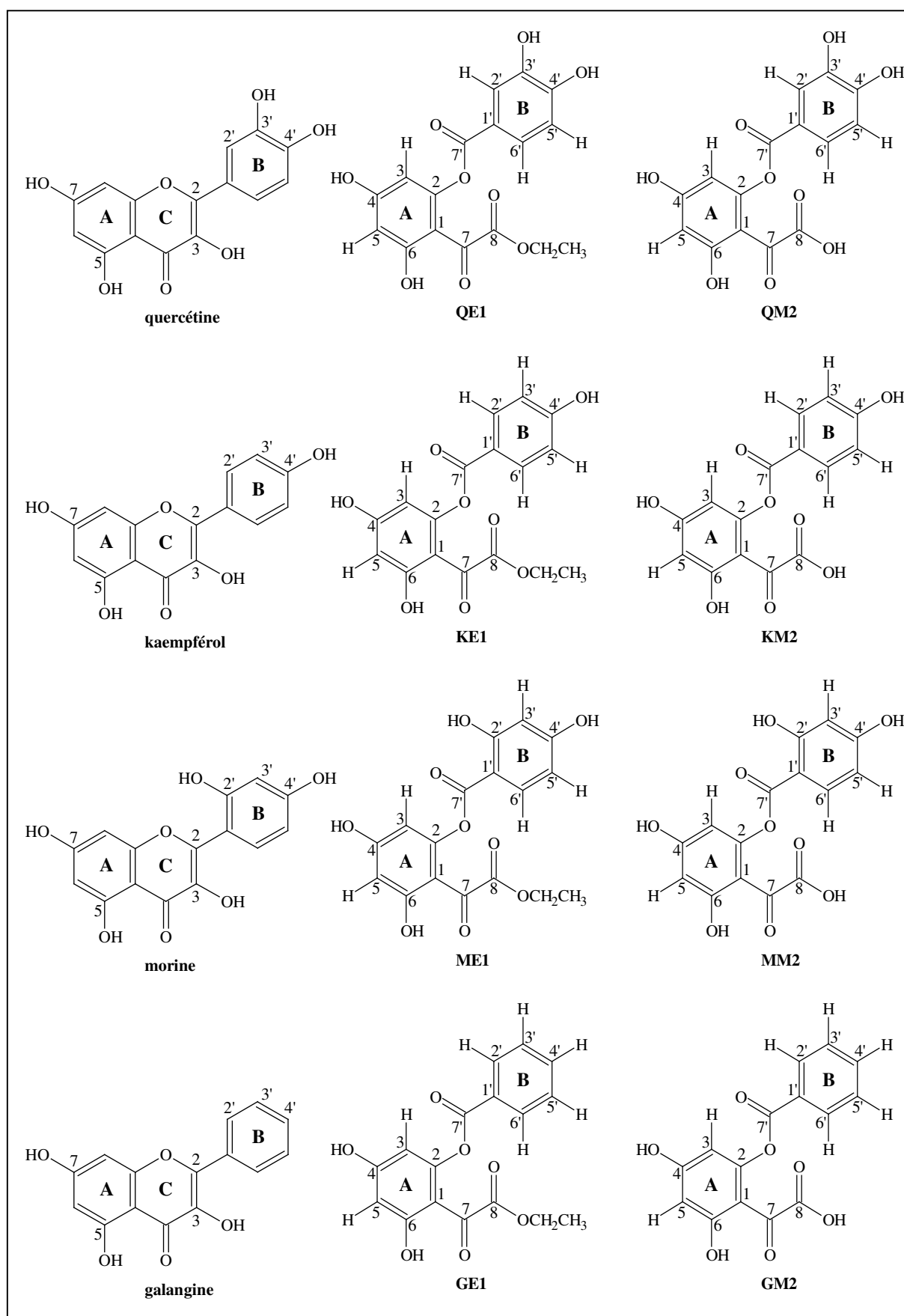


Figure 43 : Structures chimiques des produits issus de la radiolyse des flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine) dans l'éthanol.

III. MECANISME DE TRANSFORMATION DES FLAVONOLS EN DEPSIDES

Au cours de la radiolyse dans le méthanol ou dans l'éthanol, les flavonols étudiés sont transformés en :

- (i) produits majoritaires : QM1, MM1, KM1 et GM1 (formés respectivement après irradiation de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine dans le méthanol), et QE1, ME1, KE1 et GE1 (formés dans l'éthanol).
- (ii) produits minoritaires parmi lesquels nous avons identifié : QM2, MM2, KM2 et GM2 formés après dégradation, dans les deux milieux d'irradiation (méthanol et éthanol).

Ces 12 composés possèdent une structure de base commune : deux cycles aromatiques liés entre eux par une fonction ester (**Figure 2**). Ils diffèrent par le nombre d'hydroxylation sur le cycle B, et également par la nature du groupement lié au carbone C-8. Nous constatons que ces composés constituent un nouveau groupe de molécules qui appartiennent à la famille des depsides.

III.1. RENDEMENT RADIOLYTIQUE ET COURBE DE DILUTION

Pour calculer les rendements radiolytiques, nous avons utilisés la même méthode pour tous les flavonols étudiés et nous développons à titre d'exemple, la radiolyse de la quercétine dans les deux solvants :

Première étape

Dans un premier temps, nous avons établi une courbe d'étalonnage concentration-surface du pic CLHP pour la quercétine, QM1 et QE1.

Deuxième étape

A partir des chromatogrammes obtenus pour chaque concentration initiale de quercétine (5×10^{-5} M, 10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M et 5×10^{-3} M) irradiée avec différentes doses (0,2 kGy à 20 kGy) (**Figures 27, 28 et 41**) et à partir de l'étalonnage

précédent, nous avons suivi l'évolution de la disparition de quercétine et de la formation de QM1 et QE1 (Figures 44 a et 44 b).

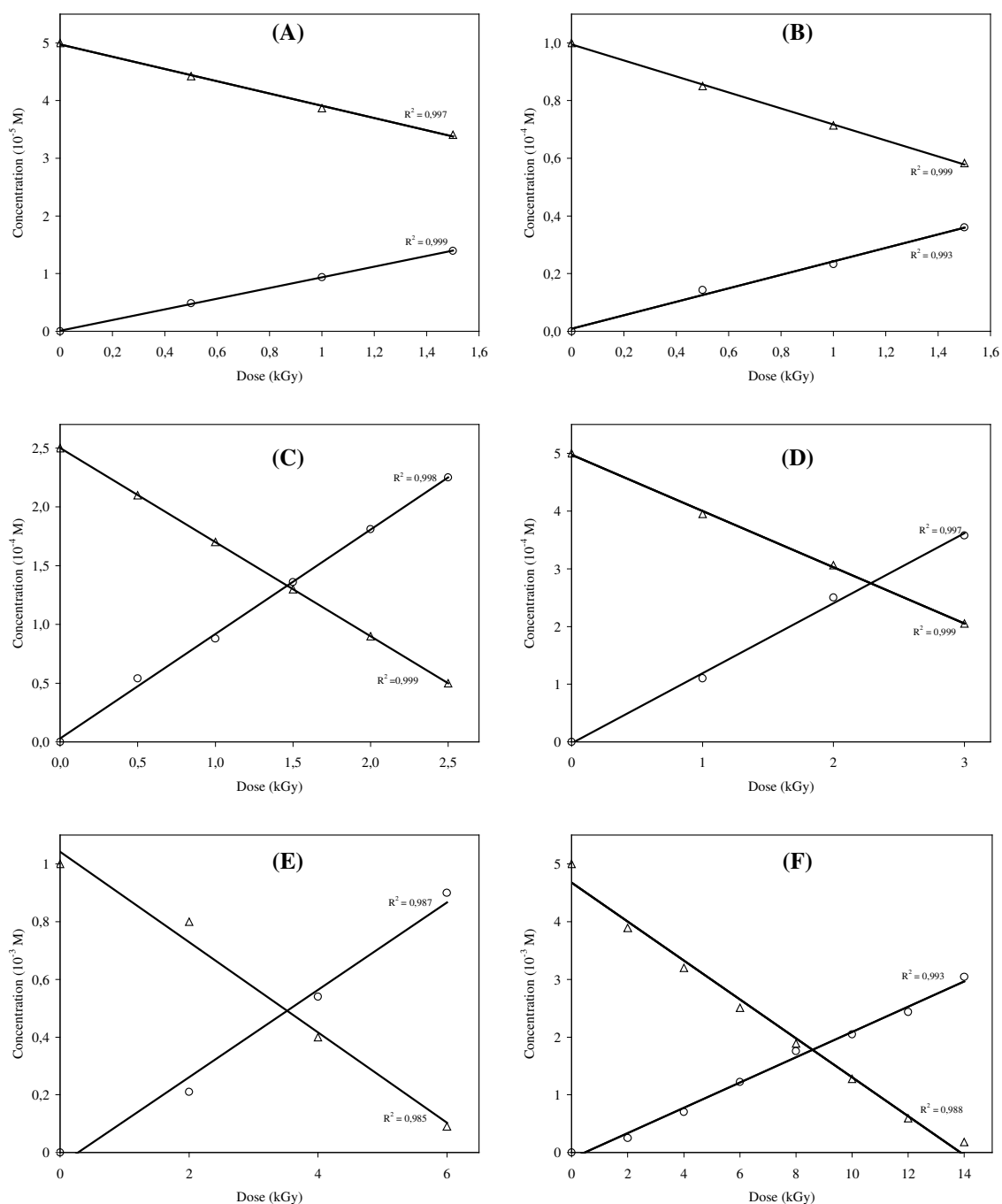


Figure 44 a : Consommation de quercétine (Δ) et formation de QM1 (O) en fonction de la dose et pour différentes concentrations initiales de quercétine : 5×10^{-5} M (A), 10^{-4} M (B), $2,5 \times 10^{-4}$ M (C), 5×10^{-4} M (D), 10^{-3} M (E), 5×10^{-3} M (F). Le débit de dose est 0,22 Gy/s. Solvant : méthanol en solutions non désaérées.

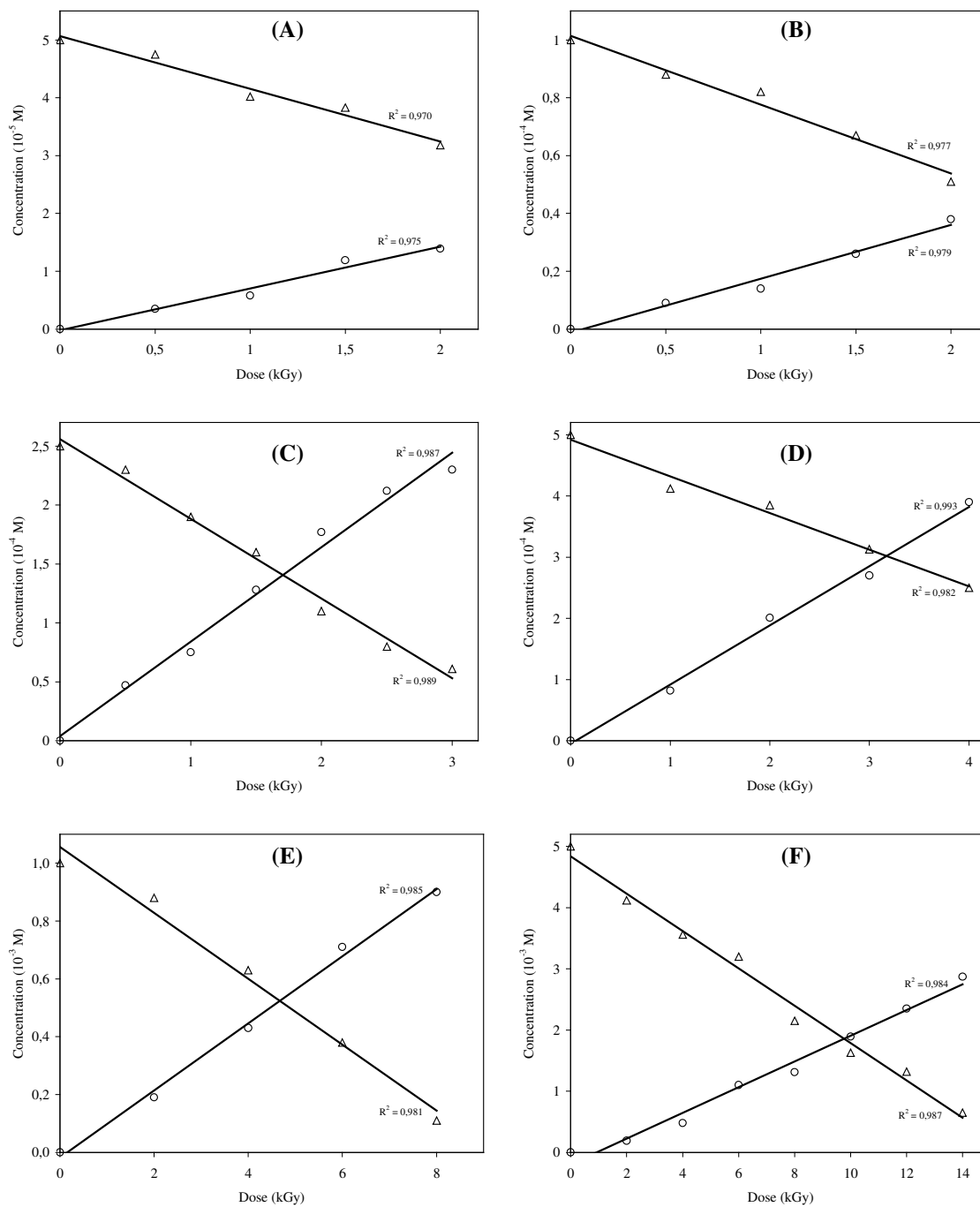


Figure 44 b : Consommation de quercétine (Δ) et formation de QE1 (O) en fonction de la dose et pour différentes concentrations initiales de quercétine : 5×10^{-5} M (A), 10^{-4} M (B), $2,5 \times 10^{-4}$ M (C), 5×10^{-4} M (D), 10^{-3} M (E), 5×10^{-3} M (F). Le débit de dose est 0,22 Gy/s. Solvant : éthanol en solutions non désaérées.

Troisième étape

Les courbes obtenues (**Figures 44 a et b**) sont des droites. Les rendements radiolytiques de la quercétine, de QM1 et de QE1 sont calculés, à partir des pentes de ces droites, pour chaque concentration initiale du soluté en utilisant l'équation (éq. 1) précédemment décrite au chapitre IV :

$$G = \frac{10^6}{\rho_s} \frac{\Delta M}{D} \mu\text{mol J}^{-1}$$

ρ_s est la densité du solvant, D est la dose absorbée (Gy) et ΔM est la concentration (M).

Dans cette expression, $\frac{\Delta M}{D}$ représente la pente des droites illustrées sur les **Figures 44 a et b** décrivant l'évolution de la concentration en fonction de la dose.

Ces calculs permettent de reporter sur la **Figure 45**, l'évolution du rendement de disparition de la quercétine et celui de formation de QM1 et QE1 en fonction de la concentration initiale de quercétine.

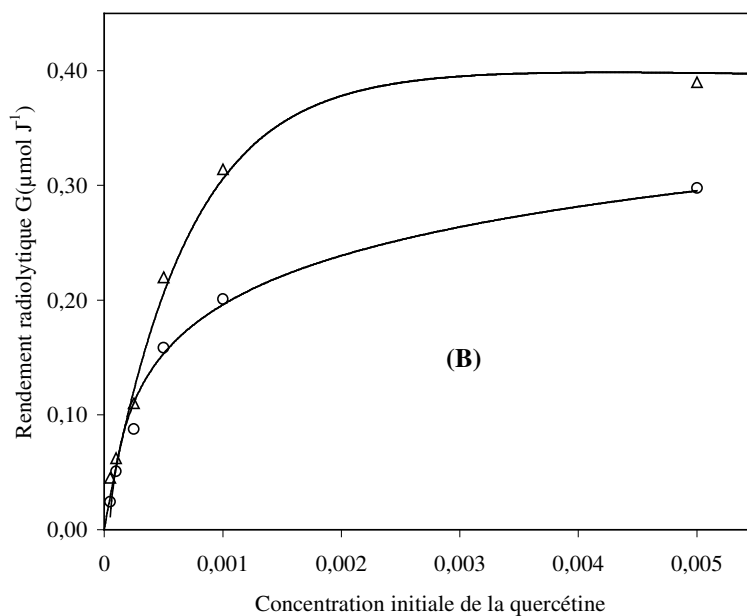
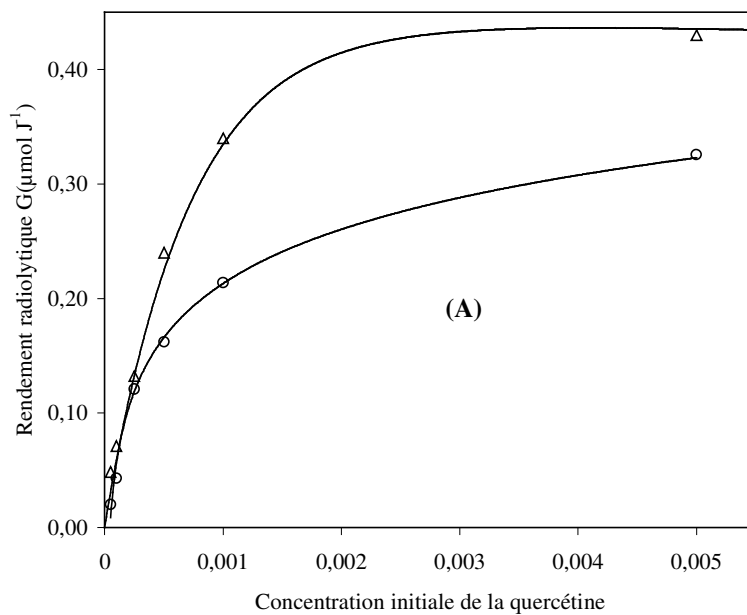


Figure 45 : Rendement radiolytique de disparition de la quercétine (Δ) et de formation de QM1 et QE1 (\circ). (A) et (B) correspondent respectivement à la radiolyse dans le méthanol et dans l'éthanol.

Pour des concentrations inférieures à 10^{-4} M, $G(-\text{quercétine})_{\text{méthanol}} \cong G(\text{QM1})$ et $G(-\text{quercétine})_{\text{éthanol}} \cong G(\text{QE1})$.

Pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M, nous observons que les deux courbes représentatives du rendement de disparition de la quercétine sont au-dessus de celles décrivant les rendements de QM1 et de QE1.

Il est à noter également que le rendement de disparition, dans le méthanol ou dans l'éthanol, augmente d'abord avec la concentration initiale de quercétine puis atteint un palier pour des concentrations supérieures à 10^{-3} M. Ce résultat est en accord avec ce que l'on appelle l'effet de dilution que nous avons décrit précédemment (voir chapitre IV). En effet, au palier de la courbe de dilution, le rendement de disparition de la quercétine est indépendant de la concentration initiale, et $G(-\text{quercétine})_{\text{méthanol}} \cong G(\text{HMR})$ et $G(-\text{quercétine})_{\text{éthanol}} \cong G(\text{HER})$ (voir les **Tableaux 7 et 8** chapitre IV pour les valeurs de rendements $G(\text{HMR})$ et $G(\text{HER})$ de la bibliographie).

Les mêmes résultats sont obtenus pour les autres flavonols (kaempférol, morine et galangine). Nous proposons dans un premier temps que seuls HMR et HER sont responsables de la dégradation des flavonols et, par conséquent, la formation de QM1 et QE1.

Il nous reste maintenant à déterminer le site primaire où la réaction flavonols-HMR/HER se déclenche.

HMR et HER peuvent réagir avec les flavonoïdes :

- (i) soit au niveau des groupes 2'-OH, 3'-OH ou 4'-OH sur le cycle B,
- (ii) soit au niveau des groupes 5-OH et 7-OH sur le cycle A,
- (iii) soit au niveau du groupe 3-OH.

Nous avons observé que durant leur radiolyse, les flavonols (quercétine, kaempférol, morine et galangine) se transforment majoritairement en depsides après ouverture du cycle C, cependant que les structures des deux cycles A et B ne sont pas affectées par l'irradiation. Ceci indique que les groupes 5-OH, 7-OH, 2'-OH, 3'-OH et 4'-OH ne sont pas impliqués dans la transformation des flavonols en depsides et que, par conséquent, nous pouvons exclure les première et deuxième suppositions ((i) et (ii)). En revanche, le cycle B peut contribuer à la formation de produits minoritaires. Par exemple, Jovanovic et ses collaborateurs ont montré que les radicaux superoxydes réagissent avec les flavonoïdes au niveau du cycle B et conduisent à la formation de quinones (*Jovanovic, 1994*).

La radiolyse des flavones (lutéoline, apigénine et chrysin analogues de la quercétine, du kaempférol et de la galangine, respectivement) et des flavonoïdes glycosides (rutine et astragaline) a montré que ces deux groupes de flavonoïdes (caractérisés par l'absence de 3-OH ou la substitution par un sucre) ne se dégradent pas. Ce résultat démontre l'importance du groupe 3-OH dans la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux HMR et HER.

Nous avons également observé que la taxifoline (dihydroflavonol analogue de la quercétine, caractérisée par l'absence de la double liaison C2-C3) et la (-)-épicatéchine (flavan-3-ol analogue de la quercétine, caractérisée par l'absence de la fonction 4-oxo et de la double liaison C2-C3) n'ont pas été dégradées par irradiation. Ceci nous permet d'avancer que la double liaison C2-C3 est également un paramètre important dans la dégradation des flavonoïdes en depsides.

En réunissant tous ces résultats, nous proposons que le groupe 3-OH des flavonols est le site redox primaire d'attaque de HMR et HER, alors que la double liaison C2-C3 permet l'ouverture du cycle C, et de ce fait joue un rôle complémentaire dans la transformation des flavonols en depsides (**Figures 39 et 43**).

Par le truchement de toutes ces discussions, nous pouvons proposer un premier mécanisme de transformation de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine en depsides ((QM1, QE1 et QM2), (MM1, ME1 et MM2), (KM1, KE1 et KM2) et (GM1, GE1 et GM2), respectivement) (**Figure 46**). La première étape est le transfert d'un atome d'hydrogène à partir du groupe 3-OH au profit des radicaux HMR ou HER aboutissant à la formation du flavonoxy $F1-O^\bullet$ et d'une molécule de méthanol ou d'éthanol. La deuxième étape est la réduction de la double liaison C2-C3 suivie de la formation d'une fonction cétone en position 3 via un effet mésomère ($F1^\bullet$). Les solutions non désaérées avec lesquelles nous avons travaillé contiennent $2,2 \cdot 10^{-4}$ M d'oxygène. Ce dernier peut oxyder rapidement le radical carboné $F1^\bullet$ et conduire à la formation du radical peroxy ($F2^\bullet$). En réagissant avec le méthanol ou l'éthanol, $F2^\bullet$ se transforme en un hydroperoxyde organique (F3). Cette réaction est accompagnée de la formation de HMR ou HER. Les hydroperoxydes organiques étant des composés très instables à cause de la faible énergie de dissociation de la liaison O-O, F3 se décompose alors en un radical hydroxyle ($^\bullet OH$) et un radical alcoxyle ($F4^\bullet$).

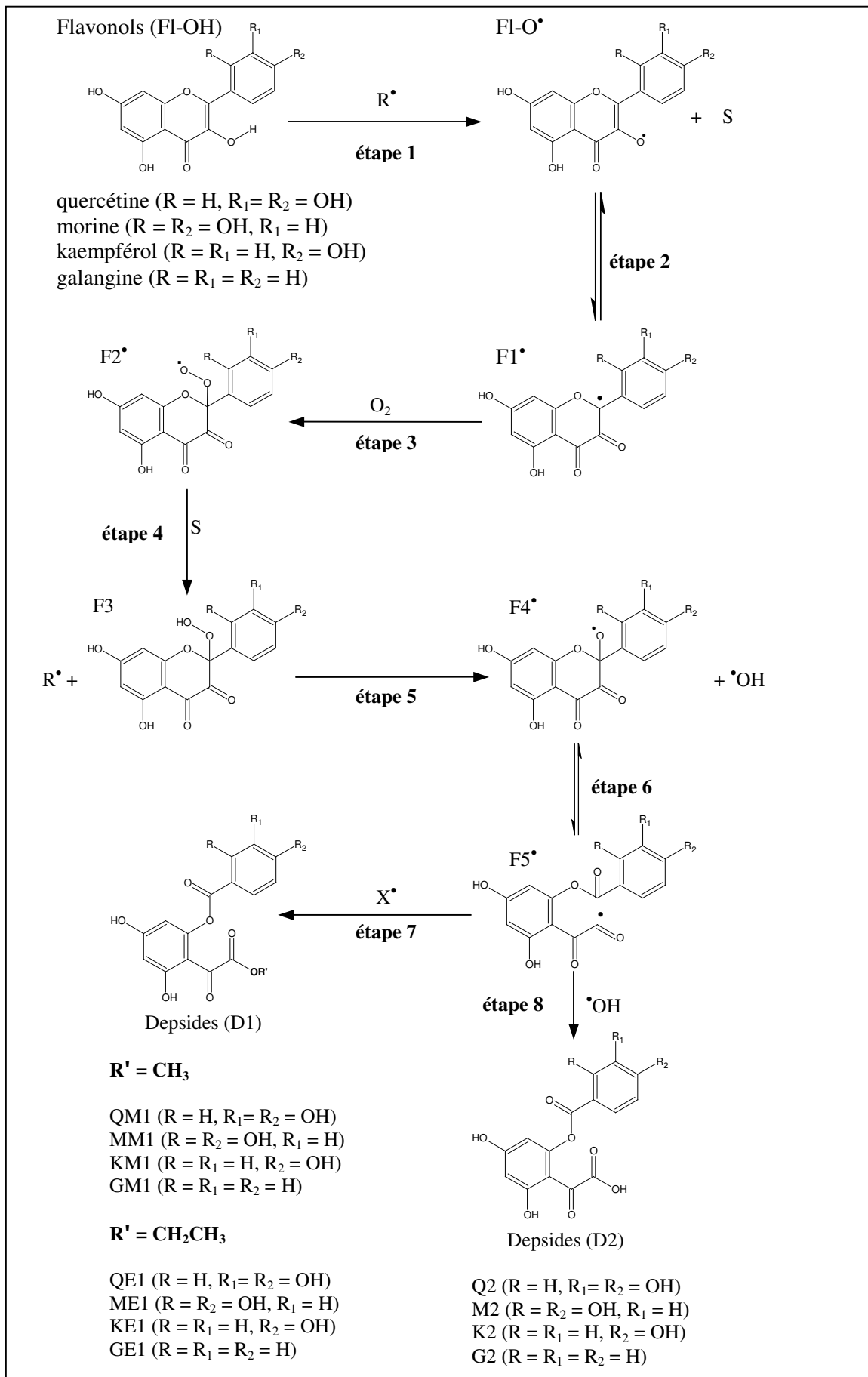


Figure 46 : Mécanisme réactionnel proposé pour la transformation des flavonols, au cours de leur radiolyse en solutions méthanoliques ou éthanoliques non désaérées, en depsides. R \bullet représente HMR ou HER et X \bullet représente CH₃O \bullet ou CH₂CH₃O \bullet . S est le solvant, méthanol ou éthanol.

F4[•] peut se transformer, en cassant la liaison C2-C3 voisine, en un autre radical F5[•]. Ceci aboutit à l'ouverture du cycle C et la formation d'une deuxième fonction cétone en position 2. F5[•] peut se recombinaer avec CH₃O[•] (milieu méthanolique) ou avec CH₃CH₂O[•] (milieu éthanolique) pour former des depsides (QM1, MM1, KM1 et GM1) ou (QE1, ME1, KE1 et GE1), respectivement. De la même manière, le radical [•]OH, formé après la décomposition de F3, peut réagir avec F5[•] et conduire à la formation des depsides hydroxylés en position 8 (QM2, MM2, KM2 et GM2). Ces derniers composés sont formés en faibles quantités (produits minoritaires). Ceci peut être dû au fait que seule une faible quantité de radicaux [•]OH ne sont pas piégés par le solvant (méthanol et éthanol reconnus pour leur grande réactivité vis-à-vis de [•]OH).

Un mécanisme similaire a été récemment proposé pour la quercétine et le kaempférol (Kaizer, 2001). En effet, il a été montré qu'en présence des radicaux tels que 2,2,6,6-tétraméthyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) et 2,6-di-*tert*-butyl-a-(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-*p*-tolyloxy (galvinoxyl), les deux flavonols subissent une oxygénation catalytique et se transforment en depsides avec libération de CO (**Figure 47**).

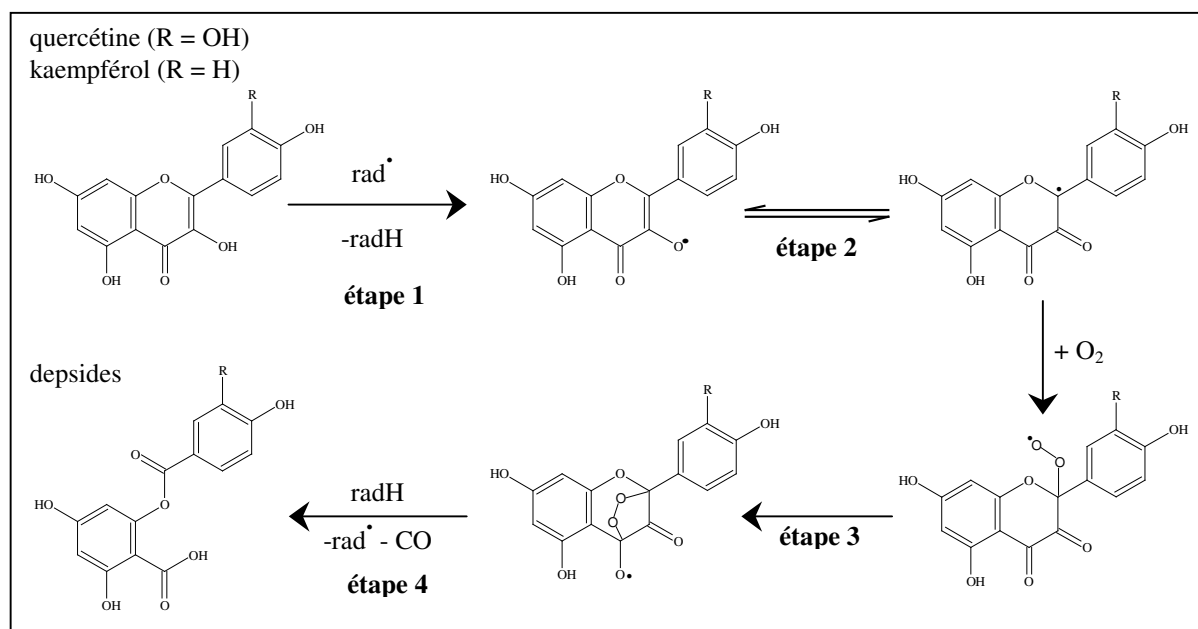


Figure 47 : Les radicaux TEMPO et galvinoxyl (rad[•]) initient la transformation de la quercétine et du kaempférol en depsides. Mécanisme proposé par Kaizer et ses collaborateurs (Kaizer, 2001).

Dans ce mécanisme (**Figure 47**), il a été proposé (étape 3) que le radical peroxy se transforme en radical alcoyle pour lequel l'électron célibataire est porté par l'oxygène lié au carbonyle 4, ce qui favorise la libération de CO. En comparaison avec le mécanisme de la **Figure 46**, nous avons proposé que le radical peroxy ($F2^{\bullet}$) réagit avec l'alcool et conduit à la formation d'un hydroperoxyde organique (F3). C'est la différence au niveau de cette étape intermédiaire qui peut expliquer le fait que les depsides QM1, MM1, KM1, GM1, QE1, ME1, KE1, GE1, QM2, MM2, KM2 et GM2 ont conservé leur fonction CO (carbonyle 7) (**Figure 46**). Mis à part ce détail, les radicaux TEMPO, galvinoxyl, HMR et HER jouent le même rôle puisqu'ils réagissent tous avec le groupe 3-OH des flavonols menant à l'ouverture du cycle C et par conséquent à la formation de depsides.

IV. CONFIRMATION DES PREMIÈRES ÉTAPES DU MÉCANISME DE TRANSFORMATION DES FLAVONOLS EN DEPSIDES PAR MODÉLISATION MOLECULAIRE

Nous avons suggéré que, grâce à leur groupe 3-OH, les flavonols réagissent avec HMR et HER en leur cédant un atome d'hydrogène (**Figure 46**). En modélisation moléculaire, comme nous l'avons évoqué précédemment (matériels et méthodes), ce transfert d'hydrogène se traduit par l'énergie de dissociation ou BDE. En conséquence, il nous est apparu important de calculer les valeurs de BDE pour tous les flavonoïdes étudiés (**Tableau 15**). Rappelons que plus la valeur de BDE est faible plus la capacité à céder l'atome d'hydrogène est importante.

Tableau 15 : BDE (kcal/mol) calculées pour chaque groupement OH des flavonoïdes en utilisant la méthode AM1 (Marfak, 2003e).

Flavonoïdes	Composé	OH-substitutions					
		3-OH	5-OH	7-OH	2'-OH	3'-OH	4'-OH
Flavonols	quercétine	31,6	47,5	45,9		32,8	32,9
	morine	31,7	47,9	46,1	40,4		41,1
	kaempférol	31,3	47,7	45,8			38,6
	galangine	31,3	47,6	45,7			
Flavones	lutéoline		48,2	44,3		33,4	33,4
	apigénine		48,2	44,2			39,3
	chrysin		48,2	44,3			
Dihydroflavonols	(2S3S)-taxifoline	60,9	46,9	45,2		32,1	31,8
	(2R3R)-taxifolin	60,9	47,2	45,1		32,8	32,4
Flavanones	S-ériodictyol		47,1	44,6		32,7	36,2
	R-ériodictyol		47	44,5		36,6	32,1
	S-naringénine		46,9	44,5			38,1
	R-naringénine		46,9	44,5			38,1
Flavan-3-ols	(-)-épicatéchine	58,9	38,1	40,28		32,9	36,1

Nous observons que les valeurs de BDE les plus faibles sont obtenues pour le groupement 3-OH des flavonols (quercétine, kaempférol, morine et galangine), ce qui indique que ce groupement est le plus apte à céder un atome d'hydrogène, et par conséquent confirme la première étape du mécanisme de transformation des flavonols en depsides (**Figure 46**).

De plus, ces valeurs sont deux fois inférieures à celles du groupe 3-OH de la taxifoline (absence de la double liaison C2-C3) (60,9 kcal/mol) et de l'épicatéchine (absence de la double liaison C2-C3 et de la fonction 4-oxo) (58,9 kcal/mol). Ce résultat est en accord, d'une part avec le fait que ces deux molécules ne se dégradent pas au cours de l'irradiation, et d'autre part, avec le fait que la double liaison C2-C3 est un paramètre important dans la dégradation des flavonols en depsides, puisque sa présence favorise la transformation du radical flavonoxy (FI-O[•]), par effet de mésomérie, en radical FI[•] (**Figure 46**).

Un autre paramètre qui contribue à la confirmation de notre mécanisme réactionnel (**Figure 46**) est la répartition de la bande SOMO. Après avoir cédé un atome d'hydrogène à HMR ou HER, le flavonol se transforme en radical flavonoxy (FI-O[•]). L'électron célibataire est essentiellement représenté par la SOMO, qui doit être délocalisée pour stabiliser le radical. En revanche, si l'électron et donc la SOMO sont localisés sur un site bien déterminé du radical, celui-ci devient instable et réagit très vite avec les molécules avoisinantes.

Pour tous les flavonols étudiés, nous avons réalisé un calcul au niveau AM1 de la distribution spatiale de la SOMO pour les radicaux flavonoxy formés après arrachement de l'atome d'hydrogène du groupement 3-OH (*Marfak, 2003e*). Sur la **Figure 48**, nous avons représenté la distribution de la SOMO sur le radical flavonoxy issu de la quercétine. Le même résultat est obtenu pour les autres radicaux issus du kaempférol, de la morine et de la galangine.

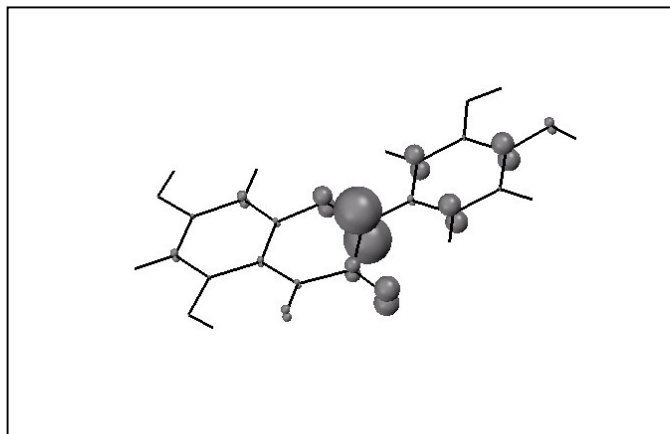


Figure 48 : Répartition spatiale de la couche SOMO sur le radical flavonoxy formé après arrachement de l'atome d'hydrogène à partir du groupement 3-OH de la quercétine.

Nous observons que la SOMO est localisée sur le carbone C2. Ceci confirme les deuxième et troisième étapes du mécanisme proposé pour la transformation des flavonols en depsides (**Figure 46**). En effet, nous avons suggéré l'existence du radical F1[•] dont l'électron célibataire est sur le carbone C2, ce qui permet l'addition d'oxygène moléculaire sur ce site pour former F2[•].

V. COMPARAISON AVEC LA DÉGRADATION DES FLAVONOÏDES PAR CERTAINES ENZYMES

Les dioxygénases sont des enzymes qui utilisent l'oxygène moléculaire pour oxyder leurs substrats. Ce sont des métalloprotéines qui jouent un rôle important dans la biosynthèse et le catabolisme de certains composés. Par exemple, la quercétine 2,3-dioxygénase extraite à partir du champignon *Aspergillus flavus*, est une enzyme cuivre-dépendante (Oka, 1971) qui catalyse l'oxydation de la quercétine en depside avec libération de CO (Oka, 1972). Récemment, Kooter et ses collaborateurs ont isolé cette enzyme à partir d'un autre champignon (*Aspergillus japonicus*), et ont étudié sa réactivité sur différents groupes de flavonoïdes (Kooter, 2002). Ils ont observé que l'enzyme réagit avec les flavonols et conduit à leur transformation en depsides. Les flavones (absence du groupe 3-OH), les flavanones (absence de la double liaison C2-C3) et les flavan-3-ols (absence de la double liaison C2-C3 et de la fonction 4-oxo) ne sont pas dégradés. On peut déduire que la présence simultanée du groupement 3-OH et de la double liaison C2-C3 est responsable de la dégradation des flavonols par la quercétine 2,3-dioxygénase (**Figure 49**).

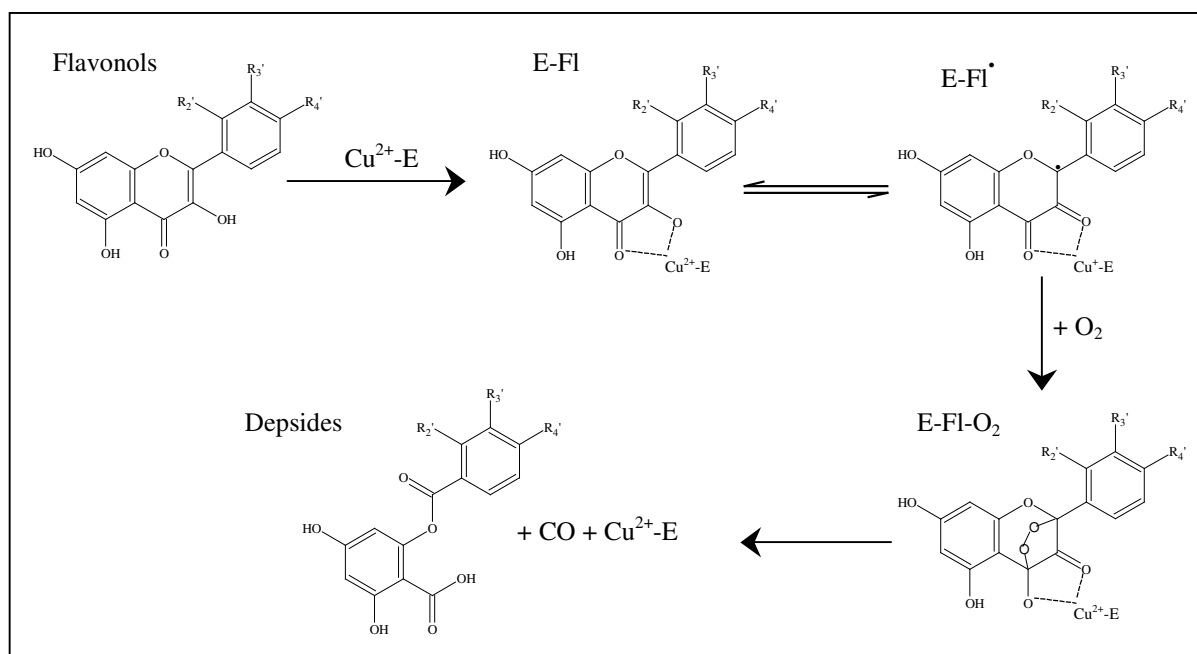


Figure 49 : Mécanisme de dégradation des flavonols par l'enzyme, quercétine 2, 3-dioxygénase ($\text{Cu}^{2+}\text{-E}$) (Kooter 2002).

Le mécanisme réactionnel propose, dans un premier temps, que l'enzyme s'attache au flavonol, via son ion Cu^{2+} au niveau du site liant les groupes 3-OH et 4-oxo, ce qui conduit à la formation d'un complexe (E-FI) (**Figure 49**). Par effet de mésomérie, E-FI se transforme en radical E-FI \bullet , qui après réaction avec le dioxygène au niveau du carbone C2 conduit à la formation d'un autre complexe E-FI-O $_2$. Ce complexe oxygéné se décompose ensuite en depside avec libération de CO et régénération de l'enzyme (**Figure 49**).

En comparaison avec nos résultats, nous constatons que la quercétine 2,3-dioxygénase et les radicaux HMR et HER jouent le même rôle dans la dégradation des flavonols, puisqu'ils réagissent tous au niveau du groupe 3-OH et conduisent à l'ouverture du cycle C grâce à la présence de la double liaison C2-C3.

L'ouverture du cycle C a été également observée au cours de la dégradation de certains flavonoïdes comme la quercétine, le kaempférol et la naringénine, par des bactéries du genre *Clostridium*, isolées à partir des matières fécales humaines (Winter, 1989). En effet, ces bactéries synthétisent des enzymes capables de causer la cassure du cycle C au niveau de la liaison C3-C4 du flavonoïde. Les bactéries *Eubacterium ramulus* et *methanogenic Consortia* sont aussi capables de dégrader la rutine et la quercétine en les transformant en depsides (Schneider, 1999 ; Herrmann, 2001). Là aussi, le mécanisme métabolique a suggéré la présence de quercétine 2,3-dioxygénase.

Par ailleurs, la formation des depsides a été également observée chez les champignons. Par exemple, Bars et ses collaborateurs ont rapporté que la dégradation de la rutine en depside est due à la présence de trois enzymes secrétées par le champignon (Barz, 1975). Dans une première étape, la β -glycosidase hydrolyse la rutine en quercétine. Ensuite, sous l'action de la quercétine 2,3-dioxygénase, la quercétine se convertit en depside et ceci en libérant du monoxyde de carbone (CO). La dernière étape fait appel à l'estérase qui favorise le détachement des deux cycles constituant le depside, conduisant à la formation de deux acides aromatiques : 3,4-dihydroxy acide benzoïque et 2,4,6-trihydroxy acide benzoïque.

Quoique l'irradiation ne puisse pas être considérée comme un modèle *in vitro* de la dégradation des flavonoïdes par les enzymes, puisque certains processus enzymatiques sont très spécifiques et que l'irradiation ne peut pas les reproduire, la radiolyse des flavonols dans le méthanol et dans l'éthanol conduit à la formation d'un nouveau groupe de depsides

similaire à celui formé au cours de la dégradation des flavonols par la quercétine 2,3-dioxygénase (Balogh-Hergovich, 2000 ; Barhàcs, 2001 ; Kooter, 2002).

VI. RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES EN TANT QUE PIÈGEURS DES RADICAUX DÉRIVÉS D'ALCOOLS

Comme nous venons de le voir, en les irradiant en solutions méthanoliques ou éthanoliques, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavones, les flavan-3-ols et les flavonoïdes glycosides ne sont pas affectés. En revanche, les flavonols sont transformés en une nouvelle série de depsides. Nous avons proposé que cette transformation structurale est due au piégeage, par les flavonols, des radicaux HMR et HER présents dans le milieu d'irradiation. Rappelons que c'est le groupe 3-OH de ces molécules qui réagit avec les deux radicaux en leur cédant un atome d'hydrogène, conduisant à la formation d'un radical flavonoxy (**Figures 46**). Pour déterminer la relation entre la structure des flavonoïdes et leur capacité à piéger ces radicaux, il nous est apparu nécessaire de calculer les constantes de vitesse des réactions flavonols – HMR/HER.

VI.1. CALCUL DES CONSTANTES DE VITESSE DE REACTION DES FLAVONOLS AVEC HMR ET HER POUR LE PREMIER MÉCANISME

En se basant sur la **Figure 46**, nous pouvons écrire le schéma cinétique suivant :





Dans ce schéma cinétique, Fl-OH représente les flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine). S est le solvant (méthanol ou éthanol). R[•] est [•]CH₂OH ou CH₃[•]CHOH. X[•] est CH₃O[•] ou CH₃CH₂O[•]. Fl-O[•], F1[•], F2[•], F3, F4[•] et F5[•] sont les intermédiaires de la **Figure 46**. D1 et D2 représentent respectivement les depsides majoritaires (QM1, MM1, KM1, GM1, QE1, ME1, KE1 et GE1) et minoritaires (QM2, MM2, KM2 et GM2).

L'application du principe des états stationnaires sur H[•], X[•], R[•], F1[•], F2[•], F3, F4[•], F5[•], et [•]OH permet d'écrire :

$$\frac{d[H^\bullet]}{dt} = a_s IG(H^\bullet) + v_{51} - v_{52} = 0 \quad (\text{éq. 14})$$

$$\frac{d[X^\bullet]}{dt} = a_s IG(X^\bullet) - v_{53} - v_{60} = 0 \quad (\text{éq. 15})$$

$$\frac{d[R^\bullet]}{dt} = a_s IG(R^\bullet) + v_{52} + v_{53} - 2v_{54} - v_{55} + v_{57} + v_{62} = 0 \quad (\text{éq. 16})$$

$$\frac{d[F1^\bullet]}{dt} = v_{55} - v_{56} = 0 \quad (\text{éq. 17})$$

$$\frac{d[F2^\bullet]}{dt} = v_{56} - v_{57} = 0 \quad (\text{éq. 18})$$

$$\frac{d[F3]}{dt} = v_{57} - v_{58} = 0 \quad (\text{éq. 19})$$

$$\frac{d[F4^\bullet]}{dt} = v_{58} - v_{59} = 0 \quad (\text{éq. 20})$$

$$\frac{d[F5^\bullet]}{dt} = v_{59} - v_{60} - v_{61} = 0 \quad (\text{éq. 21})$$

$$\frac{d[\bullet OH]}{dt} = v_{58} - v_{61} - v_{62} = 0 \quad (\text{éq. 22})$$

Où I est le débit de dose (0,22 Gy/s) et $a_s = \rho_s \times 10^{-6}$.

A partir de ces équations, nous obtenons :

$$v_{52} = a_s IG(H^\bullet) + v_{51} \quad (\text{éq. 23})$$

$$v_{53} = a_s \text{IG}(\text{X}^\bullet) - v_{60} \quad (\text{éq. 24})$$

$$a_s \text{IG}(\text{R}^\bullet) + v_{52} - 2 v_{54} + (v_{53} + v_{57} - v_{55}) + v_{62} = 0 \quad (\text{éq. 25})$$

$$v_{55} = v_{56} = v_{57} = v_{58} = v_{59} = v_{60} + v_{61} \quad (\text{éq. 26})$$

Substituons (éq. 23), (éq. 24) et (éq. 26) dans (éq. 25), nous aboutissons à :

$$a_s \text{IG}(\text{R}^\bullet) + a_s \text{IG}(\text{H}^\bullet) + v_{51} - 2 v_{54} + (a_s \text{IG}(\text{X}^\bullet) - v_{60}) + v_{62} = 0 \quad (\text{éq. 27})$$

Puisque $v_{62} = v_{60}$ (à partir de éq. 20 – éq. 22) et $v_{51} = a_s \text{IG}(\text{e}_s^-)$, alors :

$$2 v_{54} = a_s \text{IG}_{\text{tot}} \text{ avec } G_{\text{tot}} = G(\text{e}_s^-) + G(\text{H}^\bullet) + G(\text{X}^\bullet) + G(\text{R}^\bullet)$$

D'où,

$$[\text{R}^\bullet] = \sqrt{\frac{a_s \text{IG}_{\text{tot}}}{2k_{54}}} \quad (\text{éq. 28})$$

D'un autre côté, on a :

$$a_s \text{IG}(-\text{Fl} - \text{OH}) = k_{55} [\text{Fl} - \text{OH}] [\text{R}^\bullet] \quad (\text{éq. 29})$$

Insérons (éq. 28) dans (éq. 29), nous obtenons l'évolution du rendement de disparition de chaque flavonol en fonction de sa concentration initiale :

$$G(-\text{Fl} - \text{OH}) = \frac{k_{55}}{a_s I} \sqrt{\frac{a_s \text{IG}_{\text{tot}}}{2k_{54}}} [\text{Fl} - \text{OH}] \quad (\text{éq. 30})$$

Sur la **Figure 50**, nous avons tracé l'ensemble des points expérimentaux $G(-\text{Fl}-\text{OH})$ de chaque flavonol (quercétine, morine, kaempférol et galangine) en fonction de sa concentration initiale. Ces rendements sont calculés suivant les démarches précédemment détaillées (pages 126-129).

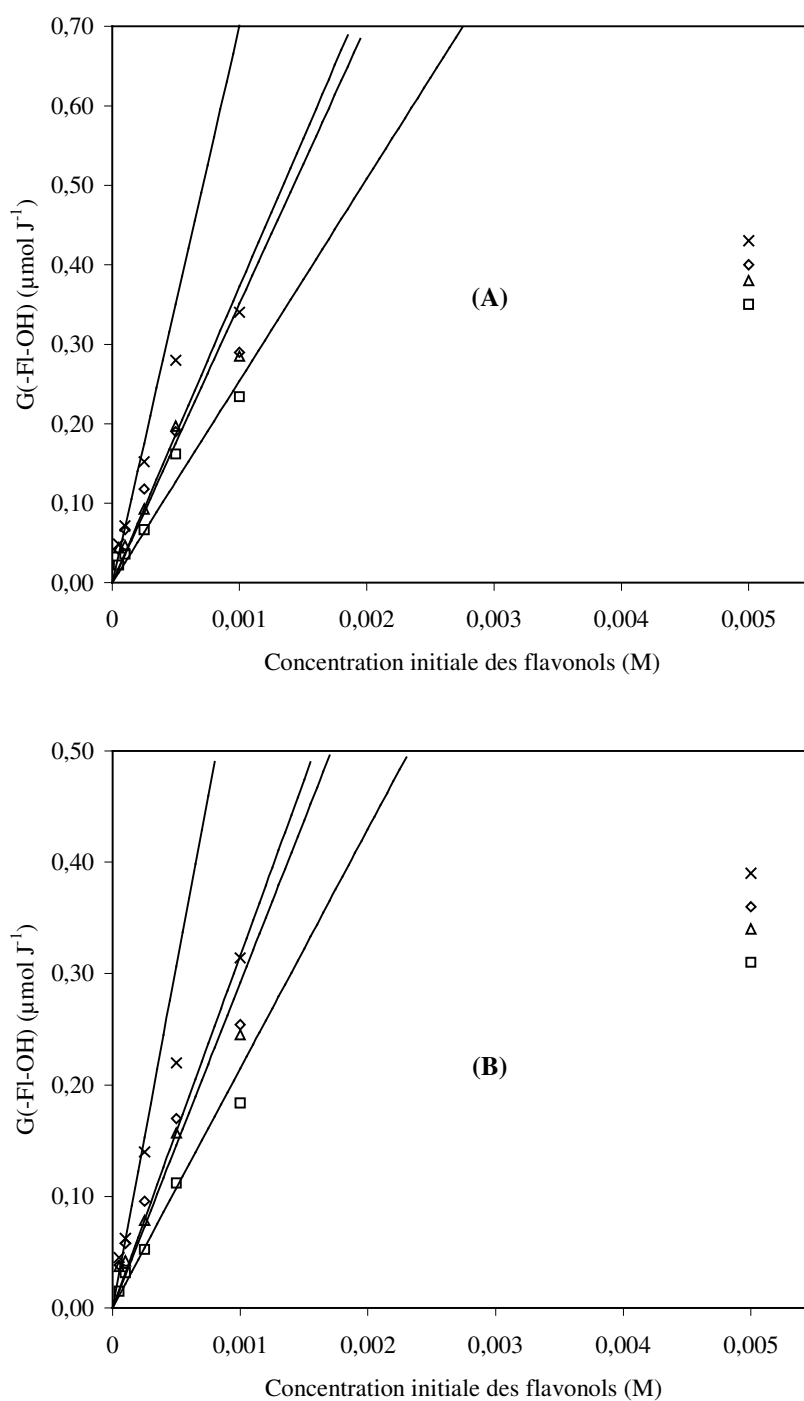


Figure 50 : Rendements de disparition des flavonols en fonction de leurs concentrations initiales. Les points représentent les valeurs expérimentales (x: quercétine, ◇: kaempférol, Δ: morine et □: galangine), et les droites représentent les rendements théoriques donnés par l'équation (éq. 30). **(A)** : radiolyse dans le méthanol, et **(B)** : radiolyse dans l'éthanol.

Nous observons que pour des concentrations inférieures à 10^{-4} M, les valeurs expérimentales de G(-Fl-OH) augmentent linéairement avec [Fl-OH]. Pour des concentrations supérieures, G(-Fl-OH) atteint un plateau.

En comparaison avec l'équation (éq. 30) dans laquelle les rendements de disparition des flavonols sont des droites de pentes $\frac{k_{55}}{a_s I} \sqrt{\frac{a_s I G_{tot}}{2k_{54}}}$, nous constatons que ces formules théoriques ne sont valables que si $[Fl-OH] \leq 10^{-4}$ M. Dans cette gamme de concentrations, les pentes sont alors calculées par régression linéaire, ce qui permet de déterminer les constantes de vitesse k_{55} pour les différents flavonols étudiés (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Constantes de vitesse de réaction des flavonols avec HMR et HER calculées, pour les faibles concentrations des flavonols, à partir de l'équation (éq. 30) et de la **Figure 50**.

Flavonols	$k_{55}(\text{flavonol-HMR})$	$k_{55}(\text{flavonol-HER})$
quercétine	$6,2 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
kaempférol	$4,7 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
morine	$4,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
galangine	$2,4 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$

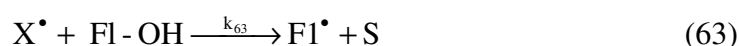
En conclusion, le mécanisme proposé **Figure 46** (page 133) et qui aboutit à l'expression du rendement donné par (éq. 30) ne permet pas de décrire la transformation des flavonols en depsides aux fortes concentrations. Pour décrire le phénomène dans cette gamme de concentrations, nous pouvons supposer que les flavonols réagissent avec les espèces radicalaires qui aboutissent à la formation de HMR ou HER, notamment X^\bullet (CH_3O^\bullet ou $CH_3CH_2O^\bullet$). En effet, nous avons vu au chapitre IV que, si sa concentration est élevée, le soluté peut intervenir dans l'étape diffusionnelle. Deux hypothèses sont alors envisageables :

1^{ère} hypothèse : L'oxygène participe toujours aux réactions de dégradation des flavonols.

2^{ème} hypothèse : La probabilité de l'oxygène, à intervenir dans les étapes intermédiaires du mécanisme de transformation des flavonols en depsides, diminue aux fortes concentrations.

VI.2. LA TRANSFORMATION FLAVONOLS-DEPSIDES : LE MECANISME CORRIGE (CALCUL DES VITESSES DE REACTION)

1^{ère} hypothèse : En supposant qu'un flavonol peut réagir avec un radical X^\bullet , on doit simplement ajouter, dans le schéma cinétique précédent, la réaction suivante :



L'équation (éq. 29) devient :

$$a_s \text{IG}(-\text{Fl-OH}) = k_{55} [\text{Fl-OH}] [\text{R}^\bullet] + k_{63} [\text{Fl-OH}] [X^\bullet] \quad (\text{éq. 31})$$

L'application du principe des états stationnaires sur X^\bullet et Fl^\bullet conduit respectivement à :

$$\frac{d[X^\bullet]}{dt} = a_s \text{IG}(X^\bullet) - v_{53} - v_{60} - v_{63} = 0 \quad (\text{éq. 32})$$

$$\frac{d[\text{Fl}^\bullet]}{dt} = v_{55} + v_{63} - v_{56} = 0 \quad (\text{éq. 33})$$

A partir de (éq. 32), nous obtenons :

$$[X^\bullet] = \frac{a_s \text{IG}(X^\bullet) - v_{60}}{k_{53}[\text{S}] + k_{63}[\text{Fl-OH}]} \quad (\text{éq. 34})$$

On a $v_{60} = a_s \text{IG}(\text{D1})$, ce qui donne :

$$[X^\bullet] = \frac{a_s \text{I}(\text{G}(X^\bullet) - \text{G}(\text{D1}))}{k_{53}[\text{S}] + k_{63}[\text{Fl-OH}]} \quad (\text{éq. 35})$$

Insérons (éq. 28) et (éq. 35) dans (éq. 31), on obtient :

$$\text{G}(-\text{Fl-OH}) = \frac{k_{55}}{a_s \text{I}} \sqrt{\frac{a_s \text{IG}_{\text{tot}}}{2k_{54}}} [\text{Fl-OH}] + k_{63} \frac{(\text{G}(X^\bullet) - \text{G}(\text{D1}))}{k_{53}[\text{S}] + k_{63}[\text{Fl-OH}]} [\text{Fl-OH}] \quad (\text{éq. 36})$$

Nous calculons maintenant les constantes de vitesse k_{55} et k_{63} .

Sur la **Figure 51**, nous avons reporté l'évolution du rendement expérimental de chaque produit de radiolyse (D1) en fonction de la concentration initiale du flavonol à partir duquel il se forme. Nous avons obtenu les équations suivantes :

$$\frac{1}{G(D1)} = \alpha_s + \beta_s \frac{1}{[Fl - OH]} \quad (\text{éq. 37})$$

Cette équation peut également s'écrire sous la forme :

$$G(D1) = \frac{b_s [Fl - OH]}{c_s + [Fl - OH]}, \quad (\text{éq. 38})$$

avec $b_s = \frac{1}{\alpha_s}$ et $c_s = \frac{\beta_s}{\alpha_s}$.

En introduisant (éq. 38) dans (éq. 36), nous obtenons :

$$G(-Fl - OH) = \frac{k_{55}}{a_s I} \sqrt{\frac{a_s I G_{\text{tot}}}{2k_{54}} [Fl - OH]} + k_{63} \frac{c_s G(X^\bullet) + (G(X^\bullet) - b_s) [Fl - OH]}{(k_{53}[S] + k_{63}[Fl - OH])(c_s + [Fl - OH])} [Fl - OH] \quad (\text{éq. 39})$$

L'évolution expérimentale du rendement de disparition des flavonols (**Figure 52**), est alors modélisée par l'équation suivante :

$$G(-Fl - OH) = \frac{p_1 [Fl - OH] + p_2 [Fl - OH]^2 + p_3 [Fl - OH]^3}{1 + q_1 [Fl - OH] + q_2 [Fl - OH]^2} \quad (\text{éq. 40})$$

Les paramètres b_s , c_s , p_1 , p_2 , p_3 , q_1 et q_2 des deux modélisations (éq. 38 et 40) sont répertoriés dans le **Tableau 17**.

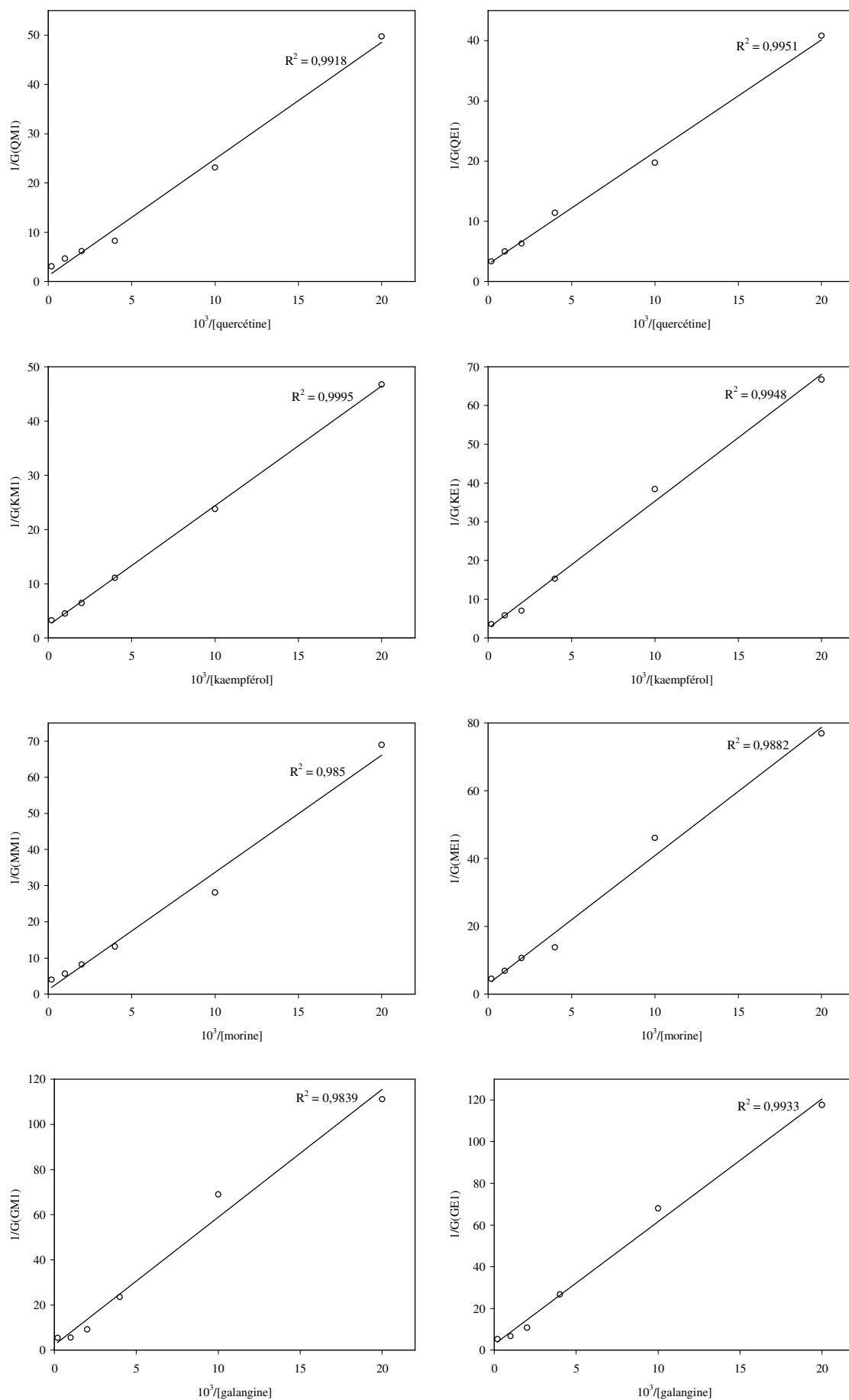


Figure 51 : Evolution du rendement radiolytique de chaque produit de radiolyse en fonction de la concentration du flavonol à partir duquel il se forme.

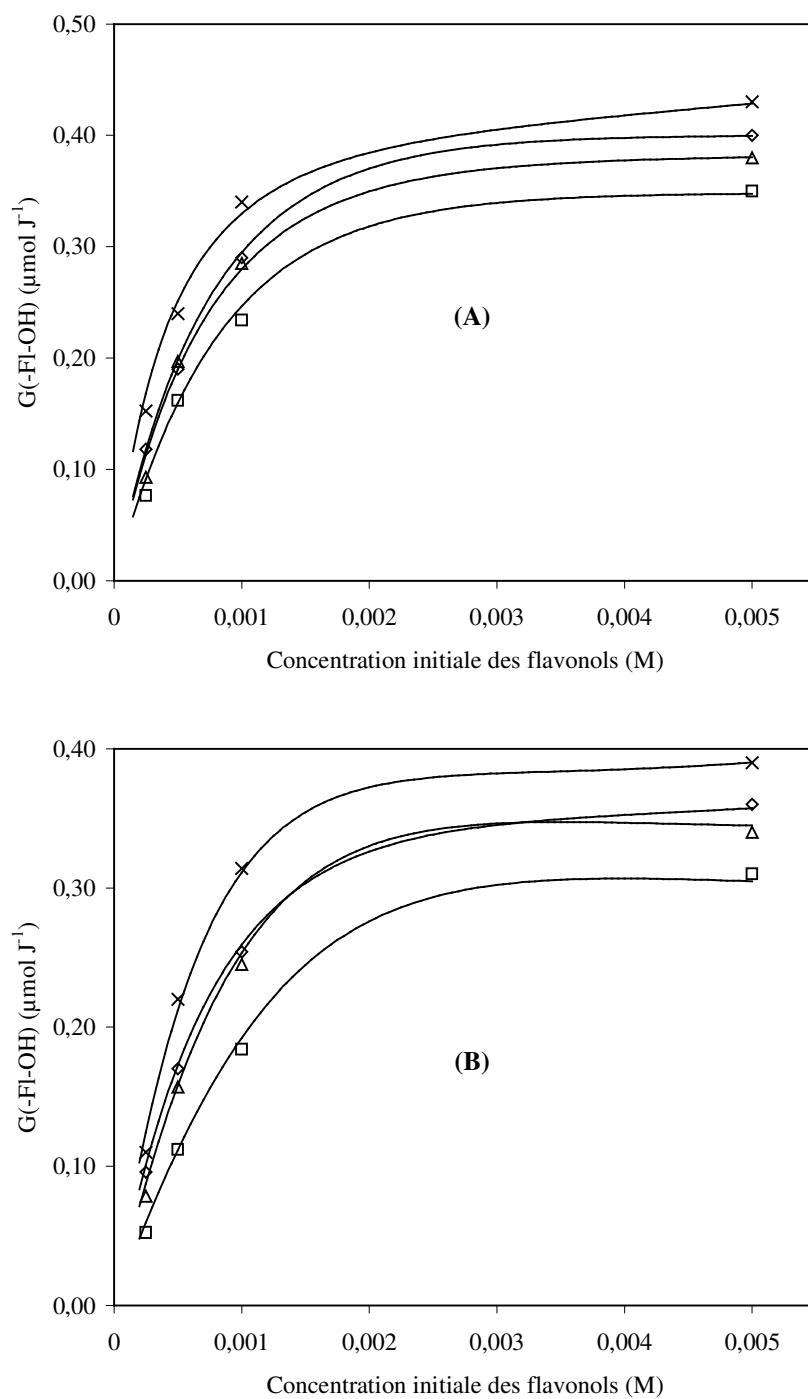


Figure 52 : Rendements de disparition des flavonols en fonction de leurs concentrations initiales. Les points représentent les valeurs expérimentales (x: quercétine, \diamond : kaempférol, Δ : morine et \square : galangine), et les courbes représentent les équations empiriques (éq. 40). (A) : radiolyse dans le méthanol, et (B) : radiolyse dans l'éthanol.

Tableau 17 : Les différents paramètres des équations empiriques (éq. 38) et (éq. 40).

Solvant	Paramètres	Flavonols			
		quercétine	kaempférol	morine	galangine
Méthanol	p ₁	9,81 x 10 ²	5,65 x 10 ²	5,43 x 10 ²	4,16 x 10 ²
	p ₂	1,28 x 10 ⁵	4,94 x 10 ⁴	8,82 x 10 ⁴	7,73 x 10 ⁴
	p ₃	9,00 x 10 ⁶	2,90 x 10 ⁶	2,41 x 10 ⁶	1,92 x 10 ⁶
	q ₁	2,04 x 10 ³	8,66 x 10 ²	9,51 x 10 ²	6,95 x 10 ²
	q ₂	4,10 x 10 ⁵	2,43 x 10 ⁵	3,21 x 10 ⁵	3,52 x 10 ⁵
	c _s	6,49 x 10 ⁻⁴	6,88 x 10 ⁻⁴	7,76 x 10 ⁻⁴	5,46 x 10 ⁻⁴
	b _s	1,71 x 10 ⁻¹	1,53 x 10 ⁻¹	1,62 x 10 ⁻¹	1,28 x 10 ⁻¹
	Ethanol	p ₁	5,82 x 10 ²	4,74 x 10 ²	3,81 x 10 ²
p ₂		4,75 x 10 ⁴	4,87 x 10 ⁴	3,52 x 10 ⁴	1,08 x 10 ⁴
p ₃		1,02 x 10 ⁷	4,66 x 10 ⁶	3,54 x 10 ⁶	1,75 x 10 ⁶
q ₁		6,79 x 10 ²	7,61 x 10 ²	4,04 x 10 ²	2,22 x 10 ²
q ₂		3,72 x 10 ⁵	2,75 x 10 ⁵	2,53 x 10 ⁵	1,63 x 10 ⁵
c _s		5,67 x 10 ⁻⁴	1,07 x 10 ⁻³	7,32 x 10 ⁻⁴	1,27 x 10 ⁻³
b _s		1,32 x 10 ⁻¹	1,19 x 10 ⁻¹	1,25 x 10 ⁻¹	1,12 x 10 ⁻¹

En identifiant (éq.39 et éq. 40), quelque soit la concentration du flavonol étudié, les différents paramètres doivent vérifier les relations suivantes :

$$k_{55} = \frac{p_3}{q_2} \frac{a_s I}{\sqrt{\frac{a_s I G_{tot}}{2k_{54}}}} \quad (\text{éq. 41})$$

$$k_{63} = \frac{k_{53}[S]}{G(X^{\bullet})} \left(p_1 - \frac{k_{55}}{a_s I} \sqrt{\frac{a_s I G_{tot}}{2k_{54}}} \right) \quad (\text{éq. 42})$$

Les valeurs de k₅₅ et k₆₃ sont données dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : Constantes de vitesse de réaction des flavonols avec HMR, HER, $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ calculées, pour les fortes concentrations des flavonols, à partir des équations (éq. 41) et (éq. 42).

Flavonols	Méthanol	
	$k_{55}(\text{flavonol-HMR}) (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{63}(\text{flavonol-CH}_3\text{O}^\bullet) (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
quercétine	$4,4 \times 10^2$	$1,7 \times 10^{10}$
kaempférol	$2,3 \times 10^2$	$9,6 \times 10^9$
morine	$1,7 \times 10^2$	$9,3 \times 10^9$
galangine	$1,1 \times 10^2$	$7,1 \times 10^9$
Flavonols	Ethanol	
	$k_{55}(\text{flavonol-HER}) (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{63}(\text{flavonol-CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet) (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
quercétine	$3,8 \times 10^2$	$4,1 \times 10^{10}$
kaempférol	$2,3 \times 10^2$	$3,3 \times 10^{10}$
morine	$1,9 \times 10^2$	$2,7 \times 10^{10}$
galangine	$1,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^{10}$

Pour comparer avec les résultats obtenus expérimentalement, nous avons tracé, à titre d'exemple, l'ensemble des points expérimentaux du rendement de disparition de la quercétine pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M (**Figure 53**). Nous avons également tracé la courbe représentative de l'équation théorique (éq. 39) avec les deux termes qui la composent et qui représentent respectivement la contribution du radical R^\bullet et du radical X^\bullet .

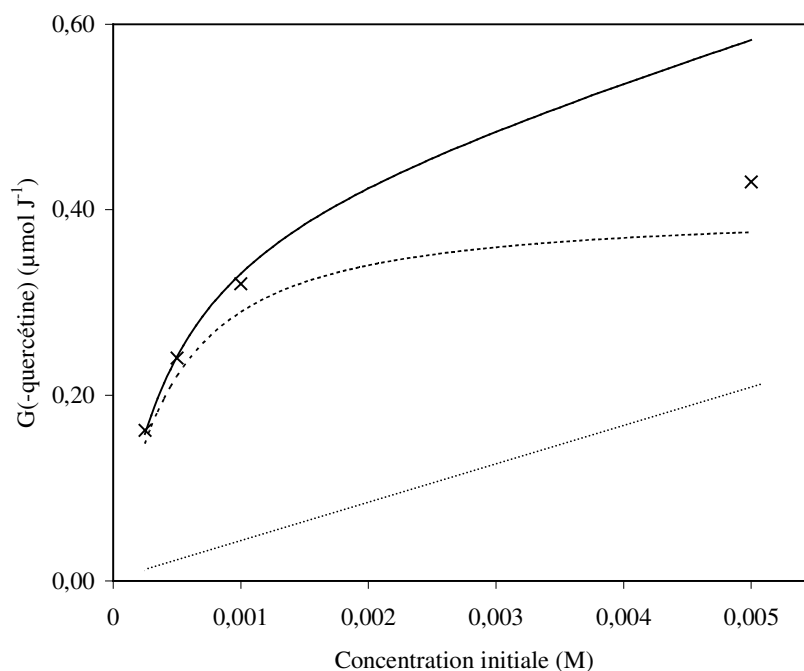


Figure 53 : Rendement de disparition de la quercétine pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M. Les points sont les valeurs expérimentales. La courbe en trait plein représente l'équation théorique (éq. 39), en tiret le terme R^\bullet et en pointillés le terme X^\bullet . Solvant : méthanol.

2^{ème} hypothèse : Dans le mécanisme proposé pour la transformation des flavonols en depsides (**Figure 46**), le radical $F1^\bullet$ se transforme en radical peroxy par l'addition de l'oxygène moléculaire (étape 3). En l'absence de celui-ci, cette étape peut être remplacée par une réaction de recombinaison radicalaire entre $F1^\bullet$ et X^\bullet (CH_3O^\bullet ou $CH_3CH_2O^\bullet$). Pour les fortes concentrations, on pourrait alors proposer le mécanisme illustré sur la **Figure 54**.

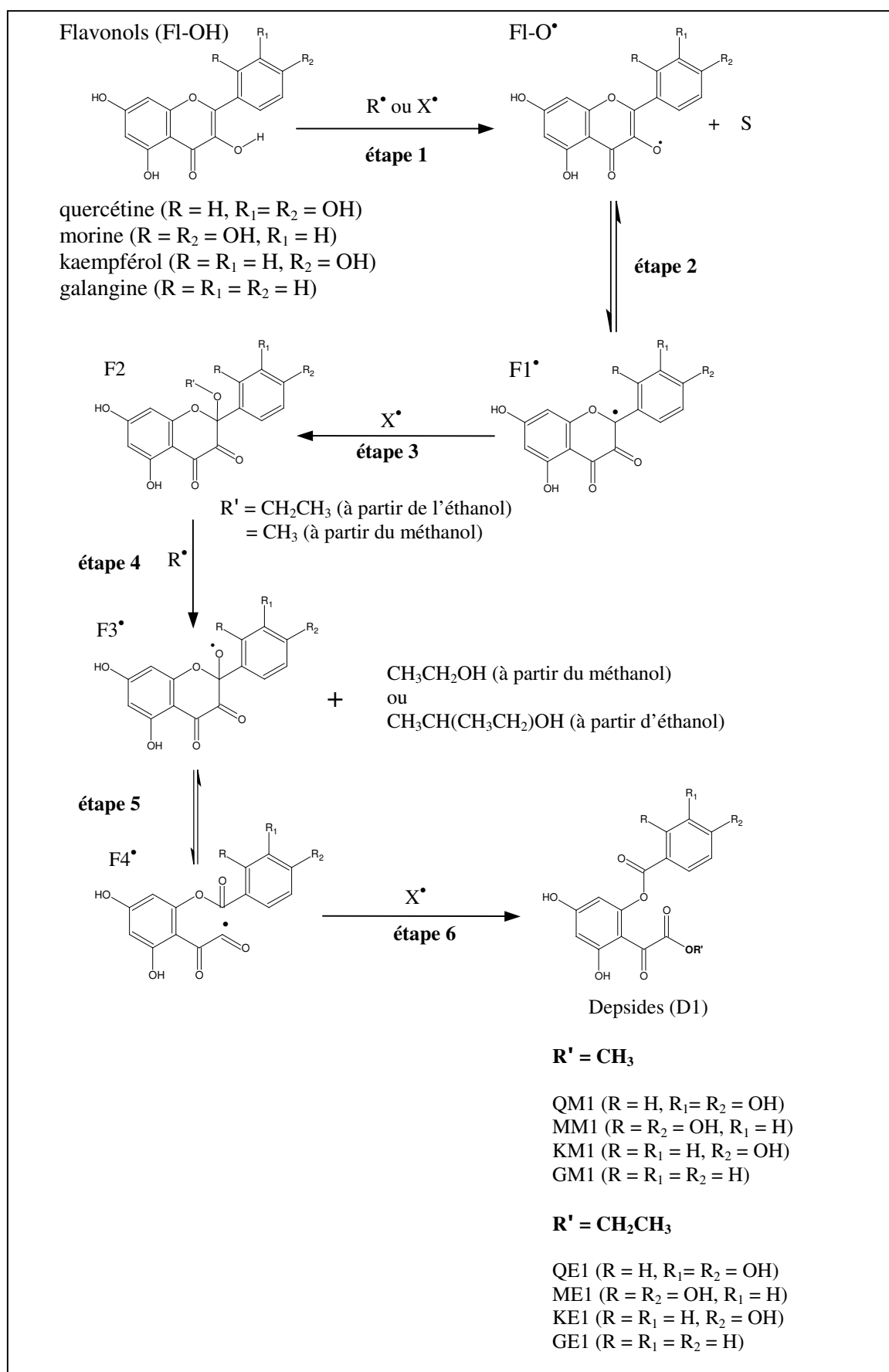
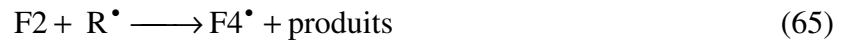


Figure 54 : Mécanisme réactionnel proposé pour la transformation des flavonols depsides. [Fl-OH] ≥ 5 × 10⁻⁴ M et solutions non désaérées. R[•] représente HMR ou HER et X[•] représente CH₃O[•] ou CH₂CH₃O[•]. S est le solvant, méthanol ou éthanol.

A partir de la **Figure 54**, nous proposons le schéma cinétique suivant :



Dans ce schéma cinétique, Fl-OH représente les flavonols (quercétine, morine, kaempférol ou galangine). S est le solvant (méthanol ou éthanol). R^\bullet est $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{CH}_3\cdot\text{CHOH}$. X^\bullet est $\text{CH}_3\text{O}\cdot$ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}\cdot$. Fl-O \cdot , F1 \cdot , F2 et F4 \cdot sont les intermédiaires de la **Figure 54**. D1 représente les depsides majoritaires (QM1, MM1, KM1, GM1, QE1, ME1, KE1 et GE1).

En utilisant les procédures détaillées pour le schéma cinétique précédent, nous déterminons $[R^\bullet]$ et $[X^\bullet]$:

$$[R^\bullet] = \sqrt{\frac{a_s I}{2k_{54}} (G_{\text{tot}} - 4G(D1))} \quad (\text{éq. 43})$$

$$[X^\bullet] = \frac{a_s I (G(X^\bullet) - 2G(D1))}{k_{53}[S] + k_{63}[\text{Fl-OH}]} \quad (\text{éq. 44})$$

En introduisant ces deux équations et (éq. 38) dans (éq. 31), on obtient :

$$G(-\text{Fl-OH}) = \frac{k_{55}}{a_s I} \sqrt{\frac{a_s I}{2k_{54}} \frac{c_s G_{\text{tot}} + (G_{\text{tot}} - 4b_s)[\text{Fl-OH}]}{c_s + [\text{Fl-OH}]}} [\text{Fl-OH}] + k_{63} \frac{c_s G(X^\bullet) + (G(X^\bullet) - 2b_s)[\text{Fl-OH}]}{(k_{53}[S] + k_{63}[\text{Fl-OH}])(c_s + [\text{Fl-OH}])} [\text{Fl-OH}] \quad (\text{éq. 45})$$

Sur la **Figure 55**, nous avons tracé, l'ensemble des points expérimentaux G(-quercétine), et les différents termes de l'équation (éq. 45).

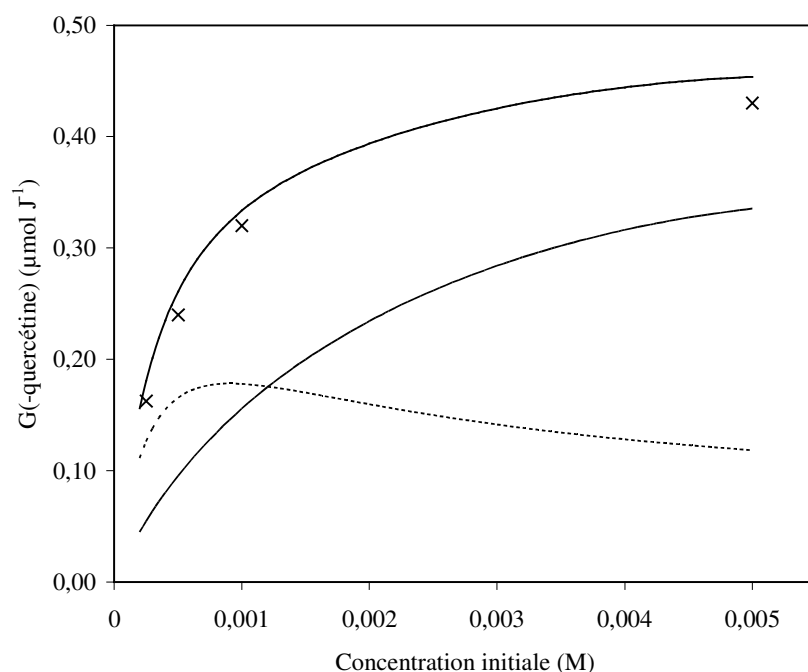


Figure 55 : Rendement de disparition de la quercétine pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M. Les points sont les valeurs expérimentales. Les courbes en tirés et en pointillés et représentent respectivement le premier et deuxième termes de l'équation théorique (éq. 45). La courbe en trait plein est la somme des deux termes. Solvant : méthanol.

Pour les deux hypothèses, nous observons que le processus de dégradation, pour la gamme de concentrations [10^{-4} M – 10^{-3} M], ne peut être décrit que par la somme des deux termes des expressions (éq. 39) et (éq. 45) (**Figures 53 et 55**). Dans ce cas, les deux radicaux HMR/CH₃O• ou HER/CH₃CH₂O• contribuent à la dégradation des flavonols. Pour les très fortes concentrations ($> 10^{-3}$ M), on constate que les modèles ne décrivent plus les points expérimentaux (**Figures 53 et 55**). Le résultat serait plus satisfaisant si l'on ne prend en compte que la contribution de X•.

Pour résumer, il semble que l'on puisse distinguer trois zones qui correspondent chacune à un mécanisme (**Figure 56**).

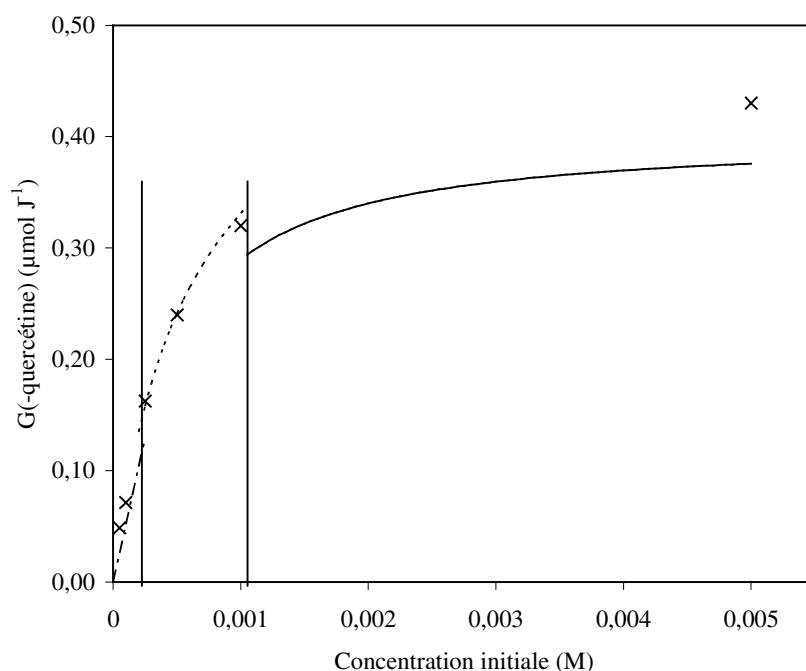


Figure 56 : Rendement de disparition de la quercétine. Les points sont les valeurs expérimentales. La courbe en tiret représente la contribution de R^\bullet (éq. 30). La courbe en pointillés correspond à la participation de R^\bullet et X^\bullet (éq. 39), et la courbe en trait plein représente la contribution de X^\bullet (éq. 39, deuxième terme). Solvant : méthanol.

Une première zone, pour les concentrations inférieures à 10^{-4} M et pour laquelle HMR et HER sont les radicaux responsables de la dégradation des flavonols. Dans ce mécanisme l'oxygène moléculaire doit jouer un rôle primordial dans l'ouverture du cycle. Ensuite, il y a une zone intermédiaire, pour les concentrations comprises entre 10^{-4} M et 10^{-3} M, où l'on « rentre » dans l'étape diffusionnelle et donc où le flavonol commence à réagir avec CH_3O^\bullet ou $CH_3CH_2O^\bullet$. Finalement, pour les concentrations supérieures à 10^{-3} M, les mécanismes que nous avons proposés semblent montrer que la participation de HMR/HER devient négligeable. Dans cette zone (**Figures 53 et 55**) on constate même que les modèles prenant en compte X^\bullet seulement, sous-estiment la valeur du rendement de disparition des flavonols. On peut supposer, alors, que des espèces radicalaires tels que H^\bullet et e_s^- participent en plus et de façon non négligeable à la dégradation des flavonols.

Afin de mieux définir le mécanisme réactionnel permettant d'expliquer la transformation des flavonols en depsides, il conviendra d'effectuer la radiolyse des molécules dans des solutions désaérées d'une part, et dans des solutions saturées en oxygène d'autre part.

VI.2. STRUCTURE – ACTIVITE DES FLAVONOÏDES VIS-A-VIS HMR ET HER

Afin d'établir la relation entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux HMR et HER, nous avons utilisé les constantes de réaction (k_{55}) (**Tableau 16**) comme indicateur de l'activité antioxydante. Il est à noter que plus la valeur de k_{55} est élevée, plus l'activité de la molécule est importante.

La galangine, sans aucun groupe hydroxyle sur le cycle B, est le flavonol le moins actif sur les deux radicaux : $k_{55}(\text{galangine-HMR} = 2,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ et $k_{55}(\text{galangine-HER} = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$. L'addition d'un groupement hydroxyle en position 4' a pour effet d'augmenter significativement l'activité d'inhibition. C'est le cas du kaempférol possédant des constantes vitesse de réaction deux fois supérieures à celles de la galangine : $k_{55}(\text{kaempférol-HMR} = 4,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ et $k_{55}(\text{kaempférol-HER} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$. L'addition d'un deuxième groupe hydroxyle en position 2' semble n'avoir aucune influence sur la capacité de piégeage, puisque la morine (2',4'-OH) a montré une activité presque similaire à celle du kaempférol : $k_{55}(\text{morine-HMR} = 4,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ et $k_{55}(\text{morine-HER} = 2,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$. En revanche, la présence d'un groupe catéchol sur le cycle B (3', 4'-OH) augmente significativement l'activité antioxydante. C'est le cas de la quercétine, la plus active des flavonols : $k_{55}(\text{quercétine-HMR} = 6,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ et $k_{55}(\text{quercétine-HER} = 4,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$.

Ces résultats sont en accord avec les relations structure-activité reportées pour les flavonoïdes comme piègeurs de radicaux superoxyde (*Jovanovic, 1994 ; Rice-Evens, 1996 ; Cotelle, 1996 ; Cos, 1998*). Par exemple, Jovanovic et ses collaborateurs ont reporté que la réactivité des flavonoïdes avec ces radicaux dépend de leurs propriétés redox. La constante de vitesse de réaction la plus élevée est obtenue pour la quercétine ($k(\text{quercétine-O}_2^{\bullet}) = 4,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), alors que la valeur la plus faible est obtenue pour la galangine ($k = 8,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) sans aucun groupement hydroxyle sur le cycle B (**Tableau 19**). Le kaempférol est également moins actif que la quercétine. La morine, avec un cycle B dihydroxylé en positions 2' et 4',

est aussi moins actif que la quercétine. Ceci démontre l'importance du groupe catéchol sur le cycle B (3', 4'-OH) de la quercétine.

Tableau 19 : Constantes de vitesse de réaction entre les flavonoïdes et le radical superoxyde, d'après (Jovanovic, 1994).

Flavonoïdes (Fl-OH)	$k(\text{Fl-OH} + \text{O}_2^{\cdot-})$
quercétine	$4,7 \times 10^4$
rutine	$5,1 \times 10^4$
catéchine	$1,8 \times 10^4$
hespéritine	$5,9 \times 10^3$
kaempférol	$2,4 \times 10^3$
morine	$1,6 \times 10^3$
galangine	$8,8 \times 10^2$

La rutine, où l'hydrogène du groupement 3-OH est remplacé par un sucre, montre une activité égale à celle de la quercétine (**Tableau 19**), ce qui indique que le groupement 3-OH n'a aucune influence sur cette activité. Les auteurs supposent que le site d'attaque préférentiel des radicaux superoxydes sur les flavonoïdes est le cycle B. Ceci est confirmé puisque, en dépit de l'absence de la double liaison C2-C3 et de la fonction 4-oxo, la catéchine, grâce à la structure catéchol de son cycle B, est plus active que le kaempférol (4'-OH) et la morine (2', 4'-OH) (**Tableau 19**). La flavanone hespéritine (3'-OH, 4'-OCH₃) a également montré une activité plus élevée que celle de la morine et du kaempférol (**Tableau 19**).

Les résultats enregistrés à partir de cette étude ont permis à Jovanovic et ses collaborateurs de proposer le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ces radicaux oxygénés (**Figure 57**). Ces réactions conduisent à la formation du peroxyde d'hydrogène et des radicaux flavonoxy. On déduit que l'inhibition des radicaux superoxydes par les flavonoïdes, se fait par un transfert d'électron et également par un transfert de proton.

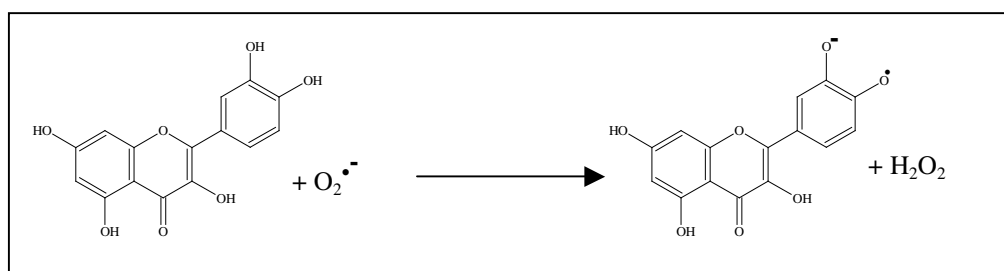


Figure 57 : Mécanisme proposé pour l'inhibition du radical superoxyde par les flavonoïdes. D'après (Jovanovic, 1994).

Nous avons observé que les flavanones (absence de 3-OH et de la double liaison C2-C3), les flavones (absence de 3-OH) et les dihydroflavonols (absence de la double liaison C2-C3) ne sont pas capables de piéger HMR et HER, deux radicaux carbonés,. Cette différence d'activité est due à la nature de ces radicaux, et peut être expliquée par le fait que la réactivité des flavonoïdes est stéréospécifiquement différente avec les radicaux carbonés et avec les radicaux oxygénés (réaction au niveau de 3-OH puis impliquant la double liaison C2-C3 dans un cas et au niveau du cycle B dans l'autre cas).

Comme nous l'avons mentionné au chapitre I, la SOD est considérée comme la première ligne de défense contre les effets nocifs des radicaux libres oxygénés. Santiard et ses collaborateurs ont démontré que cette enzyme est capable de piéger HER avec une constante de vitesse de réaction : $k(\text{SOD-HER}) = 6,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (*Santiard, 1995*). En comparaison avec nos valeurs : $k_{55}(\text{flavonols-HMR}) = 2,4 \times 10^4 - 6,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et $k_{55}(\text{flavonols-HER}) = 1,7 \times 10^4 - 4,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, nous constatons que les flavonols sont de bons piègeurs de HMR et HER.

CHAPITRE VII

RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS DES MELANGES
EAU/ METHANOL : APPLICATION AU TRAITEMENT DES
ALIMENTS PAR IRRADIATION

RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES DANS DES MELANGES EAU-METHANOL : APPLICATION AU TRAITEMENT DES ALIMENTS PAR IRRADIATION

INTRODUCTION

L'irradiation γ est une technique actuellement très utilisée dans le domaine agro-alimentaire. Elle peut, comme nous l'avons mentionné au préalable, décontaminer les produits alimentaires et prolonger leur durée de conservation en ralentissant le développement des bactéries et des levures, micro-organismes responsables de l'altération des aliments, notamment des fruits et légumes. Ces derniers représentent des sources importantes de composés naturels tels que les vitamines, les acides phénoliques et les flavonoïdes reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine.

L'un des problèmes rencontrés lors du traitement par irradiation est que les aliments peuvent en partie perdre leur qualité nutritionnelle : changements dans la concentration des composés qui constituent l'aliment, ou bien encore modifications des structures chimiques. Par exemple, Graham et Stevensen ont montré que la concentration en vitamine C dans les fraises et les pommes de terre diminue après irradiation (*Graham, 1997*). Oufdejeikh et ses collaborateurs ont également rapporté que les concentrations en polyphénols, y compris en flavonols, diminuent lorsque les clémentines sont exposées au rayonnement γ (*Oufdejeikh, 2000*). Des résultats similaires ont récemment été obtenus pour les acides phénoliques et les flavonoïdes présents dans les fraises (*Breitfellner, 2002 ; Breitfellner, 2003*). La concentration en acide 4-hydroxybenzoïque semble augmenter linéairement avec la dose d'irradiation, alors que les concentrations en (-)-épicatéchine et en kaempférol-3-O-glucoside diminuent.

Quoique ces investigations aient montré l'effet négatif de l'irradiation sur la teneur en flavonoïdes dans les fruits, la compréhension des réactions chimiques produites durant le processus d'irradiation des aliments reste encore une énigme. L'étude de la radiolyse des flavonoïdes dans des mélanges eau/méthanol que nous aborderons dans cette partie du manuscrit servira à appréhender un tel phénomène.

I. IRRADIATION DES FLAVONOÏDES DANS DES MÉLANGES EAU/MÉTHANOL

Nous avons montré dans le chapitre précédent que durant la radiolyse des flavonoïdes dans le méthanol, les flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine) sont transformés majoritairement en QM1, MM1, KM1 et GM1, respectivement, ainsi qu'en d'autres produits minoritaires parmi lesquels nous avons identifiés QM2, MM2, KM2 et GM2.

Pour se rapprocher des conditions physiologiques existant dans les fruits et légumes, nous avons introduit l'eau dans le milieu d'irradiation. Les flavonols sont alors irradiés avec différentes doses (0,2 – 20 kGy) dans des mélanges eau/méthanol avec des proportions : 10/90, 15/85, 20/80 et 25/75 (seuil de solubilité). Pour chaque mélange, l'étude est effectuée sur quatre concentrations (5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M et 5×10^{-3} M).

Les **Figures 58a, 58b, 58c et 58d** illustrent les chromatogrammes CLHP de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine (5×10^{-3} M) irradiés dans les différentes solutions eau/méthanol (10/90, 15/85, 20/80 et 25/75) à une dose de 14 kGy.

Nous observons que les chromatogrammes obtenus sont similaires à ceux obtenus dans les solutions contenant 100% de méthanol. Sur ces chromatogrammes nous retrouvons en effet les produits QM1, MM1, KM1, GM1, QM2, MM2, KM2 et GM2. La surface du pic CLHP correspondant à chacun de ces composés varie en fonction de la quantité d'eau présente dans le milieu d'irradiation. Pour étudier l'effet de l'eau sur la dégradation des flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine), nous avons calculé leurs rendements radiolytiques ainsi que ceux des produits de dégradation (QM1, QM2, MM1, MM2, KM1, KM2, GM1 et GM2) (**Tableaux 20a, 20b, 20c et 20d**).

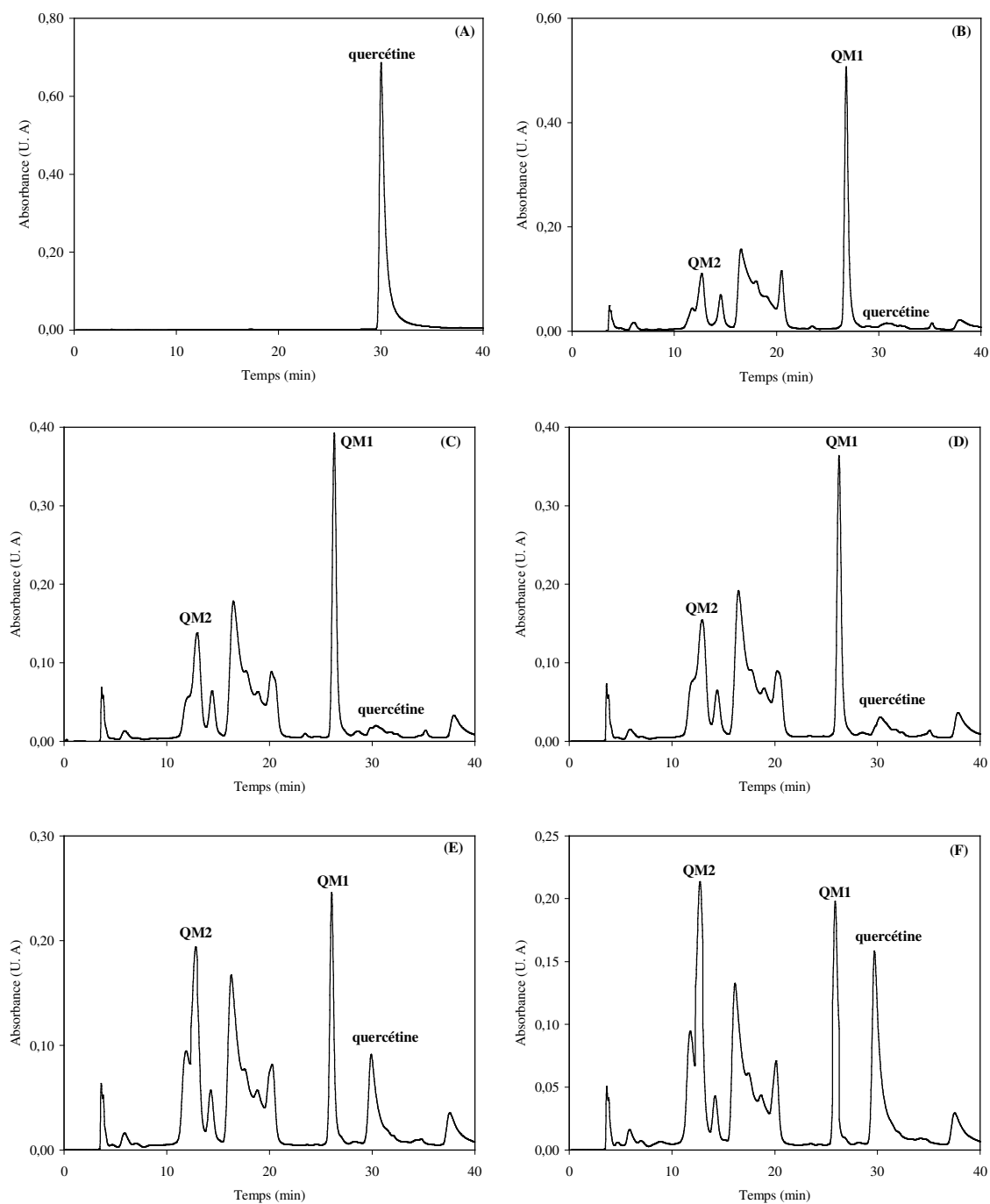


Figure 58a : Chromatogrammes de la quercétine à 5×10^{-3} M, (A) dans le méthanol avant irradiation, et des mélanges eau/méthanol (B) 0/100, (C) 10/90, (D) 15/85, (E) 20/80, (F) 25/75 irradiés à 14 kGy. Le débit de dose est 0,22 Gy/s.

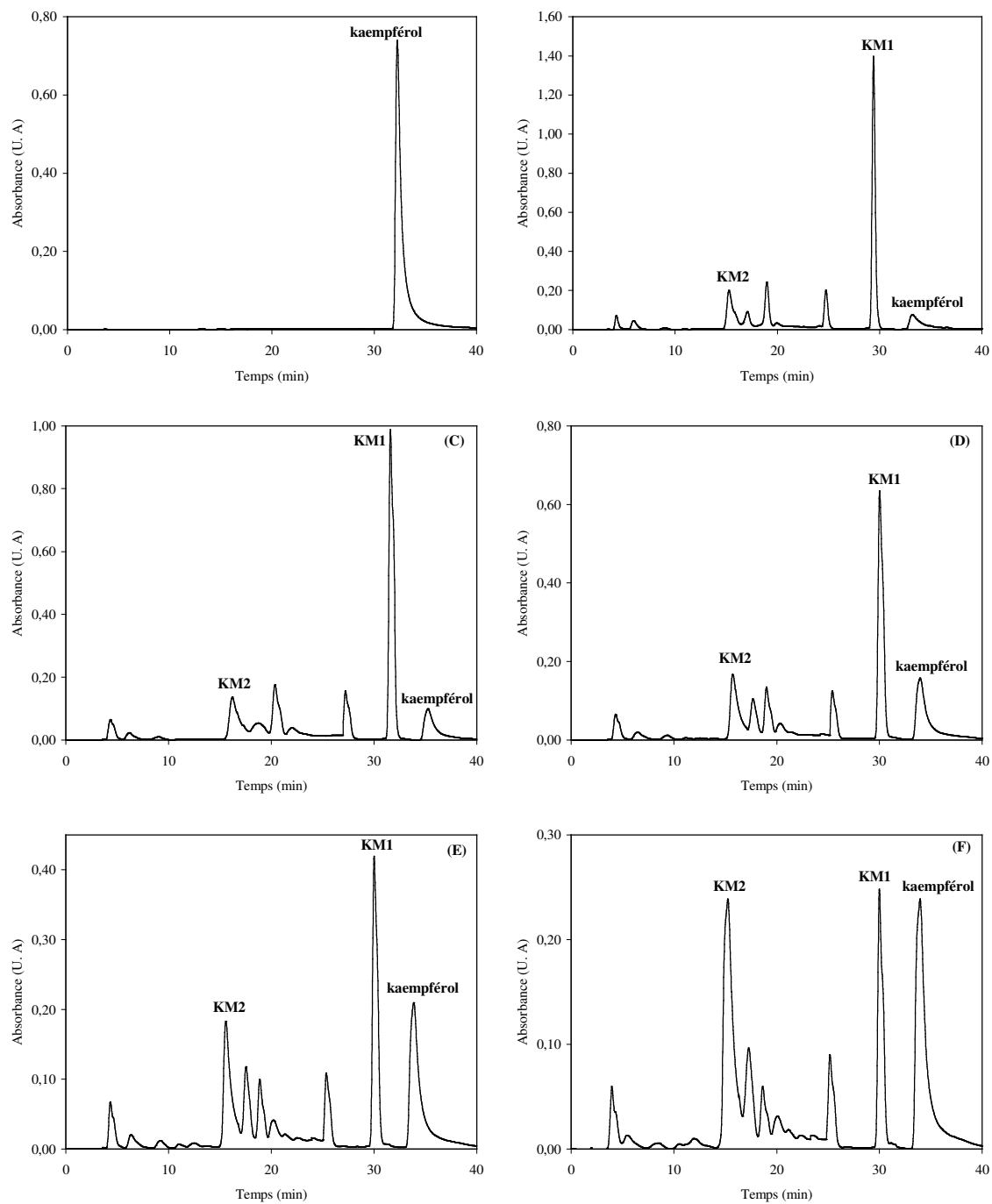


Figure 58b : Chromatogrammes du kaempférol à 5×10^{-3} M, (A) dans le méthanol avant irradiation, et dans des mélanges eau/méthanol (B) 0/100, (C) 10/90, (D) 15/85, (E) 20/80, (F) 25/75 irradiés à 14 kGy. Le débit de dose est 0,22 Gy/s.

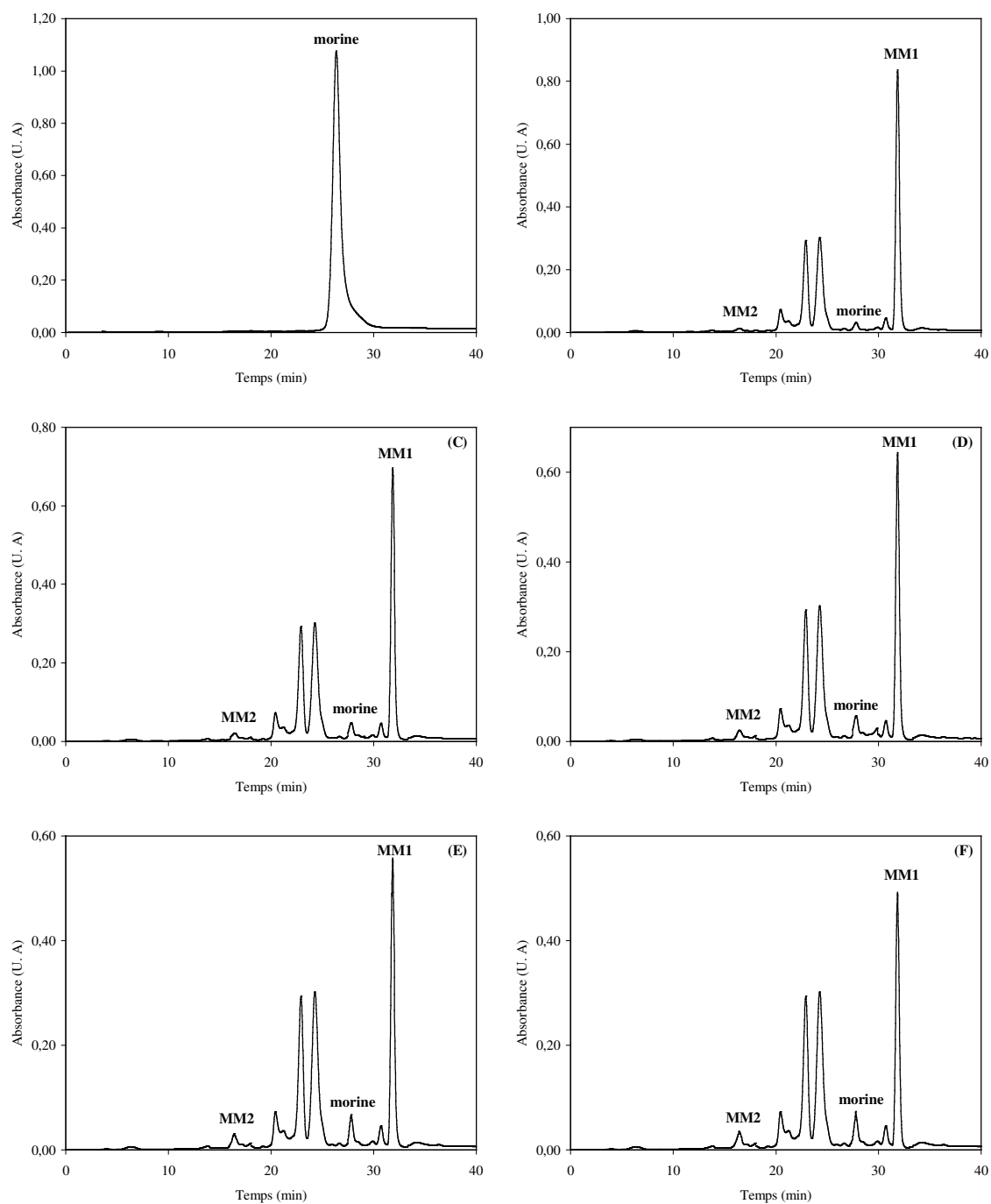


Figure 58c : Chromatogrammes de la morine à 5×10^{-3} M, (A) dans le méthanol avant irradiation, et dans des mélanges eau/méthanol (B) 0/100, (C) 10/90, (D) 15/85, (E) 20/80, (F) 25/75 irradiés à 14 kGy. Le débit de dose est 0,22 Gy/s.

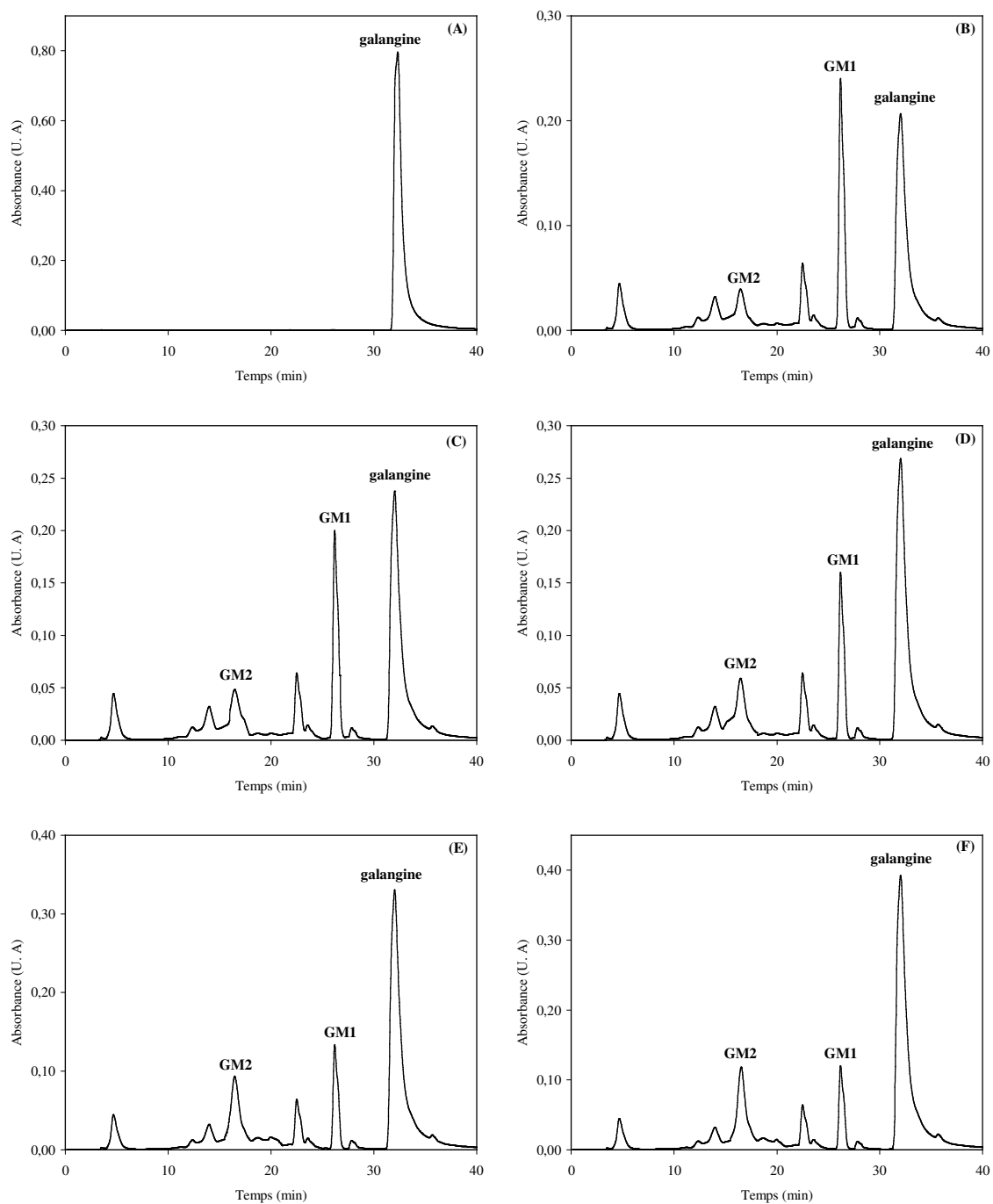


Figure 58d : Chromatogrammes de la galangine à 5×10^{-3} M, (A) dans le méthanol avant irradiation, et dans des mélanges eau/méthanol, (B) 0/100, (C) 10/90, (D) 15/85, (E) 20/80, (F) 25/75 irradiés à 14 kGy. Le débit de dose est 0,22 Gy/s.

Tableau 20 a. Rendement radiolytique de la quercétine et des produits de radiolyse QM1 et QM2 en fonction de la concentration initiale de la quercétine et en fonction des différents pourcentages eau/méthanol utilisés comme milieu d'irradiation.

G($\mu\text{mol J}^{-1}$)	Concentration (M)	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
	Mélanges Eau/Méthanol				
G(-quercétine)	0/100	0,0485	0,0713	0,2410	0,4300
	10/90	0,0422	0,0653	0,2232	0,4214
	15/85	0,0384	0,0578	0,2045	0,4085
	20/80	0,0327	0,0514	0,1776	0,3747
	25/75	0,0245	0,0471	0,1284	0,3378
G(QM1)	0/100	0,0201	0,0432	0,1620	0,3256
	10/90	0,0185	0,0344	0,1346	0,2705
	15/85	0,0138	0,0289	0,1134	0,2279
	20/80	0,0114	0,0227	0,0715	0,1714
	25/75	0,0078	0,0156	0,0547	0,1237
G(QM2)	0/100	0,0017	0,0028	0,0105	0,0315
	10/90	0,0019	0,0031	0,0121	0,0354
	15/85	0,0025	0,0039	0,0163	0,0411
	20/80	0,0031	0,0045	0,0212	0,0511
	25/75	0,0039	0,0073	0,0303	0,0604

Tableau 20 b. Rendement radiolytique du kaempférol et des produits de radiolyse KM1 et KM2 en fonction de la concentration initiale du kaempférol et en fonction des différents pourcentages eau/méthanol utilisés comme milieu d'irradiation (*Marfak, 2003b*).

G($\mu\text{mol J}^{-1}$)	Concentration (M)	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
	Mélanges Eau/Méthanol				
G(-kaempférol)	0/100	0,0416	0,0679	0,1660	0,4070
	10/90	0,0369	0,0611	0,1490	0,3540
	15/85	0,0312	0,0490	0,1310	0,3100
	20/80	0,0270	0,0428	0,1080	0,2530
	25/75	0,0229	0,0370	0,0923	0,2120
G(KM1)	0/100	0,0314	0,0420	0,1550	0,3060
	10/90	0,0220	0,0304	0,1120	0,2170
	15/85	0,0144	0,0193	0,0690	0,1490
	20/80	0,0094	0,0130	0,0465	0,0920
	25/75	0,0063	0,0084	0,0323	0,0640
G(KM2)	0/100	0,0017	0,0028	0,0105	0,0291
	10/90	0,0020	0,0032	0,0131	0,0340
	15/85	0,0022	0,0036	0,0146	0,0372
	20/80	0,0024	0,0038	0,0159	0,0401
	25/75	0,0026	0,0041	0,0197	0,0447

Tableau 20 c. Rendement radiolytique de la morine et des produits de radiolyse MM1 et MM2 en fonction de la concentration initiale de la morine et en fonction des différents pourcentages eau/méthanol utilisés comme milieu d'irradiation.

G($\mu\text{mol J}^{-1}$)	Concentration (M)	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
	Mélanges Eau/Méthanol				
G(-morine)	0/100	0,0339	0,0465	0,1970	0,3800
	10/90	0,0320	0,0434	0,1931	0,3724
	15/85	0,0302	0,0426	0,1862	0,3610
	20/80	0,0284	0,0381	0,1718	0,3511
	25/75	0,0275	0,0344	0,1687	0,3385
G(MM1)	0/100	0,0145	0,0356	0,1220	0,2490
	10/90	0,0138	0,0315	0,1154	0,2288
	15/85	0,0111	0,0298	0,1046	0,2042
	20/80	0,0096	0,0266	0,0953	0,1951
	25/75	0,0075	0,0235	0,0842	0,1755
G(MM2)	0/100	0,0012	0,0019	0,0091	0,0287
	10/90	0,0013	0,0022	0,0105	0,0292
	15/85	0,0017	0,0026	0,0121	0,0324
	20/80	0,0022	0,0031	0,0153	0,0345
	25/75	0,0027	0,0046	0,0202	0,0368

Tableau 20 d. Rendement radiolytique de la galangine et des produits de radiolyse GM1 et GM2 en fonction de la concentration initiale de la galangine et en fonction des différents pourcentages eau/méthanol utilisés comme milieu d'irradiation.

G($\mu\text{mol J}^{-1}$)	Concentration (M)	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
	Mélanges Eau/Méthanol				
G(-galangine)	0/100	0,0219	0,0460	0,1620	0,3500
	10/90	0,0216	0,0412	0,1454	0,3244
	15/85	0,0190	0,0361	0,1278	0,2965
	20/80	0,0134	0,0279	0,1041	0,2417
	25/75	0,0097	0,0186	0,0843	0,1823
G(GM1)	0/100	0,0090	0,0145	0,1090	0,1828
	10/90	0,0083	0,0105	0,0887	0,1596
	15/85	0,0062	0,0086	0,0485	0,1290
	20/80	0,0034	0,0054	0,0265	0,0890
	25/75	0,0014	0,0028	0,0173	0,0382
G(GM2)	0/100	0,0010	0,0017	0,0084	0,0175
	10/90	0,0011	0,0019	0,0098	0,0204
	15/85	0,0012	0,0021	0,0105	0,0223
	20/80	0,0014	0,0023	0,0127	0,0271
	25/75	0,0016	0,0025	0,0159	0,0305

A titre d'exemple, pour la concentration 5×10^{-3} M, nous avons rapporté sur la **Figure 59** l'évolution du rendement radiolytique de chaque flavonol et des produits de radiolyse en fonction du pourcentage d'eau introduite dans le milieu irradié.

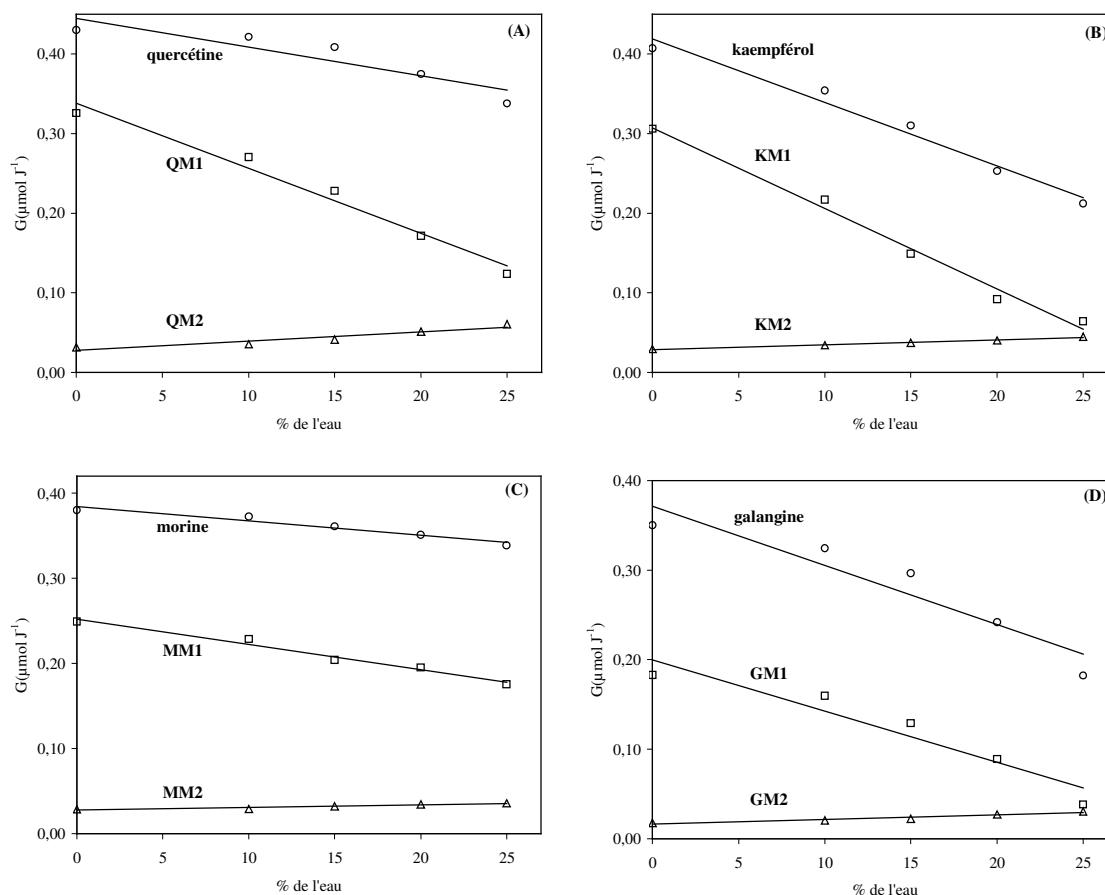


Figure 59 : Variation des rendements radiolytiques des flavonols : quercétine (A), kaempférol (B), morine (C), galangine (D) et leurs produits de dégradation QM1, QM2, MM1, MM2, KM1, KM2, GM1 et GM2 en fonction du pourcentage d'eau présent dans le milieu d'irradiation.

Nous constatons que au fur et à mesure que la quantité d'eau augmente, la consommation des flavonols et la formation des composés QM1, MM1, KM1 et GM1 diminuent. En contrepartie, les rendements de QM2, MM2, KM2 et GM2 augmentent.

Lorsque la radiolyse est effectuée dans un mélange 25/75 (seuil de solubilité des flavonols), les depsides QM2, MM2, KM2 et GM2 sont formés en quantités presque égales à celles des depsides QM1, MM1, KM1 et GM1. L'ensemble de ces résultats démontre que l'eau contribue, en partie, à la formation des depsides QM2, MM2, KM2 et GM2.

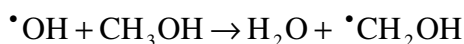
II. CONTRIBUTION DE L'EAU ET DE SES ESPECES RADIOLYTIQUES DANS LA DEGRADATION DES FLAVONOLS

Nous avons démontré que au cours de la radiolyse dans le méthanol, les radicaux HMR réagissent avec les flavonols au niveau du groupement 3-OH. Une telle réaction conduit à l'ouverture du cycle C au niveau de la double liaison C2-C3 et par conséquent à la transformation des flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine) en depsides, produits majoritaires de la dégradation (QM1, MM1, KM1 et GM1, respectivement).

En effectuant la radiolyse dans des mélanges eau/méthanol, nous observons que la formation de QM1, MM1, KM1 et GM1 diminue avec le pourcentage de méthanol. En diminuant le pourcentage de méthanol dans le milieu d'irradiation, la quantité de HMR formée diminue, ce qui limite la transformation des flavonols.

En introduisant l'eau dans le milieu d'irradiation, nous avons montré que les concentrations de QM2, MM2, KM2 et GM2 augmentent en fonction du pourcentage d'eau. Ceci peut être attribué aux réactions chimiques entre les flavonols et les espèces radiolytiques de l'eau. Trois mécanismes sont possibles :

1^{er} cas : La radiolyse simultanée de l'eau et du méthanol conduit à la formation de : e^-_{aq} , $\bullet OH$ (à partir de l'eau), e^-_s , $\bullet CH_2OH$, $CH_3O\bullet$ (à partir du méthanol) et $H\bullet$ (à partir des deux solvants). Puisque le méthanol est un bon piègeur des radicaux $\bullet OH$ (Roux, 1973), la réaction suivante peut avoir lieu :



Si tous les radicaux $\bullet OH$ sont convertis en radicaux HMR, les flavonols réagissent d'abord avec ces derniers et se transforment en depsides selon le mécanisme précédemment décrit (**Figure 46**). La dernière étape de cette transformation est la réaction du radical F14,

- soit avec $CH_3O\bullet$ pour former QM1, MM1, KM1 et GM1 (formation d'un groupe ester lié à C8,
- soit avec $\bullet OH$ pour former QM2, MM2, KM2 et GM2 (formation d'un groupe acide en C8) (**Figure 60, voie 1**).

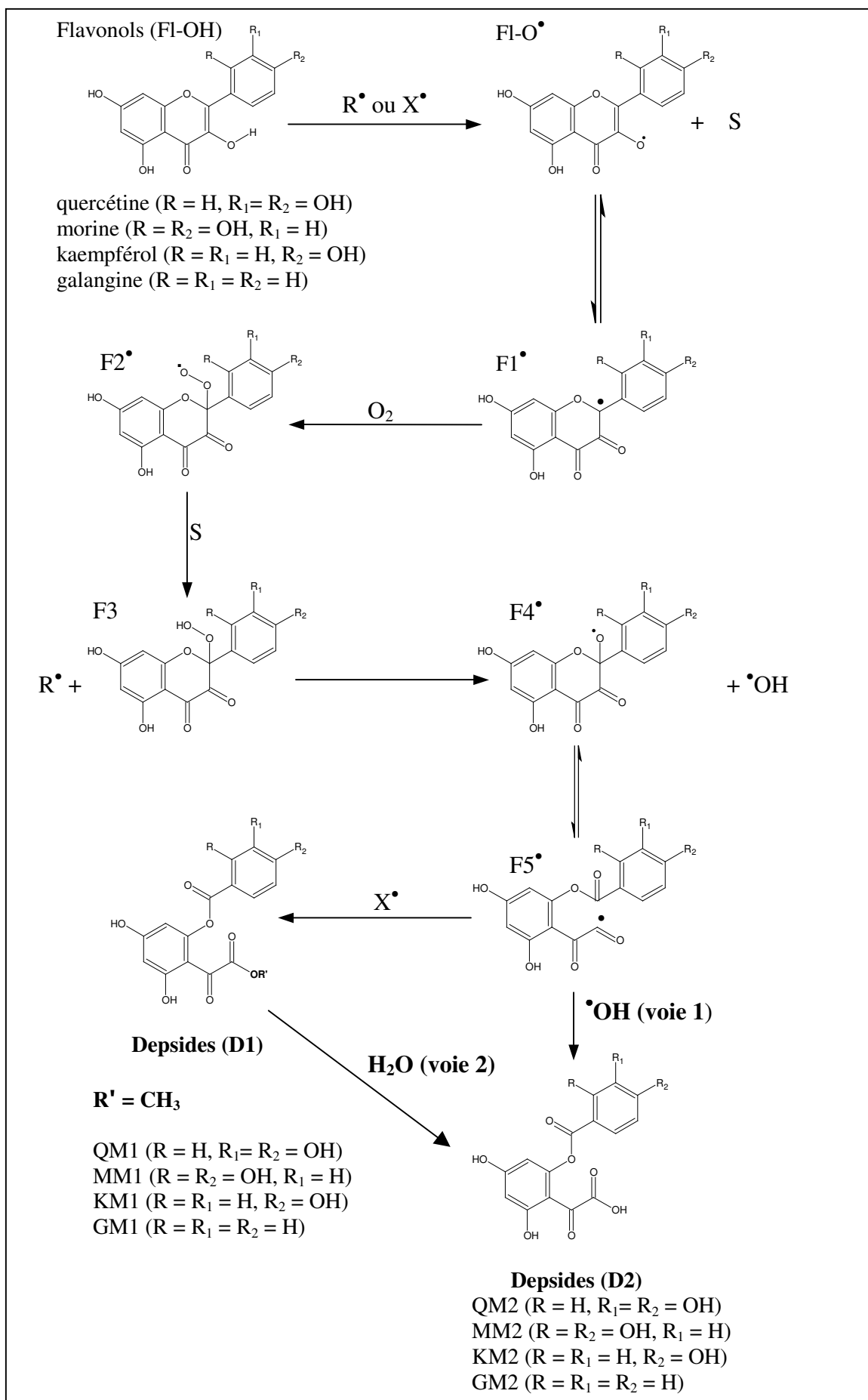


Figure 60 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des depsides QM2, MM2, KM2 et GM2 à partir des flavonols quercétine, morine, kaempférol et galangine, respectivement. R^\bullet représente HMR et X^\bullet représente $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ S est le solvant, méthanol.

2^{ème} cas : Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, il existe un équilibre chimique entre les depsides possédant une fonction ester et ceux avec une fonction carboxyle (**Figure 35**). Celle-ci est obtenue après hydrolyse de la forme ester. Par conséquent, en introduisant l'eau dans le milieu d'irradiation, celle-ci peut réagir avec QM1, MM1, KM1 et GM1 et conduit respectivement à la formation de QM2, MM2, KM2 et GM2 (**Figure 60, voie 2**).

3^{ème} cas : La troisième voie de formation de QM2, MM2, KM2 et GM2 peut être un mécanisme qui dépend de $\bullet\text{OH}$ et surtout indépendant de HMR. En effet, les flavonols sont reconnus pour leur grande réactivité avec le radical $\bullet\text{OH}$. Selon la structure de la molécule, les sites redox primaires sont les groupes 3'-OH, 4'-OH ou 3-OH. Dans notre cas, les radicaux $\bullet\text{OH}$ qui ne sont pas piégés par le méthanol peuvent réagir avec les flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine) via un mécanisme similaire à celui proposé pour HMR et HER conduisant ainsi à la formation des depsides QM2, MM2, KM2 et GM2 (**Figure 61**). Toutefois, aucune étude bibliographique n'a mis en évidence d'attaque du radical $\bullet\text{OH}$ sur le groupement 3-OH.

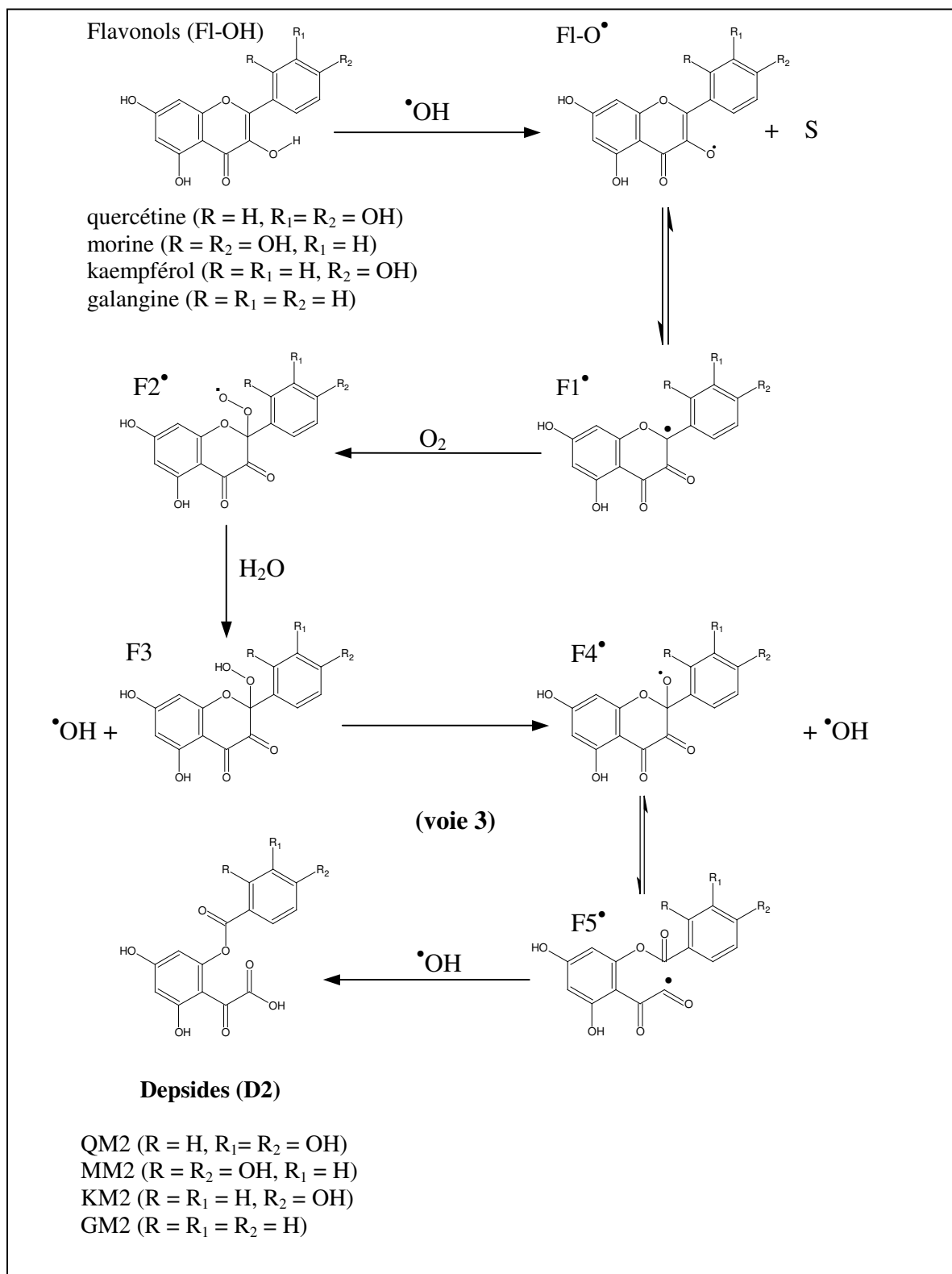


Figure 61 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des depsides QM2, MM2, KM2 et GM2 à partir des flavonols quercétine, morine, kaempférol et galangine, respectivement. R• représente HMR et X• représente CH₃O• S est le solvant, méthanol.

III. COMPARAISON AVEC LE TRAITEMENT DES FRAISES PAR IRRADIATION

Les fraises sont des sources importantes d'acides phénoliques (acide gallique, acide *p*-coumarique, acide caféique et acide 4-hydroxybenzoïque) et de flavonoïdes (quercétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-galactoside, kaempférol-3-O-glucoside, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine) (Breitfellner, 2002). En irradiant ces fruits, Breitfellner et ses collaborateurs ont montré que l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et les dérivés de la quercétine n'ont pas été affectés par l'irradiation (Breitfellner, 2002 ; Breitfellner, 2003). En revanche, les concentrations du kaempférol-3-O-glucoside, de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine ont largement diminué au cours du traitement. A une dose de 6 kGy, leurs quantités sont passées de 2,31 mg/kg, 48,87 mg/kg et 2,85 mg/kg (avant irradiation) à 1,27 mg/kg, 34,07 mg/kg et 1,80 mg/kg, respectivement.

L'acide 4-hydroxybenzoïque (**Figure 62**), quant à lui, est le seul composé dont la concentration augmente linéairement avec la dose appliquée. Sa concentration initiale (1,5 mg/kg avant irradiation) est triplée (5,6 mg/kg) après application d'une dose de 6 kGy.

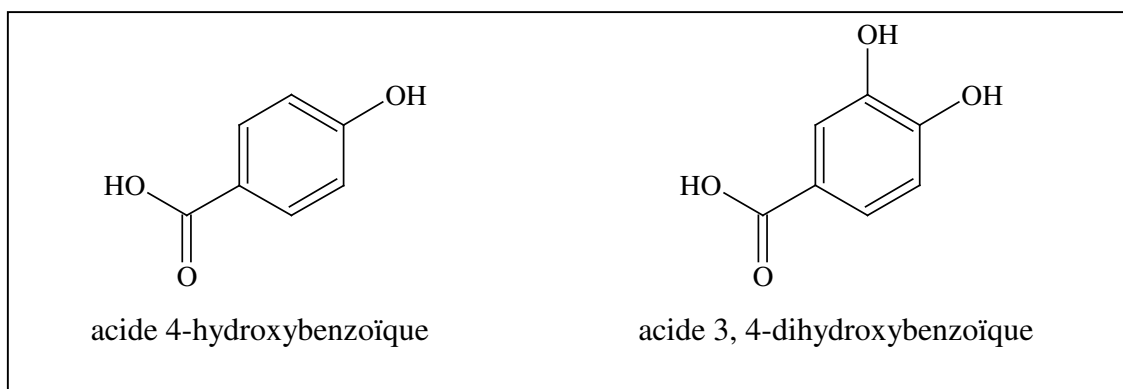


Figure 62 : Structures chimiques des acides phénoliques.

Quoique le mécanisme réactionnel permettant la formation de cet acide n'ait pas été proposé, nous pouvons suggérer qu'il serait issu de la dégradation du kaempférol. Par exemple, parmi les produits minoritaires formés au cours de la radiolyse de la quercétine, nous avons identifié, par RMN et LC-MS, l'acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (**Figure 62**) (Marfak, 2003a).

Les études de Breitfellner et ses collaborateurs ont également montré la formation d'un autre composé (noté C2) dont la quantité augmente linéairement avec la dose absorbée. La structure chimique de ce produit n'est pas encore déterminée, néanmoins en analysant son spectre UV/visible, il s'est avéré que celui-ci ne correspond ni aux spectres des flavonoïdes ni à ceux des acides phénoliques. Des analyses préliminaires par LC-MS ont montré que sa masse moléculaire est 318.

Rappelons que la radiolyse du kaempférol, dans les mélanges eau/méthanol, conduit à la formation du produit KM2 dont la masse moléculaire est également 318.

Ce résultat est intéressant car il montre que des mécanismes de transformation similaires peuvent être observés, d'une part, dans les fruits irradiés, et d'autre part, dans des solutions alcools ou dans des mélanges eau/alcool. Cependant, il est important de noter que les solutions alcooliques de flavonoïdes ne représentent pas le milieu environnant des flavonoïdes dans les fruits. En rajoutant de l'eau dans les solutions nous avons essayé de nous rapprocher des conditions physiologiques. Cependant, à cause du caractère très peu polaire des flavonoïdes, nous n'avons pu réaliser que des solutions avec 25% d'eau et 75% de méthanol, c'est-à-dire encore éloignées des véritables conditions existant dans les fruits. Réaliser un modèle *in vitro* de ces conditions semble difficile. Nous envisageons par exemple de modifier le pH des solutions pour augmenter la solubilité des flavonoïdes tout en se rapprochant de ces conditions.

Il est également important de remarquer que la plupart des flavonoïdes sont présents dans les fruits sous forme de glycoside. La première question que nous devons alors nous poser est : que devient le sucre au cours de la radiolyse ? Soit le sucre protège le flavonoïde, soit il se « détache » conduisant à la formation de la forme aglycone du flavonoïde qui pourra alors subir des modifications structurales, au cours de l'irradiation, selon des mécanismes similaires à ceux que nous avons proposés.

IV. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES FLAVONOLS ET DE LEURS PRODUITS DE RADIOLYSE

Nous avons vu que l'irradiation a pour effet de réduire la quantité des flavonoïdes présents dans les fraises, et d'augmenter celle de l'acide 4-hydroxybenzoïque. En conséquence, ces fruits pourraient perdre, au moins en partie, leur qualité nutritionnelle. Pour étudier un tel effet, nous avons mesuré la capacité des flavonols et celle de leurs produits de dégradation (**Figure 1 et 2**) à piéger les radicaux DPPH et $O_2^{\bullet-}$. L'effet de ces produits sur l'activité de la xanthine oxydase, précurseur des radicaux $O_2^{\bullet-}$, est également étudié.

IV.1. ACTIVITE ANTI-SUPEROXYDE ET ANTI-DPPH

Les résultats obtenus pour les douze depsides identifiés dans ce travail (QM1, QE1, QM2, MM1, ME1, MM2, KM1, KE1, KM2, GM1, GE1 et GM2) ainsi que ceux obtenus pour les flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine) sont regroupés dans le **Tableau 21**.

Possédant un groupement catéchol sur le cycle B (3',4'-OH), QM2 est le depside le plus actif sur les deux radicaux (1,31 μ M pour $O_2^{\bullet-}$ et 0,8 mM pour DPPH) suivi de MM2 (2',4'-OH) avec des IC_{50} de l'ordre de 4,50 μ M (pour $O_2^{\bullet-}$) et 3,24 mM (pour DPPH). La suppression de 2'-OH semble ne pas avoir un grand effet sur l'activité antioxydante ; c'est le cas de KM2 qui a des activités (5,37 μ M pour $O_2^{\bullet-}$ et 2,76 mM pour DPPH) presque similaires à celles de MM2. En revanche, en examinant l'activité de GM2 (7,20 μ M pour $O_2^{\bullet-}$ et 4,31 mM pour DPPH), nous constatons que l'absence de groupement hydroxyle sur le cycle B diminue largement l'aptitude à piéger les radicaux $O_2^{\bullet-}$ et DPPH.

Tableau 21 : Activités anti-superoxyde et anti-DPPH des flavonols et celles de leurs produits de radiolyse. $O_2^{\bullet-}$ est généré par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase et mesuré par chimiluminescence. Le DPPH est mesuré par RPE.

Antioxydant	Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)		Radical DPPH	
	IC ₅₀ (μ M)	SD	IC ₅₀ (mM)	SD
quercétine	0,16	0,02	0,04	0,01
QM1	8,22	0,05	2,78	0,03
QE1	7,86	0,04	5,11	0,04
QM2	1,31	0,02	0,80	0,02
morine	1,62	0,02	0,41	0,02
MM1	12,67	0,04	6,35	0,30
ME1	15,24	0,05	7,29	0,04
MM2	4,50	0,03	3,24	0,02
kaempférol	1,18	0,01	0,19	0,01
KM1	18,12	0,03	3,12	0,02
KE1	17,52	0,05	6,57	0,04
KM2	5,37	0,02	2,76	0,03
galangine	3,23	0,02	0,92	0,02
GM1	21,34	0,04	7,43	0,04
GE1	26,46	0,03	8,78	0,04
GM2	7,20	0,03	4,31	0,03

En comparant, l'activité des différents depsides issus du même flavonol, nous avons remarqué que les composés hydroxylés en position 8 (8-OH) (QM2, MM2, KM2 et GM2) (**Figure 2**) sont plus actifs que ceux méthoxylés (8-OCH₃) (QM1, MM1, KM1 et GM1) (**Figure 2**), lesquels possèdent une activité plus élevée que celle des depsides éthoxylés (8-OCH₂CH₃) (QE1, ME1, KE1 et GE1) (**Tableau 21**).

En ce qui concerne l'activité antioxydante des flavonols, la quercétine est la plus active, suivie de la morine, du kaempférol et de la galangine (**Tableau 21**). Ces résultats sont en accord avec les relations établies entre la structure des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux superoxydes (chapitre II). En effet, de nombreuses études convergent pour proposer que l'activité dépend essentiellement de trois critères (*Rice-Evans, 1996 ; Pietta, 2000*) :

- (1) La présence d'un groupe catéchol sur le cycle B (3', 4'-OH).
- (2) La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4-oxo.
- (3) La présence du groupe 3-OH.

Par rapport aux flavonols, les depsides sont moins actifs à l'exception de QM2. L'activité de ce dernier (1,31 μM pour $\text{O}_2^{\bullet-}$) est presque égale à celle du kaempférol (1,18 μM) et presque trois fois plus élevée que celle de la galangine (3,23 μM).

Au cours de la transformation des flavonols en depsides, il y a disparition du groupe 3-OH, et par conséquent, ouverture du cycle C au niveau de la double liaison C2-C3. L'absence de ces deux caractéristiques peut expliquer la différence entre l'activité antioxydante des flavonols et celle des depsides.

Les groupes 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 5-OH et 7-OH (caractérisant les flavonols), demeurent inchangés durant la transformation des flavonols en depsides. Ils sont numérotés pour les depsides de la manière suivante : 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 6-OH et 4-OH, respectivement. La capacité de ces groupes hydroxyles à donner un atome d'hydrogène peut expliquer l'activité antioxydante des depsides.

La délocalisation des électrons pouvant exister d'une part entre le cycle A et le groupe 8-oxo, et d'autre part entre le cycle B et le groupe 7'-oxo, peut également participer à la capacité des depsides à piéger les radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ et DPPH.

IV.2. INHIBITION DE LA XANTHINE OXYDASE

Pour mesurer la capacité des depsides et des flavonols à piéger les radicaux superoxydes, nous avons utilisé le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase comme générateur de ces radicaux. Donc, soit les molécules étudiées piègent directement le radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ formé, soit elles inhibent la xanthine oxydase (XO), réduisant ainsi sa capacité à produire les radicaux superoxydes. Un autre produit de cette réaction enzymatique est l'acide urique. Caractérisé par une longueur d'onde d'absorption à 290 nm, cet acide nous a permis d'évaluer l'aptitude des flavonols et des depsides à inhiber la XO (voir matériels et méthodes). Moins il s'en forme, plus l'inhibition est importante, indépendamment du piégeage direct.

Cette étude a montré que les depsides MM1, KM1, GM1, QE1, ME1, KE1, GE1, MM2, KM2 et GM2 ne sont pas capables d'inhiber l'enzyme. Malgré des concentrations très élevées (10^{-2} M), le pourcentage d'inhibition est toujours resté inférieur à 50% (**Tableau 22**). Nous concluons que l'activité antioxydante de ces depsides est essentiellement due au piégeage direct du radical superoxyde.

Tableau 22 : Pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase par les depsides non actifs testés à une concentration de 10^{-2} M.

Depsides	% d'inhibition
MM2	46,78
KM2	16,99
MM1	36,82
KM1	27,70
QE1	36,54
ME1	25,05
KE1	22,96
GE1	0,00

Seuls deux depsides issus de la dégradation de la quercétine (QM1 et QM2) ont montré une activité inhibitrice de XO (**Tableau 23**). En comparaison avec les flavonols, QM1 (12, 10 μ M) et QM2 (8,51 μ M) sont moins actifs que le kaempférol (4,48 μ M) et la galangine (15,80 μ M). En outre, les deux depsides sont à peu près dix fois plus actifs que la quercétine (46,90 μ M) et la morine (47,50 μ M) (**Tableau 23**).

Tableau 23 : IC_{50} liées à la réduction de l'activité de la xanthine oxydase par les flavonols : quercétine, morine, kaempférol et galangine, et par les depsides QM1 et QM2.

Produits	IC_{50} (μM)	SD
quercétine	46,90	0,07
morine	47,51	0,08
kaempférol	4,48	0,06
galangine	15,82	0,07
QM1	12,10	0,09
QM2	8,52	0,08

V. MODELISATION MOLECULAIRE ET DEPSIDES

Les depsides que nous avons identifiés constituent une nouvelle famille de molécules. Nous venons de montrer que ces composés sont de bons piègeurs de radicaux $O_2^{\bullet-}$ et DPPH. Certains sont également de bons inhibiteurs de la xanthine oxydase. Cependant, nous ne possédons pas d'information sur les mécanismes réactionnels. En tant qu'antioxydants, ils peuvent agir soit par transfert d'électron soit par transfert d'hydrogène. En effet, nous avons vu, dans le chapitre matériels et méthodes, que le piégeage d'un radical libre par un antioxydant se fait par l'un ou l'autre de ces transferts redox vers le radical. En modélisation moléculaire, l'aptitude au transfert d'électron et d'hydrogène se mesure respectivement par la distribution HOMO et la BDE des liaisons O-H.

Le mécanisme enzymatique dépend lui, probablement, de plusieurs autres paramètres tels que l'encombrement stérique et l'hydrophobicité.

V.1. CONFORMATION GEOMETRIQUE

Dépourvus du cycle intermédiaire C, les depsides, à la différence des flavonoïdes, possèdent de nombreux angles de torsion, nous nous intéressons particulièrement aux quatre suivants : $\tau_1 = C1-C2-O-C7'$, $\tau_2 = C1-C7-C8-O$ et $\tau_3 = C1-C7-C8-R$ ($R = H, CH_3$ ou CH_2CH_3) et , $\tau_4 = C2'-C1'-C7'-O$ (**Figure 63**).

Nous avons optimisé la structure spatiale par la méthode du recuit-simulé en utilisant le champ de force esff, puis nous l'avons affinée avec AM1 (voir matériels et méthodes). La conformation la plus stable est obtenue pour les angles de torsion suivants : $\tau_1 = 168,03^\circ$, $\tau_2 = 100,52^\circ$, $\tau_3 = 39,58$ et $\tau_4 = -163,44^\circ$ (cas du depside QE2) (**Figure 63**). Ces valeurs sont quasiment les mêmes pour les depsides que nous avons étudiés. La superposition de toutes les conformations ne montre aucune différence spatiale, si ce n'est bien sûr au niveau du carbone C-8. Ce résultat est important puisqu'il nous permet de conclure que les différences observées sur l'activité enzymatique ne sont pas dues à des différences d'encombrement stérique.

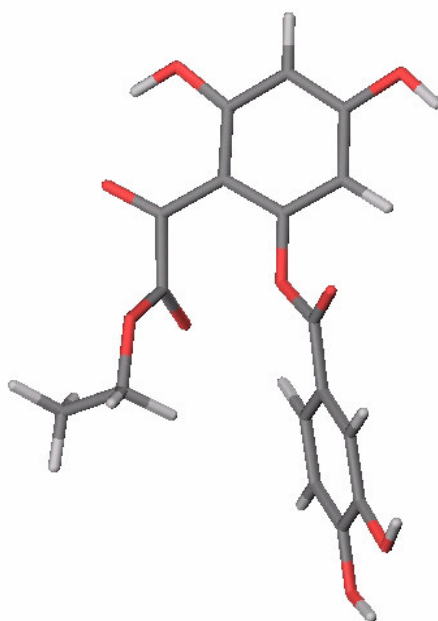


Figure 63 : Conformation spatiale des depsides, cas de QE2.

V.2. DETERMINATION DE LA DISTRIBUTION HOMO

Nous nous intéressons maintenant à la distribution de la HOMO. Sa représentation spatiale peut nous apporter des informations sur les sites concernés par le transfert d'électron. Ce mécanisme peut être invoqué au cours d'une action antioxydante directe sur un radical, mais également lorsque la molécule se trouve au niveau du site actif de l'enzyme. Pour les trois depsides issus d'un même flavonol, nous avons remarqué que la délocalisation de la HOMO est la même. Nous choisissons donc de représenter uniquement sur la **Figure 64** la couche HOMO de QM2, KM2, MM2 et GM2.

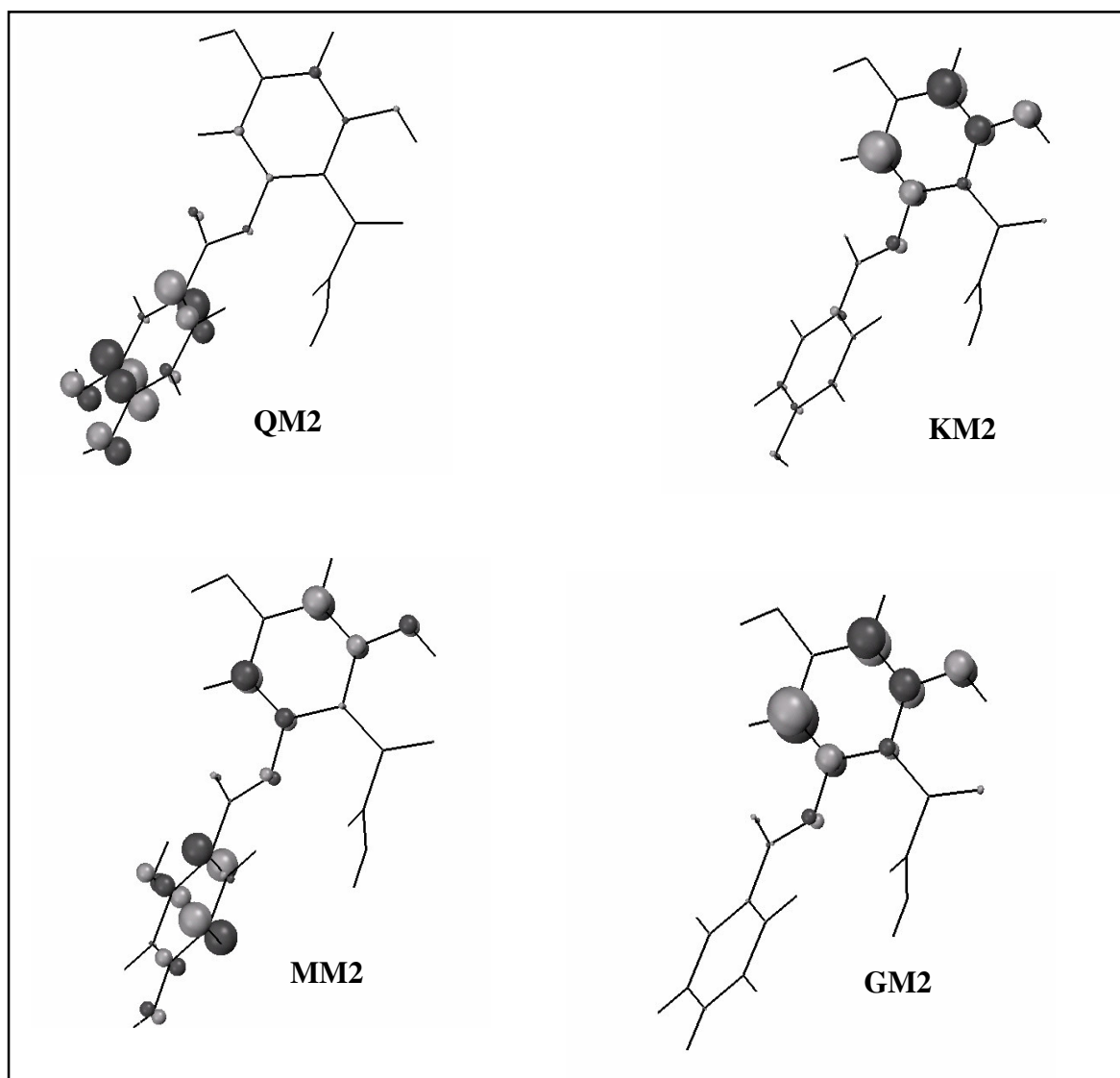


Figure 64 : Répartition de la bande HOMO sur les depsides QM2, MM2, KM2 et GM2 issus de la dégradation de la quercétine, la morine, le kaempférol et la galangine, respectivement.

Nous observons que la HOMO n'est pas localisée aux mêmes endroits sur les quatre composés. Pour QM2 elle est uniquement localisée sur le cycle B, et pour KM2 et GM2 elle se situe sur le cycle A. MM2 a une distribution plus étendue sur les deux cycles. Nous constatons donc que le positionnement des groupements OH sur les cycles A et B joue un rôle important dans la distribution de la couche HOMO sur les depsides.

Nous avons montré que les depsides sont de bons piègeurs des radicaux $O_2^{\bullet-}$. Nous proposons que cette réactivité soit liée au transfert d'électron de la HOMO vers la molécule.

En ce qui concerne l'activité d'inhibition de la xanthine oxydase et étant donné que seuls QM2 et QM1 sont actifs, on peut supposer que la liaison entre ces depsides et l'enzyme se fait au niveau du cycle B. La faible délocalisation sur le cycle B dans MM2, explique l'activité faible mais non nulle de cette molécule. Par contre, aucune activité n'est effectivement observée pour KM2 et GM2 où la HOMO est localisée sur le cycle A.

V.3. BDE

De la même manière que pour les flavonoïdes, nous avons calculé les BDE de tous groupements OH pour l'ensemble des 12 depsides. L'analyse du **Tableau 24** permet de montrer les sites responsables d'un éventuel transfert d'hydrogène.

Tableau 24 : Les valeurs BDE (kcal/mol) calculées pour chaque groupement OH des depsides en utilisant la méthode AM1.

Depsides	OH-substitutions					
	4-OH	6-OH	8-OH	2'-OH	3'-OH	4'-OH
QM1	44,81	46,38			34,36	38,18
QE1	44,76	46,15			34,34	38,16
QM2	44,83	46,19	32,30		34,45	38,23
MM1	44,80	46,05		44,70		44,25
ME1	45,03	46,44		44,97		44,49
MM2	44,84	46,22	32,23	44,97		44,34
KM1	44,97	46,16				41,28
KE1	44,91	46,24				41,24
KM2	45,00	46,22	32,32			41,37
GM1	44,87	46,05				
GE1	44,83	46,15				
GM2	44,87	46,14	32,30			

Nous constatons que les BDE sont relativement importantes sur le cycle A (autour de 45 kcal/mol). Comme nous l'avons déjà observé pour les flavonoïdes, ce cycle n'est pas le site préférentiel pour un transfert d'hydrogène.

Par contre, de la même manière que pour les flavonoïdes, les BDE sont plus faibles sur le cycle B, particulièrement pour les depsides issus de la quercétine. En effet, dans ce cas, la présence d'un noyau catéchol (3',4'-OH) sur le cycle B permet une stabilisation du radical par liaison hydrogène (**Figure 65**). En revanche, l'absence de cet effet sur les depsides issus de la morine et du kaempférol entraîne des BDE plus importantes et donc une activité plus faible.

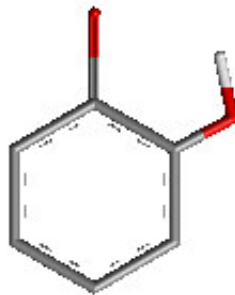


Figure 65 : Stabilisation du radical par liaison hydrogène.

Il est également intéressant de constater que le groupement 8-OH présente la BDE la plus faible. Ce site n'existe pas dans les flavonoïdes et semble pouvoir participer à la réactivité des depsides.

Pour l'inhibition de la xanthine oxydase, seuls QM2 et QM1 sont actifs. Nous avons constaté que les différences d'activité ne pouvaient pas être attribuées aux différences de conformations spatiales.

Grâce aux résultats obtenus pour les BDE, on peut dire que si la réaction au niveau du site actif de l'enzyme se fait par transfert d'hydrogène, la différence se situe au niveau du cycle B. En effet, sur ce cycle les BDE sont plus faibles pour les depsides issus de la quercétine que pour les autres. En revanche, il n'y a aucune différence sur le cycle A.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au sein du foie, organe principal de la métabolisation, les alcools, notamment le méthanol et l'éthanol, se métabolisent en radicaux 1-hydroxyméthyl (HMR) et en radicaux 1-hydroxyéthyl (HER), respectivement. Ces radicaux sont capables de réduire l'activité de certains antioxydants endogènes tels que l' α -tocophérol, le glutathion et la superoxyde dismutase (*Santiard, 1995 ; Stoyanovsky, 1998 ; Puntarulo, 1999*). De ce fait, ils sont responsables, en partie, du stress oxydatif au niveau du foie causé par l'administration aiguë ou chronique d'alcool.

Les flavonoïdes, composés naturels largement présents dans les fruits et les légumes, sont reconnus pour leur activité antioxydante. Ils sont des piègeurs de radicaux libres oxygénés, des chélateurs des ions métalliques et également des inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation des radicaux libres (*Cotelle, 1996 ; Cos, 1998 ; Rice-Evans, 1996 ; Jovanovic, 1994*).

Au cours de la dernière décennie, des études expérimentales ont permis de déterminer les sites de la métabolisation des flavonoïdes. Là encore, le foie semble être l'organe principalement évoqué (*Hollman, 1997*). De grandes quantités de flavonoïdes se métabolisent au sein du foie alors que de faibles quantités se métabolisent au niveau de la muqueuse intestinale (*Scalbert, 2000*). Dans les fruits et les légumes, on retrouve généralement les flavonoïdes sous forme de glycosides. Il a été montré que la première étape de la métabolisation *in vivo* de ces flavonoïdes glycosylés est leur déglycosylation. Les aglycones ainsi formés subissent une O-méthylation ou une sulfonation (*Hollman, 1997 ; Hollman, 1999 ; Walle, 2000*). Puisque toutes ces réactions ainsi que la formation de HER et HMR se produisent au sein du foie, des réactions entre ces radicaux et les flavonoïdes pourraient avoir lieu.

Pour étudier la possibilité de telles réactions, nous avons utilisé la radiolyse γ . Quatorze molécules représentant différentes classes de flavonoïdes (flavonols, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavanones, flavones et flavonoïdes glycosylés) sont irradiés en solutions alcools (méthanol et éthanol).

En utilisant la CLHP, nous avons observé que les flavones, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavonoïdes glycosylés ne sont pas affectés par l'irradiation. En revanche, les flavonols étudiés sont transformés en :

- produits majoritaires QM1, MM1, KM1 et GM1 (formés au cours de la radiolyse dans le méthanol de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine, respectivement) et QE1, ME1, KE1 et GE1 (formés au cours de la radiolyse dans l'éthanol).
- produits minoritaires parmi lesquels nous avons détecté QM2, MM2, KM2 et GM2 (formés au cours de la radiolyse dans le méthanol et dans l'éthanol).

Les structures chimiques de ces douze composés sont déterminées par RMN et LC-MS.

A la différence des flavonols, ces produits de radiolyse sont dépourvus du cycle intermédiaire (cycle C). Leur structure chimique est constituée de deux cycles A et B et ils diffèrent entre eux par le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle B. De plus, les produits majoritaires sont caractérisés par la présence d'une fonction ester (COOCH_3 si le milieu d'irradiation est le méthanol ou $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ si le milieu est l'éthanol). Celle-ci est remplacée chez les produits minoritaires par une fonction acide. Nous avons donc constaté que l'irradiation entraîne la transformation des flavonols en une nouvelle classe de molécules qui appartiennent à la famille des depsides.

Les réactions redox permettant la formation des depsides sont stéréospécifiques puisqu'elles ne peuvent se produire qu'au niveau du groupe 3-OH et en présence de la double liaison C2-C3. Autrement dit, seuls les flavonols sont concernés. Les mécanismes réactionnels permettant cette transformation sont alors proposés. Aux faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), les flavonols réagissent avec HMR ou HER. Dans ce cas l'oxygène joue un rôle primordial dans la transformation des flavonols en depsides. Pour des concentrations entre 10^{-4} M et 10^{-3} M, ils réagissent à la fois avec HMR et $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ ou HER et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$. Finalement, aux fortes concentrations ($> 10^{-3}$ M), les flavonols réagissent avec $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ et dans une moindre mesure avec d'autres espèces telles que H^\bullet et e^-_{s} . Les constantes de vitesse des réactions flavonols-HMR/HER et des réactions flavonols- $\text{CH}_3\text{O}^\bullet/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ sont calculées et utilisées comme indicateur de la capacité des flavonols à piéger ces quatre radicaux.

Ces résultats sont donc les premiers à déterminer les relations entre les structures des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux nocifs issus de la dégradation des alcools (méthanol et éthanol). Cette investigation est une première étape qui s'inscrit dans la recherche d'une diminution des stress oxydatifs causés par une intoxication chronique ou aiguë à l'alcool.

Au cours de notre travail, nous avons également mesuré l'activité antioxydante des depsides. Ils ont montré une activité comparable à celle des flavonoïdes vis-à-vis les radicaux superoxyde et DPPH. De plus QM1 et QM2, issus de la dégradation de la quercétine, réagissent également comme inhibiteurs de la xanthine oxydase.

Les résultats de modélisation moléculaire nous ont permis de confirmer certaines relations structure-activité établies expérimentalement tels que l'importance du groupement 3-OH dans l'attaque des radicaux HMR, $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$, HER et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ sur les flavonols. L'importance du cycle B a été démontré dans l'activité antioxydante des depsides. Par ailleurs, les différences de structure électronique entre les depsides ont été avancées pour expliquer les différences d'activité sur la xanthine oxydase. Les calculs ont été effectués en utilisant la méthode semi-empirique AM1 et nous envisageons d'affiner les calculs de structure électronique par des méthodes *ab-initio* et DFT.

L'irradiation des fruits tels que les fraises et les clémentines a montré que les concentrations de flavonoïdes présents dans ces deux aliments diminuent en fonction de la dose appliquée. Ceci est dû apparemment au fait que les flavonoïdes subissent des dégradations au cours de l'irradiation. Par contre, aucun mécanisme réactionnel n'a été proposé. Pour étudier ces réactions physico-chimiques, nous avons irradié des flavonoïdes dans des mélanges eau/méthanol. La non solubilité de ces molécules dans des milieux aqueux neutres, nous a empêché de réaliser leur radiolyse dans 100% d'eau. Quoique les modèles utilisés dans cette étude ne constituent pas le milieu physiologique des flavonoïdes dans les fruits et les légumes, nous avons montré que la concentration des depsides QM2, MM2, KM2 et GM2 augmente en fonction du pourcentage d'eau présent dans le milieu d'irradiation. En conséquence, il est possible que durant le traitement des aliments par irradiation, une série de produits radiolytiques semblables à ces depsides puisse se former. Pour développer cet axe de recherche, nous travaillons sur l'amélioration du milieu d'irradiation. Les études expérimentales envisagées sont les suivantes :

☞ La radiolyse dans des milieux à pH basique pour augmenter la solubilité des flavonoïdes.

☞ La radiolyse dans des milieux acides pour se rapprocher des conditions physiologiques.

☞ La radiolyse d'un mélange de flavonoïdes pour construire une matrice semblable à celle existant dans les fruits et les légumes.

REFERENCES

REFERENCES

- Albano, E.; French, S.W.; Ingelman-Sundberg, M. Hydroxyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Frontiers in Bioscience*. **1999**, 4: d533-540.
- Albano, E.; Parola, M.; Comoglio, A.; Dianzani, M.U. Evidence for the covalent binding of hydroxyethyl radicals to rat liver microsomal proteins. *Alcohol Alcoholism*. **1993**, 28: 453-459.
- Albano, E.; Tomasi, A.; Gorla-Gatti, L.; Persson, J.O.; Terelius, Y.; Ingelman-Sundberg, M.; Dianzani, M.U. Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 41: 1895-1902.
- Albano, E.; Tomasi, A.; Gorla-Gatti, L.; Poli, G.; Vannini, V.; Dianzani, M.U. Free radical metabolism of alcohols in rat liver microsomes. *Free Radic. Res. Commun.* **1987**, 3: 243-249.
- Albano, E.; Tomasi, A.; Ingelman-Sundberg, M. Spin trapping of alcohol-derived radicals in microsomes and reconstituted systems by electron spin resonance. *Meth. Enzymol.* **1994**, 233: 117-127.
- Badger, T.M.; Ronis, M.J.; Seitz, H.K.; Albano, E.; Ingelman-Sundberg, M.; Lieber, C.S. Alcohol metabolism: role in toxicity and carcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res.* **2003**, 27: 336-347.
- Balogh-Hergovich, E.; Kaiser, J.; Speier, G.; Huttner, G.; Zsolnai, L. Copper-mediated oxygenation of flavonolate in the presence of a tridentate N-ligand. Synthesis and Crystal structures of [Cu(flav)(idpaH)]ClO₄ and [Cu(idpaH)O-bs]ClO₄, [flav=flavonolate, idpaH = 3,3'-iminobis(N,N-dimethylpropylamine), O-bs = O-Benzoylsalicylate]. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, 304: 72-77.
- Barhacs, L.; Kaiser, J.; Speier, G. Kinetics and mechanism of the stoichiometric oxygenation of the ionic zinc (II) flavonolate complex [Zn (flav) (idpa)]ClO₄ (flav=flavonolate; idpa=3,3'-iminobis (N, N-dimethylpropylamine)). *J. Mol. Catal.* **2001**, 172: 117-125.

- Barz, W.; Hösel, W. *The flavonoids: Metabolism of flavonoids*. London: J. B. Harborne, T. J. Mabry Chapman and Hall, Eds., **1975**, 916-969.
- Baxendale, J.H. Rate of reaction of solvated electrons with hydrogen ions in methanol. *Int. J. Radiat Phys. Chem.* **1972**, 4: 113-115.
- Bell-Parikh, L.C.; Guengerich, F.P. Kinetics of cetochrome P450 2E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274: 23833-23840.
- Bjorneboe, G.E.; Bjorneboe, A.; Hagen, B.F.; Morland, J.; Drevon, C.A. Acute and chronic effects on ethanol on secretion of alpha-tocopherol from primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1987**, 918: 236-241.
- Blomstrand, R.; Ostling-wintzell, H.; Lof, A.; McMartin, K.; Tolf, B.R.; Hedstrom, K.G. Pyrazoles as inhibitors of alcohol oxidation and as important tools in alcohol research: an approach to therapy against methanol poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1979**, 76: 3499-3503.
- Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* **1997**, 6: 343-355.
- Bosron, W.F.; Li, T.K. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenase, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology.* **1986**, 6: 502-510.
- Bothe, E.; Schuchmann, M.N.; Schulte-Frohlinde, D.; von Sonntag, C. HO₂ elimination from α-hydroxyalkylperoxyl radicals in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28: 639-644.
- Boveris, A., Fraga, C.G., Varsavsky, A.I., Koch, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, 227: 534-541.
- Bracke, M.; Vyncke, B.; Opendakker, G.; Foidart, J.M.; De Pestel, G.; Mareel, M. Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis.* **1991**, 9 :13-25.
- Brasseur, T. Anti-inflammatory properties in flavonoids. *J. Pharm. Belg.* **1989**, 44: 235-241.
- Breitfellner, F.; Solar, S.; Sontag, G. Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215: 28-31.

- Breitfellner, F.; Solar, S.; Sontag, G. Radiation induced chemical changes of phenolic compounds in strawberries. *Radiat. Phys. Chem.* **2003**, 67: 497-499.
- Bronner, W.E.; Beecher, G.R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A.* **1995**, 705: 247-256.
- Bronskill, M.J.; Wolff, R.K.; Hunt, J.W. Picosecond pulse radiolysis studies-I. The solvated electron in aqueous and alcohol solutions. *J. Chem. Phys.* **1970**, 53: 4201-4209.
- Brown, J. E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **1998**, 330, 1173-1178.
- Bruneton, J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, (3^{ème} éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, **1999**, 1120p.
- Buxton, G.V.; Sellers R. M. Reactivity of the hydrated electron and the hydroxyl radical with boric acid in aqueous solutions, *Int. J. Radiat. Applic. Instrum. Part C. Radiat. Phys. Chem.* **1987**, 29: 137-140.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 22: 749-760.
- Cederbaum, A.I.; Dicker, E. Inhibition of microsomal oxidation of alcohols and of hydroxyl radical-scavenging agents by the iron-chelating agent desferrioxamine. *Biochem. J.* **1983**, 210: 107-113.
- Cederbaum, A.I.; Dicker, E.; Rubin, E.; Cohen, G. The effect of dimethylsulfoxide and other hydroxyl radical scavengers on the oxidation of ethanol by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 78: 1254-1262.
- Chase, W.J.; Hunt, J.W. Solvation time of the electron in polar liquids. Water and alcohols. *J. Phys. Chem.* **1975**, 79: 2835-2845.
- Chaudhry, P.S.; Cabrera, J.; Juliani, H.R.; Varma, S.D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* **1983**, 32: 1995-
- *Chromatography A.* **1998**, 799: 101-110.
- Chu, S.C.; Hsieh, Y.S.; Lin, J.Y. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod.* **1992**, 55: 179-183.

- Cobut, V.; Frongillo, Y.; Jay-Gerin, J.P.; Patau, J.P. Calculs des rendements des produits de la radiolyse de l'eau par une méthode Monte Carlo. *J. Chim. Phys.* **1994**, 91:1018-1022.
- Cobut, V.; Jay-Gerin, J.P.; Frongillo, Y.; Patau, J.P. On the dissociative electron attachment as a potential source of molecular hydrogen in irradiated liquid water. *Radiat. Phys. Chem.* **1996**, 47: 247-250.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van-Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61: 71-76.
- Cotelle, N.; Bernier, J.L.; Catteau, J.P.; Pommery, J.; Wallet, J.C.; Gaydou, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 20: 35-43.
- Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J. Chromatography A.* **1997**, 761: 315-321.
- Dewar, M.J.S; Zoebisch, E.G.; Healy, E.F.; Stewart, J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107: 3902-3909.
- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci.* **1999**, 65: 337-53.
- Dugas, A.J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N.H. Winston, G.W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod.* **2000**, 63: 327-31.
- Ekström, G., Cronholm, T., Ingelman-Sundberg, M. Hydroxyl-radical production and ethanol oxidation by liver microsomes isolated from ethanol-treated rats. *Biochem. J.* **1986**, 233: 755-761.
- Ekström, G.; Ingelman-Sundberg, M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P450 (P450 IIE1). *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 245: 2505-2512.
- Eriksen, T.E.; Fransson, G. Radical-induced oxidation of glutathione in alkaline aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.* **1988**, 32: 163-167.
- Ferradini, C.; Pucheault, J. *Biologie de l'action ionisante*. Paris : Masson, **1983**.

- Fletcher, J.W. Richards, P.J.; Production of electrons by reaction of sodium with methanol and ethanol: kinetics of their formation and subsequent reactions. *Can. J. Chem.* **1971**, 49: 2275-2281.
- Fowels, P. Pulse radiolytic induced transient electrical conductance in liquid solutions- Part 4. The radiolysis of methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol. *Trans. Faraday Soc.* **1971**, 67: 428-432.
- Fricke, H.; Hart, E.J. *Chemical dosimetry, Radiation dosimetry : Instrumentation*. Vol. II, Academic Press, **1966**, 167-237.
- Getoff, N.; Ritter, A.; Schwörer F.; Bayer, P. Primary yields of $\text{CH}_3\text{O}^\cdot$ and $^\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ radicals resulting in the radiolysis of high purity methanol. *Radiat. Phys. Chem.* **1993**, 41: 797-801.
- Getoff, N.; Ritter, A.; Schwörer, F.; Bayer, P. Pulse radiolysis and product analysis of triethylsilane in methanol. *Radiat. Phys. Chem.* **1992**, 39: 177-182.
- Gonda, A.; Gault, H.; Churchill, D.; Hollomby, D. Hemodialysis for methanol intoxication. *Am. J. Med.* **1978**, 64: 749-758.
- Gorsky, L.D; Koop, D.R.; Coon, M.J. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259: 6812-6817.
- Graham, W.D.; Stevensen, M.H. Effect of irradiation on vitamin C content of strawberries and potatoes in combination with storage and with further cooking in potatoes. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, 75: 371-377.
- Gutteridge, J.M. free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* **1993**, 19: 141-158.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutr. Rev.* **1994**, 52: 253-265.
- Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, 16: 845-850.
- Herrmann, A.P.; Willems, M.; Janke, H.D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. *Wat. Res.* **2001**, 35: 2575-2582.
- Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* **1993**, 342:1007-1011.

- Hirata, Y.; Mataga, N. Solvation dynamics of electrons ejected by picosecond dye laser pulse excitation of p-phenylenediamine in several alcoholic solutions *J. Phys. Chem.* **1990**, 94: 8503-8505.
- Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.* **1996**, 57: 43-46.
- Hollman, P.C.H.; Katan, B. Dietary flavonoids: Intake health effects and bioavailability, *Food Chem. Toxicol.* **1999**, 37: 937-942.
- Hollman, P.C.H.; van Trijp, J.M.P.. Buysman, M.N.C.; Gaag, P M.; Mengelers, M.J.; de Vries, J.H.; Katan, B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* **1997**, 418: 152-156.
- IAEA, International Consultative Group on Food Irradiation (2002). <http://www.iaea.org/icgfi>.
- Ingelman-Sundberg, M.; Johansson, I. Mechanisms of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and other forms of rabbit liver microsomal cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259: 6447-6458.
- Ingelman-Sundberg, M.; Jörnvall, H. Induction of the ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrom P450 by inhibitors of alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 124: 375-382.
- Izzo, A.A. PAF and the digestive tract. A review. *J Pharm Pharmacol.* **1996**, 48: 1103-11.
- Jacobsen, D.; McMartin, K.E. Methanol and ethylene glycol poisoning. Mechanism of toxicity, clinical course, diagnosis, and treatment. *Med. Toxicol.* **1986**, 1: 309-334.
- Jay-Gerin, J.P; Ferradini, C. A new estimate of the 'OH radical yield at early times in the radiolysis of liquid water. *Chem. Phys Letters.* **2000**, 317: 388-391.
- Jin, H.; Wu, J.; Pan, X.; Zhang, X. Selecting ethanol as a model organic solvent in radiation chemistry-I. Radiolysis of acetone-ethanol system. *Radiat. Phys. Chem.* **1996**, 47: 555-558.
- Johansson, I.; Eliason, E.; Norsten, C.; Ingelman-Sundberg, M. Hydroxylation of acetone by ethanol and acetone-inducible cytochrome P450 in liver microsomes and reconstituted membranes. *FEBS Lett.* **1986**, 196: 59-64.
- Johnson, D.W.; Salmon, G.A. The effect of base on the yield and spur-decay of e_s^- in methanol. *Radiat. Phys. Chem.* **1977a**, 10: 291-293.

- Johnson, D.W.; Salmon, G.A. The effect of dose and base on the lifetime of e_s^- in pulse irradiated methanol: the reaction of e_s^- with hydroxymethyl radicals. *Radiat. Phys. Chem.* **1977b**, 10: 294-296.
- Joly, J.G., Ishii, H., Teschke, R., Hasamura, Y., Lieber, C.S. Effect of chronic alcohol feeding on the activities and submicrosomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase and demethylase for aminopyrine and ethylmorphine. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22: 1532-1535.
- Jovanovic, S.V.; Steenken, S.; Tomic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116: 4846-4851.
- Justen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of*
- Kadiiska, M.B.; Mason, R.P. Acute methanol intoxication generates free radicals in rats: an ESR spin trapping investigation. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 28: 1106-1114.
- Kaizer, J.; Speier, G. Radical-initiated oxygenation of flavonols by dioxygen. *J. Mol. Catal. A.* **2001**, 171: 33-36.
- Klein, S.M., Cohen, G., Lieber, C.S., Cederbaum, A.I. Increased microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol after chronique consumption of ethanol. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, 223: 425-432.
- Koivisto, T.; Mishin, V.M.; Mak, K.M.; Cohen, P.A.; Lieber, C.S. Induction of cytochrome P450 2E1 by ethanol in rat Kupffer cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1996**, 20: 207-212.
- Koop, D.R.; Morgan, E.T.; Tarr, G.E.; Coon, M.J.; Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P450 from liver microsomes of ethanol treated rabbits. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257: 8472-8480.
- Kooter, I.M.; Steiner, R.A.; Dijkstra, B.W.; van Noort, P.I.; Egmond, M.R.; Huber, M. EPR characterization of the mononuclear Cu-containing *Aspergillus japonicus* quercetin 2,3-dioxygenase reveals dramatic changes upon anaerobic binding of substrates. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 2971-2979.
- Landolfi, R.; Mower, R.L.; Steiner, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol.* **1984**, 33:1525-1530.

- Larocca, L.M.; Giustacchini, M.; Maggiano, N.; Ranelletti, F.O.; Piantelli, M.; Alcini, E.; Capelli, A. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *J Urol.* **1994**, 152: 1029-1033.
- Lasker, J.M., Raucy, J., Kubota, S., Bloswick, B.P., Black, M., Lieber, C.S. Purification and characterization of human liver cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 148: 232-238.
- Lecomte, E., Herberth, B., Pirrolet, P., Chancerelle, Y., Arnaud, J., Musse, N., Paille, F., Siest, G., Artur, Y. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, 60: 255-261.
- Ledig, M.; M'Paria, J.R.; Mandel, P. Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication. *Neurochem. Res.* **1981**, 6: 385-391.
- Lieber, C.S. Microsomal ethanol-oxidizing systems (MEOS): the first 30 years (1968-1998)- a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **1999**, 23: 991-1007.
- Liesivuori, J.; Savolainen, H. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, 69: 157-163.
- Lind, J.; Jowko A.; Eriksen, T.E. Methoxy radical production in methanol radiolysis. *Radiat. Phys. Chem.* **1979**, 13: 159-163.
- Magee, J.L.; Chatterjee, A. Radiation chemistry of heavy particles tracks. *J. Phys. Chem.* **1981**, 84: 3529-3537.
- Makimura, M.; Hirasawa, M.; Kobayashi, K.; Indo, J.; Sakanaka, S.; Taguchi, T.; Otake, S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol.* **1993**, 64: 630-636.
- Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Calliste, C.A.; Cook-Moreau, J.; Duroux, J. L. Transformation mechanism of the antioxidant kaempferol into depside. γ -Radiolysis study in methanol and in ethanol. *Radiat Res.* **2003c**, 160: 355-365.
- Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Calliste, C.A.; Cook-Moreau, J.; Duroux, J. L. Reactivity of flavonoids with 1-hydroxyethyl radical: A γ -radiolysis study. *Biochem. Biophys. Acta.* **2003d** (sous presse).
- Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Calliste, C.A.; Duroux, J. L. Redox reactions obtained by gamma irradiation of quercetin methanol solution are similar to *in vivo* metabolism. *Radiat. Res.* **2003a**, 159: 218-227.

- Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Calliste, C.A.; Lotfi, H.; Duroux, J. L. Structure-activity relationships of flavonoids as 1-hydroxymethyl radical and 1-hydroxyethyl radical scavengers. A γ -radiolysis study combined with molecular modeling. *Radiat. Res.* **2003e** (soumise).
- Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Champavier, Y.; Calliste, C.A.; Duroux, J. L. Radiolysis of quercetin in methanol solution : observation of depside formation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 4827-4833.
- Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Champavier, Y.; Calliste, C.A.; Duroux, J. L. Radiolysis of kaempferol in water/methanol mixtures. Evaluation of antioxidant activity of kaempferol and products formed. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, 51: 1270-1277.
- Markham, K.R. *Flavones, flavonols and their glycosides*. In *Methods in plant biochemistry. vol. I, Plant phenolics*. New York Academic Press: J. B. Harborne, Ed, **1989**, 197-235.
- McMartin, K.E.; Ambre, J.J.; Tephly, T.R. Methanol poisoning in human subjects. Role for formic acid accumulation in the metabolic acidosis. *Am. J. Med.* **1980**, 68: 414-418.
- Moncada, C.; Torres, V.; Varghese, G.; Albano, E.; Israel, Y. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms. *Mol. Pharmacol.* **1994**, 46: 786-791.
- Morgan, E.T.; Koop, D.R.; Coon, M.J. Catalytic activity of cytochrome P450 isoenzyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257: 13951-13957.
- Morris, C.J.; Earl, J.R.; Trenam, C.W.; Blake, D.R. Reactive oxygen species and iron--a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1995**, 27: 109-122.
- Nordmann, R., Ribière, C., Rouach, H. Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, 12: 219-240.
- Nordmann, R.; Ribière, C.; Rouach, H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcoholism.* **1990**, 25: 231-237.
- Oka, T.; Simpson, F.J.; Child, J.J.; Mills, C. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Purification of the dioxygenase quercetinase. *Can. J. Microbiol.* 1971, 17: 11-118.
- Olfeld, F.F.; Cowan, D.L.; Sun, A.Y. The involvement of ethanol in the free radical reaction of 6-hydroxydopamine. *Neurochem. Res.* **1991**, 16: 83-87.
- Ong, K.C.; Khoo, H.E. Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.* **1997**, 29: 121-126.

- Ong, K.C.; Khoo, H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* **2000**, *67*: 1695-1705.
- Oufedjikh, H.; Lacroix, M.; Mahrouz, M.; Amiot, M.J. Effect of γ irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*: 559-565.
- Patten, C.J., Ning, S.M., Lu, A.Y.H., Yang, C.S. Acetone inducible cytochrome P450: Purification, catalytic activity and interaction with cytochrome b5. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *251*: 629-638.
- Pepin, C.; Goulet, T.; Houde, D.; Jay-Gerin, J.P. Femtosecond kinetic measurements of excess electrons in methanol: substantiation for a hybrid solvation mechanism. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*: 7009-7013.
- Peterson, D.R.; Atkinson, N.; Hjelle, J.J. Increase in hepatic microsomal oxidation by a single dose of ethanol. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **1982**, *221*: 275-281.
- Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*: 1035-1042.
- Pikaev, A.K.; Ponomarev, A.V. The track and bulk reactions of solvated electrons in irradiated monobasic aliphatic alcohols. *Radiat. Phys. Chem.* **1989**, *34*: 693-701.
- Puntarulo, S.; Stoyanovsky, D.A.; Cederbaum, A.I. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *372*: 355-359.
- Reinke, L.A.; Lai, E.K.; Du, C.M.; McCay, P.B. Reactive free radical generation in liver and heart of ethanol-fed rats: correlation with radical formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*: 9223-9227.
- Reinke, L.A.; Moore, R.D.; McCay, P.B. Mechanisms for metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radicals in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *348*: 9-14.
- Ribière, C.; Sinaceur, J.; Nordmann, J.; Nordmann, R. Discrepancy between the different subcellular activities of rat liver catalase and superoxide dismutase in response to acute ethanol administration. *Alcohol Alcoholism.* **1985**, *20*: 13-18.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*: 933-956.
- Rintala, J.; Jaatinen, P.; Parkilla, S.; Sarvihararju, M.; Kiianmaa, K. Evidence of acetaldehyde adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcoholism.* **2000**, *35*: 458-463.

- Roberts, B.J.; Shoaf, S.E.; Jeong, K.S.; Song, B.J. Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 205: 1064-1071.
- Roux, J.C.; Baquey, C.H.; Sutton, J. The radiolysis of binary ethanol-water mixtures. *Rad. Phys. Chem.* **1973**, 5: 309-322.
- S. Kalachandra, D. Farhataziz and C. Foyt, Yields and decay kinetics of the solvated electron in pulse radiolysis of 1-alkanols. *Radiat. Phys. Chem.* **21**, 509-518 (1983).
- Sakurai, K.; Stoyanovsky, D. A.; Fujimoto, Y.; Cederbaum, A. I. Mitochondrial permeability transition induced by 1-hydroxyethyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 28: 273-280.
- Santiard, D.; Ribière, C.; Nordmann, R.; Houee-Levin, C. Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a γ radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 19: 121-127.
- Sargent, F.P; Gardy, E.M.; H.; Falle, R. Spin trapping of the primary radicals formed during radiolysis of liquid methanol. A direct method. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 24: 120-122.
- Sauer, M.C. Arai, S. Dorfman, L.M. Pulse radiolysis studies-VII. The absorption spectra and radiation chemical yields of the solvates electron in the aliphatic alcohols. *J. Chem. Phys.* **1965**, 42: 708-716.
- Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, 130: 2073S-2085S.
- Schlick, S. Kevan, L. Spin trapping of radicals formed in gamma-irradiated methanol: effect of irradiation temperature from 77 K to 300 K. *Chem. Phys. Lett.* **1976**, 38: 505-509.
- Schneider, H.; Schwiertz, A.; Collins, M.D.; Blaut, M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* **1999**, 171: 81-91.
- Scutt, A.; Meghji, S.; Canniff, J.P.; Harvey, W. Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia.* **1987**, 43: 391-393.
- Shi, X.; Long, F.H.; Lu, H.; Eisenthal, K.B. Electron solvation in neat alcohols. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99: 6917-6922.

- Shiotani, M.; Murabayashi S.; Sohma, J. Spin trapping of the short-lived free radicals formed in γ -irradiated alcohols. *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* **1976**, 8: 483-495.
- Stoyanovsky, D.A.; Wu, D.; Cederbaum, A.I. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and α -tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, 24: 132-138.
- Strubelt, O.; Younes, M.; Pentz, R. Enhancement by glutathione depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicology.* **1987**, 45: 213-223.
- Taub, I.A.; Dorfman, L.M. Pulse radiolysis study II: Transient spectra and rate processes in irradiated ethanol and aqueous ethanol solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84: 4053-4059.
- Thurman, R.G. Induction of hepatic microsomal NADPH-dependent production of hydrogen peroxide by chronic prior treatment with ethanol. *Mol. Pharmacol.* **1973**, 9: 670-675.
- Trouillas, P.; Calliste, C.A.; Allais, D.P.; Simon, A.; Marfak, A.; Delage, C.; Duroux, J.L. Antioxydant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbel tea. *Food chem.* **2003**, 80: 399-407.
- Urbain, W.M. *Food irradiation. Food Science Technology.* Orlando: Academic Press, **1986**.
- 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. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20: 331-342.
- Van Hoof, L.; Vanden Berghe, D.A.; Hatfield, G.M; Vlietinck, A.J. Plant antiviral agents: V-3-Methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis. *Planta Medica.* **1984**, 50: 513-517.
- Vasseur, J.P. *Ionisation des produits alimentaires.* Paris: Tec & Doc Lavoisier, **1991**, 441p.
- Vina, J. Estrella, J.M.; Guerri, C.; Romero, F.J. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **1980**, 188, 549-552.
- Walle, T.; Otake, Y.; Walle, U.K.; Wilson, F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J. Nutr.* **2000**, 130: 2658-2661.
- Wang, G.; Wu, J. Selecting ethanol as a model organic solvent in radiation chemistry-4: radiation chemistry of diallyl sulphide in ethanol solution. *Radiat. Phys. Chem.* **1999**, 55: 25-34.

- Wang, Y.; Crawford, M.K.; McAuliffe, M.J.; Eisenthal, K.B. Picosecond laser studies of electron solvation in alcohols. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 74: 160-165.
- Wargon, J.A.; Williams, E. Electron spin resonance studies of radical trapping in the radiolysis of organic liquids. I. Evidence for the primary formation of the methoxy radical in methanol. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94: 7917-7918.
- Winter, J.; Moore, L.H.; Dowell, V.R.; Bokkenheuser, V.D. C-ring Cleavage of Flavonoids by Human Intestinal Bacteria, *Appl. Environ. Microb.* **1989**, 55: 1203-1208.
- Zhang, G.; Thomas, J.K. Pyrene radical formation in pulse radiolysis of liquid methanol. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98: 11714-11718.

Résumé

Nous avons établi, pour la première fois, la relation structure – activité des flavonoïdes en tant que piègeurs des radicaux 1-hydroxyméthyl (HMR) et 1-hydroxyéthyl (HER) (deux radicaux carbonés-centrés reconnus pour leur implication dans des maladies hépatiques liées à la prise d'alcool).

Cette étude est réalisée en utilisant la radiolyse γ . Quatorze molécules représentant différentes classes de flavonoïdes sont irradiées dans le méthanol (système générateur de HMR) et dans l'éthanol (système générateur de HER).

Au cours de la radiolyse dans les deux solvants, les flavones, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavonoïdes glycosylés ne sont pas affectés par l'irradiation.

En revanche, les flavonols sont dégradés en produits de radiolyse. Parmi ceux-ci, nous avons détecté QM1, MM1, KM1 et GM1 (des depsides méthoxylés en C-8) comme étant les produits majoritaires de la dégradation dans le méthanol de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine, respectivement. Par analogie, dans l'éthanol, ces mêmes flavonols sont transformés en QE1, ME1, KE1 et GE1 (des depsides éthoxylés en C-8). Dans les deux solvants, nous avons observé la formation de Q2, M2, K2 et G2 (des depsides hydroxylés en C-8) mais en faibles quantités.

Les douze composés de radiolyse, identifiés par RMN et LC-MS, constituent une nouvelle série de molécules de la famille de depsides.

Le mécanisme réactionnel permettant la transformation des flavonols en depsides est proposé et confirmé par l'ensemble des résultats expérimentaux et par la modélisation moléculaire. Les flavonols réagissent avec HMR et HER et conduisent à leur inhibition. Les rendements radiolytiques de HMR et HER et leurs constantes de réactions avec les flavonols ont été calculés et témoignent de la bonne activité des flavonols sur ces radicaux.

Nous avons également étudié la radiolyse des flavonoïdes dans des mélanges eau/méthanol. Nous avons observé que les concentrations de Q2, M2, K2 et G2 augmentent avec le pourcentage d'eau présent dans le milieu d'irradiation. Cette étude peut contribuer à la compréhension des dégradations chimiques que peuvent subir les flavonoïdes au cours du traitement des aliments par irradiation.

La capacité des depsides, identifiés au cours de ce travail, à piéger les radicaux superoxyde et DPPH est également étudiée en utilisant la chimiluminescence et la RPE.

Abstract

We established, for the first time, relationships between the flavonoid structures and their capacity to scavenge the 1-hydroxymethyl radical (HMR) and the 1-hydroxyethyl radical (HER) (two carbon-centered radicals recognized for their implication in liver injuries of alcoholic subjects). In this investigation, we used γ -radiolysis.

Fourteen flavonoids including flavones, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavonoid glycosides and flavonols were irradiated in methanol (the HMR generator system) and in ethanol (the HER generator system). During radiolysis in both solvents, flavanones, flavones, flavan-3-ols, dihydroflavonols and flavonoid glucoside were not affected by irradiation, whereas, flavonols were degraded into several compounds. In the irradiated methanol-flavonol media, we detected QM1, MM1, KM1 and GM1 (depsides with a methoxyl group on C-8) as the major products formed after degradation of quercetin, morin, kaempferol and galangin, respectively. Similarly, these flavonols were transformed, in irradiated ethanol medium, into QE1, ME1, KE1 and GE1 (depsides with an ethoxyl group on C-8), respectively. In both irradiated media, we identified Q2, M2, K2 and G2 (depsides with a hydroxyl group on C-8) as minor radiolytic products. These twelve compounds, identified by NMR and LC-MS, constitute an original series of polyphenols belonging to the depside family. The flavonol-depside transformation mechanism was then proposed and confirmed according to all the experimental data and by molecular modeling.

The chemical yields of HMR and HER, and the rate constants for their reaction with flavonols were also calculated and used to compare the reactivity of flavonols on HER and HMR with reference compounds.

We also studied radiolysis of flavonoids in different water/methanol mixtures. We observed increasing of the Q2, M2, K2 and G2 concentrations with increasing of the water percentage present in the irradiation medium. This investigation can contribute in the comprehension of chemical degradation of flavonoids during treatment of aliments by irradiation.

The capacity of depsides to scavenger superoxide and DPPH radicals was also studied by chemiluminescence and EPR.

Key words:

γ -radiolysis, free radicals, flavonoids, HPLC, LC-MS, NMR, Chimiluminescence, EPR.