

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I

Année 2004

Thèse n°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**Docteur en Sciences
de l'Université Louis Pasteur**

Domaine : Pharmacochimie

Soutenue le 28 juin

Par

MILANE Hadi

La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-
oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et
applications thérapeutiques.

Jury de thèse :

Professeur DANGLES OLIVIER
Professeur EL BACHA RAFIC
Professeur ANTON ROBERT
Professeur UBEAUD- SEQUIER GENEVIEVE
Docteur VANDAMME THIERRY
Professeur JUNG LOUIS

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse
Co-encadreur de thèse
Examinateur

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur JUNG LOUIS pour m'avoir ouvert les portes de son équipe et guidé durant mes années de thèse. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

Je tiens également à remercier le Professeur UBEAUD-SEQUIER GENEVIEVE, sans qui ce travail n'aurait pas été possible, et avec qui j'ai pu avoir de passionnantes discussions scientifiques.

J'adresse également mes remerciements au Dr. VANDAMME THIERRY pour ses conseils fréquents et avisés. Son esprit de synthèse et son érudition restent pour moi un exemple à suivre.

Je remercie les Professeurs ANTON ROBERT, DANGLES OLIVIER et EL-BACHA RAFIC qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux professeurs KOFFEL JEAN-CLAUDE, PABST JEAN-YVES pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Un grand merci au Dr ZHAO MIN-JIE pour son aide et ses conseils, ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré dans mes travaux.

Une pensée particulière pour les Drs. INGENBLEEK YVES, LEIBENGUTH ANTOINE et STAMBACH JEAN-FRANCOIS pour leur bonne humeur, leur aide et leurs encouragements.

Je n'oublie pas Monsieur RAHIM et Madame HILPERT pour leur disponibilité au quotidien.

Je remercie tous les étudiants qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail en particulier Mademoiselle AGUILAR BEATRICE et Monsieur AL-AHMAD ABRAHAM.

Une pensée pour tous mes amis qui m'ont soutenu au cours de ces années.

J'e remercie tout l'équipe de l'UMR 7034.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père et mes frères, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de ces quatre années à l'étranger.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMP	Adénosine mono-phosphate
AMPC	Adénosine mono-phosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
Cyto.C	Ferricytochrome C
DIHEQ	4' -7di-(O-hydroxyéthyl) quercétine
DiHER	4' -7di-(O-hydroxyéthyl) rutine
DMBA	7,12 diméthylbenz(a)anthracène
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DMPO	5,5-diméthyl 1-pyroline N-oxyde
DOS°	Radical daunorubicine
e⁻	Electron
EDTA	Acide Ethylène-diamine tétra-acétique
FAD	Flavine-Adénosine-Dinucléotide
FADH	Flavine-Adénosine-Dinucléotide, forme réduite
Fe²⁺	Ions ferreux

Fe³⁺	Ions ferriques
FeCl₃	Chlorure de fer
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H⁺	Proton
HCIO	Acide hypochloreux
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque
HSP	Heat Shock Proteins
IC₅₀	Concentration à 50% d'inhibition
JDE	Jonction dermo-épidermique
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Phospholipide membranaire
MDA	Malondialdehyde
MeOH	Méthanol
MonoHEQ	7 mono(O-β-hydroxyéthyl) quercétine
MonoHER	7 mono(O-β-hydroxyéthyl) rutine
NADH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate
NaOH	Soude
NBT	Bleu de nitrotétrazolium
NMU	N-nitrosométhylurée
¹O₂	Oxygène singulet
O₂	Oxygène moléculaire
O₂^{•-}	Anion superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyle
ODC	Ornithine décarboxylase
PGG₂/H₂	Prostaglandines G ₂ /H ₂
PLA₂	Phospholipase A ₂
PMC	Paraméthoxycinnamate
ROO[•]	Radical peroxyde

RPE	Résonance paramagnétique électronique
SQ°	Radical semiquinone
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TPA	12-0-tétradécanoyphorbol-13-acétate
UV	Ultraviolet
VIS	Visible
X.O.	Xanthine-oxydase

SOMMAIRE

INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE	
CAPTURE DES RADICAUX HYDROXYLE ET SUPEROXYDE PAR LES HYDROXYFLAVONES ET LEURS FORMES IONIQUES	
CHAPITRE 1 (Rappels Bibliographiques)	
I- RADICAUX LIBRES OXYGENES	13
I. Radicaux libres oxygénés (rôles et moyens de défenses)	13
I.1. Principaux radicaux libres et leur origine	13
I.1.a Production endogène de radicaux libres	14
I.1.b Formation de radicaux libres par voie exogène	16
I.2. Rôle pathogène des radicaux libres	17
I.3. Les moyens de défense contre les radicaux libres	19
I.3.a Moyens de défense endogènes	19
I.3.b Moyens de défense exogènes : les piègeurs	21
II. Conclusion	22
II- LES FLAVONOÏDES : GENERALITES	23
I. Découverte des flavonoïdes	23
II. Diversité des composés phénoliques	23
II.1. Définition	24
II.2. Biosynthèse	25
II.3. Structure chimique et classification	28
III. Source	29
IV. Propriétés des flavonoïdes	31
IV.1. Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire	31
IV.2. Propriétés antivirales et antibactériennes	31
IV.3. Propriétés anti-carcinogènes	32
IV.4. Propriétés antioxydantes et impact sur la peroxydation lipidique	33
IV.5. Propriétés prooxydantes des flavonoïdes	35
IV.6. Biodisponibilité des flavonoïdes	36
V.6.	
CHAPITRE 2 (Etudes expérimentales)	
I- CAPTURE DE L'ANION SUPEROXYDE	37
I. Choix de la méthode	37
I.1. Systèmes de production et de détection de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)	37
I.1.a Systèmes de production de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)	38

I.1.b Système de détection de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)	38
I.2. Principe de production et de détection du radical superoxyde choisis	40
II. Matériels et méthodes	41
II.1. Préparation des différentes solutions	41
II.2. Mode opératoire	41
II.3. Validité de la méthode	42
II.4. Choix des hydroxyflavones	43
III. Résultats et discussions	44
II- CAPTURE DU RADICAL HYDROXYLE	46
I. Choix de la méthode	46
I.1. Production et détection du radical hydroxyle	46
I.2.a Production du radical hydroxyle	46
I.2.b Détection du radical hydroxyle	47
I.2. Réaction de Fenton choisie pour étudier l'activité de capture du OH^{\bullet}	48
I.2.a Production des radicaux hydroxyles	48
I.2.b Principe de détection du radical hydroxyle	49
II. Matériels et méthodes	51
II.1. Matériels	51
II.2. Préparation des solutions	51
II.3. Protocole expérimental	51
II.4. Molécule de référence	52
III. Résultats et discussions	52
IV. Conclusion	53
III- ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES HYDROXYFLAVONES APRES DISSOLUTION PAR LA SOUDE A PH 10	54
I. Introduction	54
II. Matériels et méthodes	55
II.1. Préparation des solutions alcalines de quercétine et d'autres flavonoïdes	55
II.2. Etude de stabilité des flavonoïdes	56
II.2.a Spectroscopie UV/Visible	57
II.2.b Chromatographie liquide	58
III. Résultats de la capture des radicaux libres oxygénés par les flavonoïdes préparés à pH 10.	59
III.1. Résultats de capture de l'anion superoxyde	59
III.2. Résultats de capture du radical hydroxyles	63
IV. Discussions	64
V. Conclusion	65
DEUXIEME PARTIE SELS SODIQUES DE QUERCETINE	

I- SEL MONOSODIQUE, SEL DISODIQUE, SEL TRISODIQUE DE QUERCÉTINE **68**

I. Introduction	68
I.1. Explication théorique des différentes acidités de la quercétine	68
I.2. Explication théorique des différentes formes ioniques de la quercétine	70
II. Mise en évidence de 3 formes anioniques de la quercétine dans la solution préparé à pH 10	70
II.1. Vérification pratique des acidités par pH-métrie	70
II.2. Analyse de solution alcaline de quercétine par CLHP	71
III. Préparation et propriétés physicochimiques des 3 sels de quercétine	72
III.1. Préparation des sels de quercétine à partir des <i>pKas</i> données par <i>Kadykova</i>	72
III.2. Propriétés physicochimiques des différents produits précipités (sels de quercétine)	73
III.3. Analyse par spectrophotométrie d'émission de Na des sels de quercétine isolés	74
III.4. Analyse par H ¹ RMN des sels de quercétine	75
III.5. Analyse par CLHP des sels de quercétine isolés	76
IV.5. Analyse par C ¹³ RMN du sel disodique de quercétine	76
IV. Conclusion	77

II- SEL DISODIQUE DE QUERCÉTINE **78**

I. Détermination de l'impact de la préparation à différents pH sur la capture du radical OH[•]	78
II. Capture du radical OH[•] par le sel disodique isolé	79
III. Détermination de la structure responsable de cette activité	79
III.1. Synthèse de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique	81
III.2. Identification de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique	82
III.2.a Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge	82
III.2.b Spectroscopie UV / VIS	82
III.2.c Spectroscopie de résonance magnétique protonique (¹ HRMN)	82
III.3. Etude de la capture du OH [•]	83
IV. Conclusion	83

III- Paramètres physicochimiques liée à l'activité de capture du radical hydroxyle **84**

I. Détermination des constantes d'acidité des molécules	84
I.1. Généralités	85
I.2. Matériels et méthodes	86
I.2.a Détermination des constantes d'acidité des composés solubles en milieux aqueux	86

I.2.b Appareillage	87
I.2.c Mode opératoire	87
I.2.d Préparation des solutions	88
I.2.e Causes d'erreurs et d'imprécision	88
I.2.f Détermination des constantes d'acidité des composés peu solubles en milieu aqueux	88
I.2.g Méthode de calcul et détermination des pK_a	89
I.3. Résultats	90
II. Relations entre les paramètres physicochimiques et l'activité de capture du radical hydroxyle des dérivés phénoliques.	91
II.1. Relation entre le pK_a et la constante de capture de OH°	91
II.2. Effet de la salification sur la constante de capture de radical OH°	92
II.3. Effet de la position d'un deuxième groupement hydroxyle phénolique sur la constante de capture du radical OH°	93
II.4. Effet de la présence d'une fonction très acide (carboxylique) sur la constante de capture du radical OH°	94
II.5. Effet de pK_a sur K_s en présence de la fonction catéchol	94
III. Conclusion	94

TROISIEME PARTIE

APPLICATION THERAPEUTHIQUE

I- Application cutanée	97
I. Généralités	98
I.1. Structure histologique de la peau	98
I.2. L'épiderme	98
I.2.a Les kératinocytes de l'épiderme	98
I.2.b Les cellules non épithéliales de l'épiderme	99
I.2.c Les annexes épidermiques	99
I.2.d La jonction dermo-épidermique (JDE)	99
I.3. Le derme	100
I.3.a Les fibres	100
I.3.b La substance fondamentale amorphe	100
I.3.c Les cellules résidentes du derme	100
I.4. L'hypoderme	101
I.5. Peau et filtre solaire	101
I.6. Peau et radicaux libres	102
I.7. Peau reconstituée pour l'étude de biodisponibilité cutanée	102
II. Partie expérimentale	103
II.1. Formulation de la crème	103
II.1.a Définition des pommades	103
II.1.b Choix de la forme thérapeutique	103
II.1.c Composition de la crème	103
II.1.d Préparation de la crème	104

II.1.e Améliorations éventuelles	104
II.2. Etude du sel disodique de quercétine comme protecteur solaire	105
II.2.a Préparation des solutions	105
II.2.b Méthode	105
II.2.c Résultats	105
II.2.d Conclusion	105
II.3. Stabilité du sel disodique de quercétine	105
II.3.a Préparation des solutions	105
II.3.b Méthode analytique	106
II.3.c Résultats	106
II.4. Validation de la méthode de dosage selon la SFSTP	107
II.4.a But de la validation	107
II.4.b Critères et étude de validation	107
II.5. Etude de la pénétration cutanée	114
II.5.a L'absorption percutanée	114
II.5.b Choix de la méthode	116
II.5.c Etude de la pénétration percutanée du sel disodique de quercétine	118
III. Conclusion	125
II- Absorption intestinale	126
I. Généralités	126
I.1. Rappels sur le tractus intestinal	126
I.2. Mécanismes de passage intestinal d'une substance pharmacologique	127
I.2.a Mécanismes de passage transcellulaire	129
I.2.b Mécanismes de passage paracellulaire	131
II. Choix de la méthode d'étude de l'absorption intestinale du sel disodique de quercétine	132
II.1. Description des modèles expérimentales d'absorption intestinale	132
II.1.a Modèles <i>in vivo</i> / <i>ex vivo</i>	132
II.1.b Modèles <i>in vitro</i>	133
II.2. Conclusion	133
III. Etude expérimentale	135
III.1. Matériels et Méthodes	135
III.1.a Modèle Caco2	135
III.1.b Méthodes analytiques	137
III.2. Résultats et Discussions	140
III.2.a Transport du sel disodique de quercétine	140
III.2.b Comparaison de l'absorption de la quercétine et du sel disodique de quercétine	143
III.3. Conclusion	146

QUATRIEME PARTIE
DISCUSSION GENERALE

Discussion générale	147
I. Identification de la quercétine et des trois formes anioniques de quercétine par chromatographie liquide utilisant un couplage à barrette de diodes comme détecteur (colonne C18, 250 mm/4,6 mm)	147
II. Identification de la quercétine et des sels correspondants par chromatographie liquide (colonne C18, 250 mm/4 mm) après transformation par acidification, des trois sels en quercétine de départ.	148
III. Etude de l'influence des constituants phosphates de milieu tampon sur la salification de la quercétine et dérivés.	149
IV. Etude comparative du spectre d'absorption de la quercétine et des sels sodiques de la quercétine isolés.	150
V. Confirmation des structures du sel monosodique et du sel disodique de la quercétine par spectrométrie de masse.	151
VI. Acidité de la quercétine	151
VII. Etude comparative des entités sodiques de la quercétine et des entités potassiques de la quercétine.	152
Conclusion	152
CONCLUSION GENERALE	153
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXES	

INTRODUCTION

L'organisme produit quotidiennement des radicaux libres, composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux. La surproduction des radicaux libres peut être néfaste pour l'organisme. Ils endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers que les protéines, les lipides ou l'ADN. Les réactions radicalaires sont d'autant plus destructrices qu'elles se propagent en chaîne: les molécules déstabilisées par un électron célibataire deviennent à leur tour des radicaux libres.

Les capteurs de radicaux libres ont pour rôle de stopper ce processus en neutralisant ces composés très réactifs, pour réduire leur nocivité.

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols. De nombreux travaux publiés ces dernières années ont démontré que les hydroxy-flavones possèdent un pouvoir antioxydant encore plus puissant que la vitamine C. Les hydroxyflavones appartiennent à la famille des flavonoïdes. Ce sont des substances très répandues dans le règne végétal faisant partie intégrante de notre nourriture journalière. Elles ont été décrites comme ayant un grand nombre de propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Plus récemment, un fort intérêt a été centré sur les tanins et plus particulièrement sur les procyanidines pour leur puissant pouvoir antioxydant. Les hydroxyflavones ont été longuement étudiées pour leur activité antioxydante leur permettant de capter les radicaux libres, à l'origine de différents états pathologiques et par extension du vieillissement des cellules.

Avant tout, les hydroxyflavones jouent un rôle important, mais encore mal cerné, dans la croissance des fruits. Elles apparaissent comme étant essentielles pour le goût (astringence, amertume ...), la qualité du fruit (couleur, forme...) et sa résistance aux stress. Pour ce qui est de leur intérêt pharmaceutique, la complexité de leur étude rend les conclusions parfois difficiles.

Des études antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que certains aglycones de flavonoïdes, comme la quercétine, présentent dans certains modèles des propriétés antioxydantes et dans d'autres un caractère pro-oxydant. La difficulté de solubiliser cette molécule a rendu impossible la détermination du véritable potentiel de capture du radical hydroxyle par le système de Fenton.

Ainsi l'objectif de notre travail a consisté, dans une première partie, en l'étude de l'activité de capture des radicaux libres (hydroxyles et superoxydes) d'une série d'hydroxy-flavones du type quercétine et dérivés. La formation de sels de sodium a permis de s'affranchir des problèmes de solubilité.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux différentes formes salifiées de la quercétine, dans le but de déterminer la structure la plus active vis-à-vis de la capture des radicaux libres. Dans cette optique, une étude de relation entre l'activité de capture du radical hydroxyle et les propriétés physicochimiques (pK_a , positions des groupements hydroxyles, ...) de 18 molécules phénoliques a été réalisée.

Dans une troisième partie deux applications ont été envisagées concernant le sel disodique de quercétine, molécule présentant la plus forte activité antioxydante par capture du radical hydroxyle libre:

- La première application est réalisée au niveau cutané. Elle consiste à étudier la biodisponibilité au niveau de l'épiderme humain de ce sel, dans une formulation, sous forme de crème, en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*. Le modèle *in vitro* consiste en l'étude de l'absorption de ce sel disodique de quercétine à travers les différentes assises cellulaires en utilisant un morceau d'épiderme de peau humaine reconstituée (Laboratoire SkinEthic). Parallèlement à cette étude *in vitro*, une première évaluation sur un volontaire sain, participant aux travaux de recherches, est réalisée afin d'établir une corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux obtenus *in vivo*.

- La deuxième application est réalisée au niveau du transport intestinal. Elle consiste à étudier l'absorption de ce sel au travers de la membrane intestinale en utilisant un modèle in vitro de cellules, les Caco-2 (adénocarcinomes de côlon humain présentant les caractéristiques morphologiques et biochimiques d'absorption d'un intestin adulte normal). Ce modèle est couramment utilisé en recherche et développement préclinique de nouvelles molécules. Ces études d'absorption intestinale sont nécessaires afin d'évaluer la quantité absorbée et le mécanisme d'absorption après administration orale de ce sel pour un traitement éventuel dans les maladies inflammatoires intestinales productrices de radicaux libres oxygénés comme la maladie de Crohn.

PREMIERE PARTIE
CAPTURE DES RADICAUX HYDROXYLE ET
SUPEROXYDE
PAR LES HYDROXYFLAVONES ET LEURS
FORMES IONIQUES

CHAPITRE UN
Rappels Bibliographiques

I - RADICAUX LIBRES OXYGENES

Dans les molécules, les atomes sont assemblés par des liaisons covalentes établies par mise en commun d'électrons de spins opposés. Tout apport d'énergie suffisant est susceptible d'entraîner la rupture de ces liaisons et donc de donner naissance à des entités chimiques qui possèdent un électron non apparié, dit « célibataire », sur une orbitale externe. Ces entités chimiques sont appelées radicaux libres. Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les formes activées de l'oxygène. La réactivité particulière de l'oxygène est due à la structure bi radicalaire de la molécule. En effet, si l'oxygène moléculaire est très stable vis-à-vis des substances à électrons appariés, la molécule réagit énergétiquement avec les radicaux libres.

Les radicaux libres sont issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être, produits lors de « déviations » du métabolisme cellulaire [Fulbert et Cals; 1992].

III. Radicaux libres oxygénés (rôles et moyens de défenses)

I.1. Principaux radicaux libres et leur origine

Les principaux radicaux libres dérivés de l'oxygène sont les suivants :

- l'anion superoxyde : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions

- le radical hydroxyle : OH^{\bullet} . Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique

- le radical peroxyde : ROO^{\bullet}

- l'oxygène singulet : 1O_2 , forme-« excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

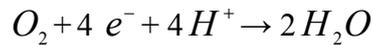
Les radicaux libres sont très instables, leur durée de vie est généralement très courte (10^{-4} seconde). Leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire ; elle entraîne la propagation du phénomène par création d'un nouveau radical. Dans les milieux vivants, la diffusion du processus est limitée par la compartimentation tissulaire. D'une manière générale, la fin de la réaction en chaîne peut se produire :

- par la recombinaison des radicaux entre eux : $R_1^{\bullet} + R_2^{\bullet} \rightarrow R_1 - R_2$. Ceci est possible s'il s'agit de chaînes organiques contenant uniquement des liaisons saturées

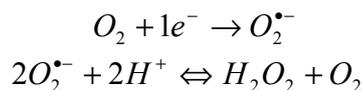
- par l'intervention de systèmes antioxydants entraînant le piégeage des radicaux libres. Il s'agit d'enzymes (superoxyde dismutases, catalase, peroxydases) et de molécules telles que la quercétine. Ces systèmes antioxydants ont une action membranaire ou intracellulaire.

I.1.a. Production endogène de radicaux libres

Lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire des cellules aérobies, la respiration oxydative est la principale source d'énergie. L'acétylcoenzyme A issue des métabolismes glucidique, protidique et lipidique entre dans le cycle de KREBS pour l'oxydation complète du reste acétyle en $CO_2 + H_2O$. Les électrons sont transportés sous forme de coenzymes réduites ($FADH_2$, $NADH$, $NADPH$) qui vont transférer leur pouvoir réducteur sur les systèmes transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire et permettre la synthèse d'ATP. L'étape ultime de la chaîne respiratoire mitochondriale est la synthèse d'eau à partir de l'oxygène :



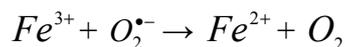
Une réduction incomplète de l' O_2 peut apparaître pour 1 à 2% de l'oxygène moléculaire conduisant à la formation de radicaux libres oxygénés : l'oxygène singulet 1O_2 et surtout l'anion $O_2^{\bullet -}$. Si l'anion superoxyde est libéré dans un milieu dépourvu de protons, il peut exercer ses effets délétères : de tels milieux se rencontrent au sein des doubles couches phospholipidiques des membranes cellulaires dont la structure aurait tendance à augmenter la durée de vie des radicaux libres. Si cet anion est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, phénomène au cours duquel l'anion $O_2^{\bullet -}$ cède son électron célibataire à un autre anion superoxyde qui devient l'anion O_2^{2-} ; ce dernier réagit alors avec les protons du milieu pour donner le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :



En présence de fer ferreux, le peroxyde d'hydrogène se décompose en OH^- et OH^\bullet selon la réaction de FENTON :



L'anion superoxyde permet aussi de reformer du fer ferreux à partir du fer ferrique :

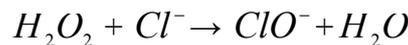


L'oxygène formé peut à nouveau entrer dans la chaîne respiratoire et donner $O_2^{\bullet -}$. Globalement, cette suite de réactions est appelée cycle d'HABER WEISS. La vitesse de la réaction de dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ est maximale à pH = 4,8, mais est très lente à pH = 7. Une enzyme intervient dans l'organisme pour accélérer cette réaction : la superoxyde dismutase (SOD), qui multiplie par 10^{10} la vitesse de la réaction au pH de l'organisme.

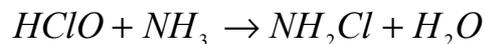
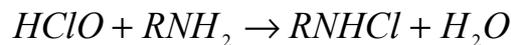
Au cours de la défense antibactérienne, lors de la réaction inflammatoire qui accompagne toute infection, les cellules phagocytaires activées vont libérer des enzymes, des médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine, et l'anion superoxyde accompagné d'autres dérivés oxygénés comme l'acide hypochloreux ($HClO$) et les radicaux OH^\bullet , H_2O_2 et 1O_2 . La phagocytose des germes bactériens s'accompagne, en effet, d'une production massive d'anions superoxydes par le métabolisme leucocytaire : c'est ce qu'on appelle la « flambée respiratoire ». Une NADPH oxydase, activée par la protéine kinase C et l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A_2 (PLA_2) intervient et permet la synthèse de $O_2^{\bullet-}$ au prix d'une forte consommation d' O_2 :



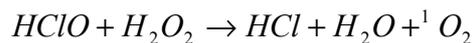
Les radicaux superoxydes constituent l'élément clé de ce mécanisme. Ils subissent ensuite une dismutation soit spontanée soit enzymatique. Enfin, une enzyme présente dans le phagosome, la myéloperoxydase, catalyse en présence de H_2O_2 et d'ions Cl^- la formation de dérivés halogénés toxiques :



L'acide hypochloreux ($HClO$) peut à son tour réagir avec les fonctions aminées ou l'ion ammonium pour donner des chloramines :



En présence de peroxyde d'hydrogène, $HClO$ donne naissance à l'oxygène singulet :



Un leucocyte activé contient donc de fortes proportions de radicaux $O_2^{\bullet-}$, OH^\bullet , 1O_2 et chloramines aux propriétés bactéricides. Ainsi, les radicaux libres peuvent avoir des effets positifs : ils participent à la lutte contre l'infection en lysant les bactéries phagocytées. Un déficit dans la production des radicaux libres par les leucocytes (granulomatose septique) ou une baisse de l'activité de la myéloperoxydase (corticothérapie) se caractérise d'ailleurs par une sensibilité particulière aux infections.

Lors de la synthèse des prostaglandines, la PLA_2 catalyse la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Deux enzymes, la lipooxygénase et la cyclooxygénase, liées aux membranes plasmiques et microsomales, transforment l'acide arachidonique en dérivés tels que le thromboxane, les prostaglandines ou les leucotriènes. Après action de la lipooxygénase, la transformation d'un hydroperoxyde, l'acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque (HPETE) en acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) s'accompagne de la libération du radical hydroxyle OH^\bullet . HILL et al. en 1989, ont mis en évidence le rôle de la glutathion peroxydase (GSH-Px) et du glutathion dans cette réaction. En bloquant l'activité de la GSH-Px par le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, ils ont observé une diminution importante (66%) de la conversion de HPETE en HETE. Sous l'action de la cyclooxygénase, l'acide

arachidonique incorpore 2 molécules d'oxygène pour former un endoperoxyde, le PGG₂. Ce dernier perd sa fonction hydroperoxyde pour donner le PGH₂ porteur d'un OH⁻. Cette transformation s'accompagne de la libération d'un radical OH[•] qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la synthèse des prostaglandines en inactivant la cyclooxygénase.

I.1.b. Formation de radicaux libres par voie exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres (O₂⁻, OH[•], U₂[•]) et de molécules génératrices de radicaux libres (H₂O₂) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d'O₂⁻. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase, et du cytochrome P 450. Enfin, Schisler et Singh (1989) ont montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH-Px). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère.

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires.

La réaction peut être réversible :



Ou irréversible :



NO et NO₂ peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux OH[•]. La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient NO et NO₂, renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires. D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons. Il en est ainsi du tétrachlorure de carbone (CCl₄) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux CCl₃[•] et mis en évidence dans des hépatocytes de rat par résonance paramagnétique électronique (RPE). La réduction de CCl₄ en CCl₃[•] s'effectue, soit sous l'action du cytochrome P450 hépatique CCl₄ + e⁻ → Cl⁻ + CCl₃[•], soit en présence de fer ferreux (CCl₄ + Fe²⁺ → Fe³⁺ + Cl⁻ + CCl₃[•]). KNECHT et MASON en 1988, ont montré que le CCl₃[•] était capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés, et donc de provoquer une augmentation importante des hydroperoxydes lipidiques.

Enfin, des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ils agissent selon un mécanisme de transfert

d'électrons. Ainsi, selon les travaux de *Sinha et al. (1989)*, réalisés sur des cultures de cellules tumorales mammaires, l'adriamycine est bioactivée en radical semiquinone de l'adriamycine (SQ^\bullet) par réduction enzymatique (cytochrome P450). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine (DOS), la réduction en radical libre (DSO^\bullet) se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN.

I.2. Rôle pathogène des radicaux libres [Singal et al.; 1988]

Toxicité cellulaire des radicaux libres : principales cibles radicalaires.

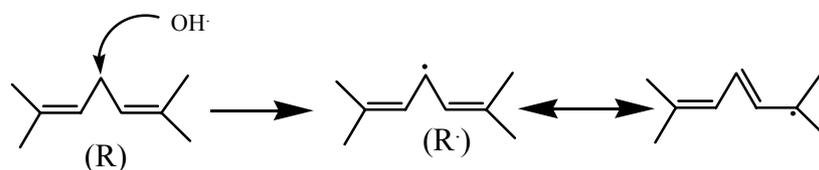
- L'ADN : les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins. Les cassures observées sont dues aux radicaux OH^\bullet issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN. La prévention de ce processus par l'addition de catalase montre le rôle du peroxyde d'hydrogène dans les lésions de l'ADN.

- Les macromolécules : les radicaux libres sont également responsables d'inactivation enzymatique en particulier des sérine-protéases, d'une fragmentation des macromolécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique), de formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques. Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine, la cystéine.

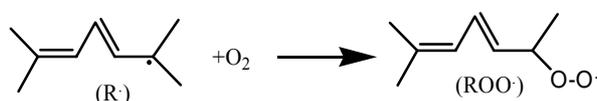
- Les lipides : ils sont une cible privilégiée des radicaux libres qui provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Le phénomène d'auto-oxydation ou peroxydation lipidique consiste en l'attaque par un radical libre, d'origine exogène ou endogène, de dérivés lipidiques.

Le radical formé (R^\bullet) subit un réarrangement interne, dû à une tautomérie liée au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire, et existe donc sous 2 formes en équilibre (figure 1) [Fulbert et Marie-Josèphe ; 1992] :

Initiation



Addition de l'oxygène



Propagation et amplification

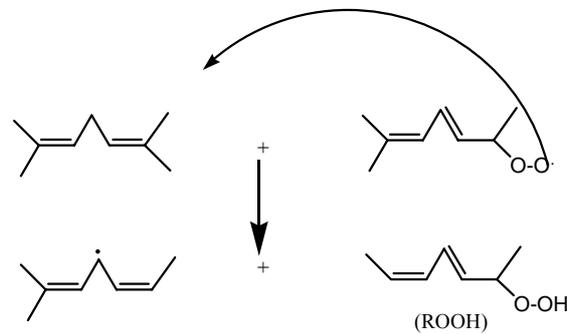
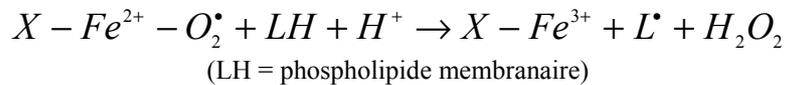


Figure 1. Mécanisme de la peroxydation lipidique.

En présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde (ROO^{\bullet}) qui déstabilise une deuxième molécule d'AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique ($ROOH$) et à un nouveau radical R^{\bullet} . Cette auto-oxydation se propage et s'amplifie d'un acide gras à l'autre. L'étape d'initiation est, dans ce cas, le fait de l'intervention d'un OH^{\bullet} mais peut également être due à une particule ou un photon de haute énergie, ou à un atome ferreux complexé par certaines molécules organiques selon le mécanisme suivant :



La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La réaction en chaîne prolonge les effets intramembranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques : les hydroperoxydes et leurs dérivés. Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxydes. Parmi leurs dérivés, le MDA (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène.

I.3. Les moyens de défense contre les radicaux libres

I.3.a Moyens de défense endogènes. [Avisar et al. en 1989]

Pour protéger ses tissus contre toute agression radicalaire, l'organisme humain possède des systèmes enzymatiques, tels que les superoxydes dismutases et la catalase qui jouent un rôle de protection, ainsi que les glutathion-peroxydases (GSH-Px) qui jouent un rôle de détoxication.

- Les superoxyde-dismutases : 2 formes se rencontrent chez les eucaryotes. La plus importante présente dans le cytoplasme de toutes les cellules, a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD). L'autre enzyme a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD) et est située dans les mitochondries.

* Les superoxyde-dismutases exercent une action cellulaire protectrice : elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde.

La localisation des SOD explique que les membranes externes et les espaces intersticiels sont moins bien protégés que les structures intracellulaires.

* Les superoxyde-dismutases sont utilisées en thérapeutique : dans les maladies inflammatoires chroniques, les anions superoxydes relargués par les phagocytes activés stimulent et amplifient la réponse inflammatoire. L'administration de SOD peut prévenir les lésions tissulaires dues à l'anion superoxyde. Les SOD semblent également réduire l'étendue de l'infarctus du myocarde.

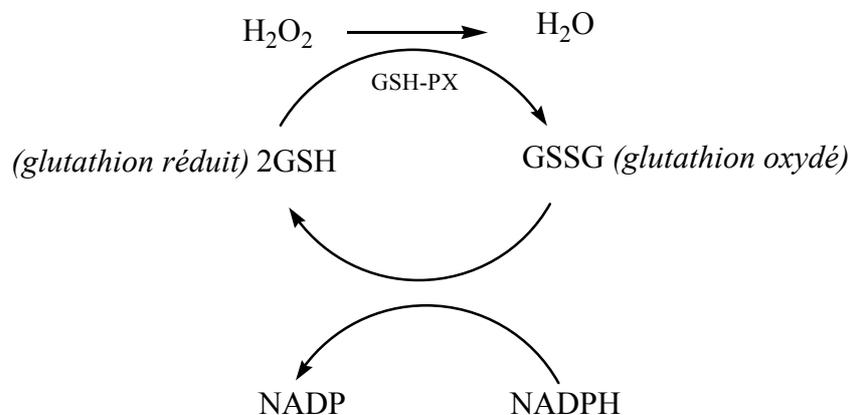
- Les glutathion - peroxydases : les glutathion-péroxydases sélénio-dépendantes sont des protéines qui contiennent 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine.

Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure. *Avissar et al.* (1989) ont, à partir de cultures cellulaires, individualisé 2 formes de GSH-Px qui diffèrent par leur structure, leur activité et leurs sites antigéniques :

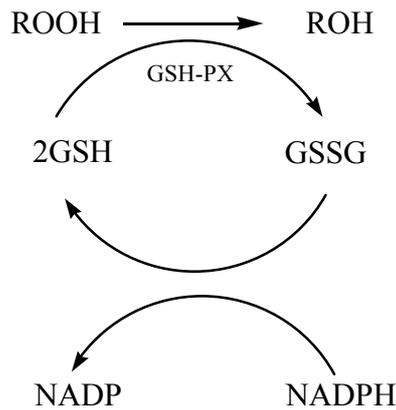
- une forme à localisation intracellulaire
- une forme glycosylée riche en ponts disulfures, à localisation extracellulaire.

Les GSH-Px ont une action détoxiquante vis-à-vis de 2 substrats :

- le peroxyde d'hydrogène :

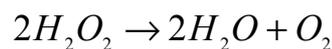


- les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides:



L'activité de détoxification des GSH-Px face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la PLA₂. Cette dernière libère les peroxydes d'acides gras des membranes cellulaires en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes libérés dans le cytosol sont alors transformés par la GSH-Px tandis que la chaîne d'acides gras manquante est resynthétisée.

- La catalase : elle permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène :



Elle est localisée dans les peroxysomes des cellules et empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton. Mais son rôle semble mineur par rapport à celui de la GSH-Px pour prévenir la peroxydation lipidique : son affinité pour le peroxyde d'hydrogène est inférieure à celle de la GSH-Px.

I.3.b Moyens de défense exogènes

Toute substance capable de capter l'électron célibataire d'un radical libre sans donner elle-même un produit radicalaire est définie comme un piègeur de radicaux libres. Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les radicaux libres et leur spécificité pour certains d'entre eux.

Il existe des « piègeurs occasionnels » de radicaux libres. Ce sont des molécules endogènes qui captent les électrons célibataires aux dépens de leur propre intégrité, comme par exemple les acides gras insaturés, les fonctions thiols de protéines, l'ADN et les acides aminés phénoliques.

Les autres principaux piègeurs sont les chélateurs du fer et du cuivre et les antioxydants comme les caroténoïdes, l' α -tocophérols, la vitamine C et les flavonoïdes. Ces derniers seront détaillés dans le chapitre suivant.

- Les caroténoïdes : ils sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres. D'après *Burton et Ingold (1984)*, l'effet antioxydant du β -carotène serait dû à une interaction entre le radical et le système de

doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur. Le β -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes : le radical peroxyde se fixerait sur un carbone de la chaîne polyinsaturée et serait stabilisé par résonance. L'effet antioxydant des caroténoïdes serait dépendant de la pression d'oxygène. Différents systèmes *in vitro* ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées *in vivo* sont peu nombreuses et le rôle antiradicalaire des caroténoïdes reste à préciser.

- La vitamine E ou l' α -tocophérol : Sa structure lui permet de capter les radicaux libres :

- dans les zones lipophiles des membranes cellulaires, grâce à sa chaîne phytyle,
 - dans les zones hydrophiles, à la surface des membranes plasmiques, grâce à son hydroxyle phénolique.
- L' α -tocophérol réagit avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation [Liebler et al.; 1986].

L' α -tocophérol est également un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux. HNO_2 ainsi transformé ne peut plus réagir avec les fonctions amides des molécules pour donner des nitrosamides.

- La vitamine C : l'action de la vitamine C est très controversée quant à son effet protecteur ou activateur face à la toxicité de l'oxygène. Selon le pH et la présence de métaux de transition, la vitamine C peut prendre une forme réduite ou oxydée. Le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, le radical ascorbyle, et en présence de glutathion/glutathion-réductase. La vitamine C forme donc un couple redox - avec une forme intermédiaire radicalaire - capable de capter l'oxygène singulet et certaines espèces radicalaires. C'est ainsi qu'elle protégerait la peau de la toxicité induite par les rayonnements UV mais, à forte concentration, la vitamine C peut se comporter comme un pro-oxydant générateur de radicaux libres.

Outre les moyens de défense précédemment décrits dont peuvent disposer les tissus vivants contre l'agression radicalaire, l'organisme serait capable d'acquérir une certaine tolérance ou résistance vis-à-vis des radicaux libres. Ainsi, un prétraitement par une dose non létale de H_2O_2 est capable d'induire, chez *Salmonella typhimurium*, la synthèse de certaines protéines qui lui permettront ultérieurement de résister à la cytotoxicité de H_2O_2 [Christman et al.; 1985]. Ces protéines, mises en évidence chez tous les organismes vivants et conservées au cours de l'évolution, appartiennent à une famille protéique dont la synthèse peut être induite ou stimulée lors de stress divers, essentiellement physique et chimique (particulièrement oxydant). On ne connaît pas encore de façon certaine leur mode de fonctionnement mais ces HSP (Heat Shock Proteins ou Protéines de Stress Cellulaire) auraient un rôle d'interaction soit avec des protéines naissantes, soit avec des protéines altérées, pour les aider à acquérir ou à recouvrir une structure finale normale [Lii et Graig ; 1988].

II. Conclusion

On peut donc se rendre compte de la diversité des circonstances dans lesquelles se forment les radicaux libres. Cette production radicalaire est constante et entretenue par des éléments comme le fer et surtout par l'oxygène dont l'affinité pour les électrons célibataires est élevée. Ces radicaux libres sont à l'origine d'une certaine toxicité cellulaire (altération de l'ADN, de macromolécules et des membranes).

Comme nous l'avons mentionné, l'organisme dispose d'un système de défense cellulaire très élaboré et très efficace contre l'agression radicalaire, complété par les apports alimentaires en substances antioxydantes telles que la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes essentiellement. Il en résulte, grâce à ces agents protecteurs, une certaine tolérance de l'organisme vis-à-vis du stress oxydatif. Les flavonoïdes sont actuellement d'ailleurs très étudiés dans le domaine des thérapeutiques antioxydantes, pour compenser l'insuffisance des moyens naturels de protection dans certains désordres comme le vieillissement physiologique et pathologique.

II- LES FLAVONOÏDES : GENERALITES

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV.

I. Découverte des flavonoïdes

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de *Szent Gyorgyi en 1938*. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines ; par contre, les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer

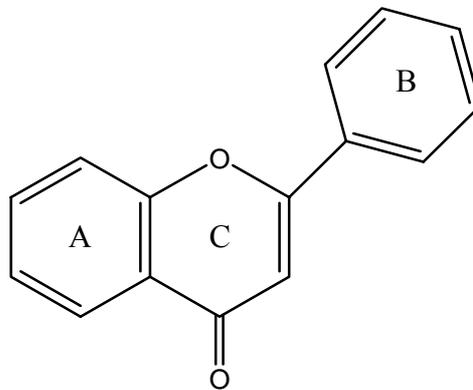
des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses que nous présenterons dans cette partie de la thèse.

II. Diversité des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité dont les flavonoïdes font partie. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour. Ainsi, nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale.

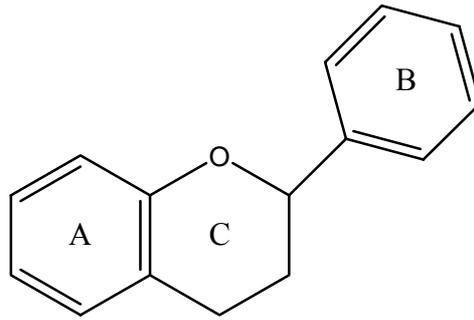
II.1. Définition

- Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau FLAVONE ou 2-PHENYL CHROMONE portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.



NOYAU FLAVONE

Le noyau FLAVONE est lui même un dérivé du noyau FLAVANE de base.



NOYAU FLAVANE

- Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C).

II.2. Biosynthèse

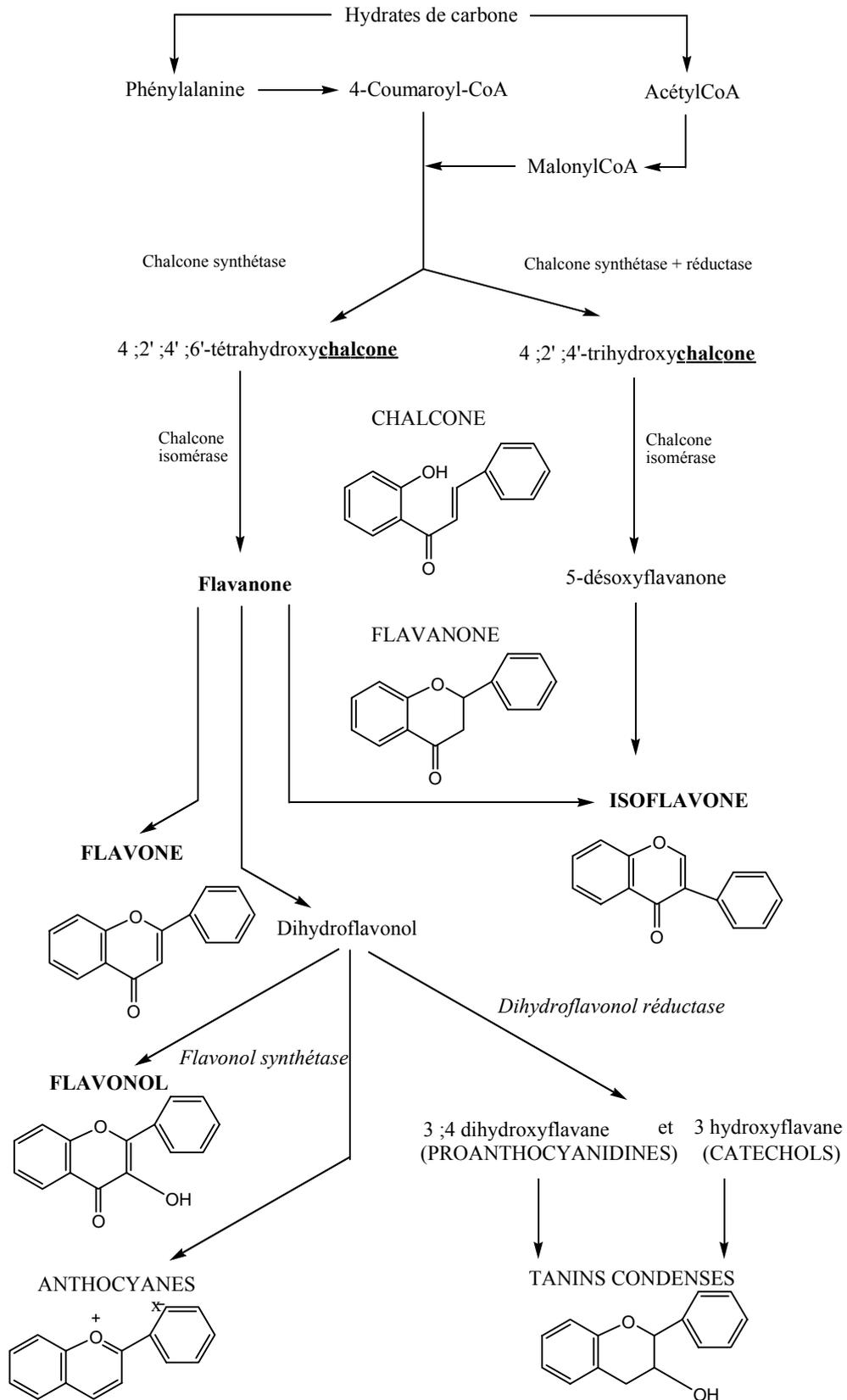


Figure 2 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes [Remesy et al. ; 1996]

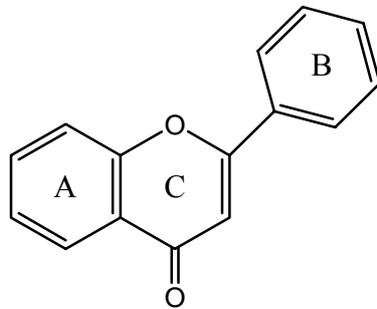
Il existe un intermédiaire commun dans la biosynthèse des flavonoïdes = une TETRAHYDROXYCHALCONE, à partir de laquelle on différencie :

- > les 4-OXO-FLAVONOÏDES
- > les ANTHOCYANIDINES
- > les FLAVANES -> TANINS

Tous possèdent une activité vitaminique P commune.

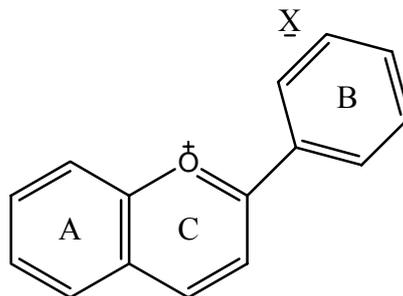
Dans ce travail, nous nous limiterons à l'étude des 4-OXO-FLAVONOÏDES qui sont les flavonoïdes vrais. Les ANTHOCYANES et les TANINS étant des composés apparentés .

• Les **4-OXO-FLAVONOÏDES** encore appelés dérivés flavoniques ou flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl-chromone :



Ils portent des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides
ex. quercétine, kaempférol, DiHEQ...

• Les **ANTHOCYANIDINES** sont des dérivés du flavylium ou 2-phényl-benzopyrylium:

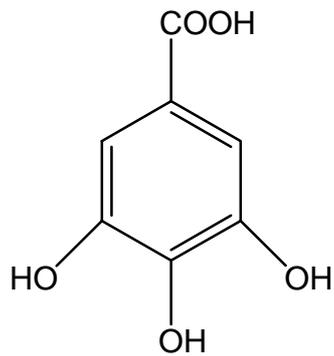


Ils portent des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides ex. Delphinidine,...

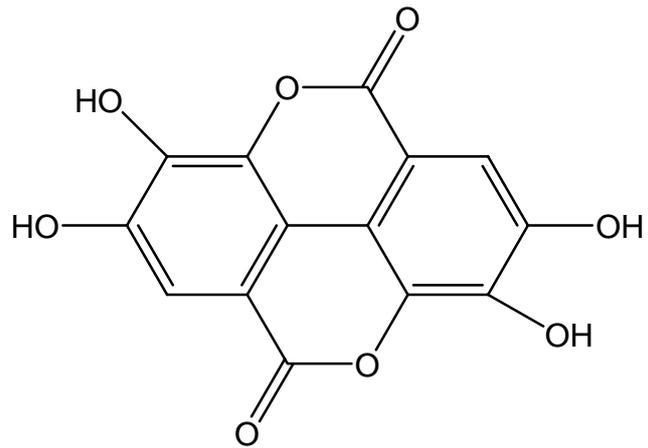
• Les **FLAVANES** ou TANINS peuvent être divisés en 2 groupes :

• TANINS HYDROLYSABLES = TANINS GALLIQUES

Ce sont des esters d'oses et d'acides phénols (acide gallique ou ellagique).



Acide gallique



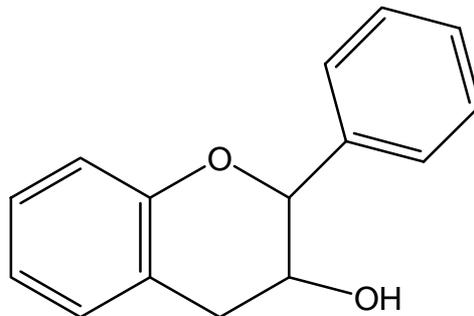
Acide ellagique

• TANINS CONDENSES = TANINS CATECHIQUES

Ils sont non hydrolysables et correspondent à la condensation de 2 à 10 molécules monomères possédant le noyau flavane hydroxyle.

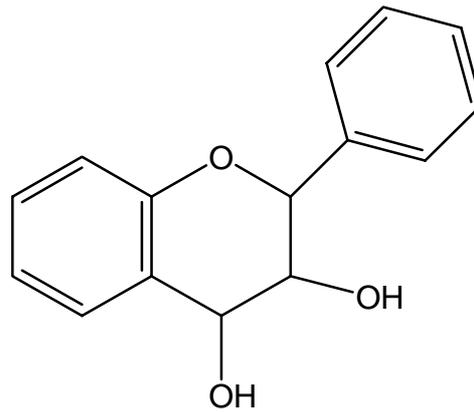
=> CATECHOLS = CATECHINES

Ce sont des dérivés du 3-hydroxy-flavane :



=> PROANTHOCYANIDINE = LEUCOCYANIDINE

Ce sont des dérivés du 3,4-dihydroxyflavane :



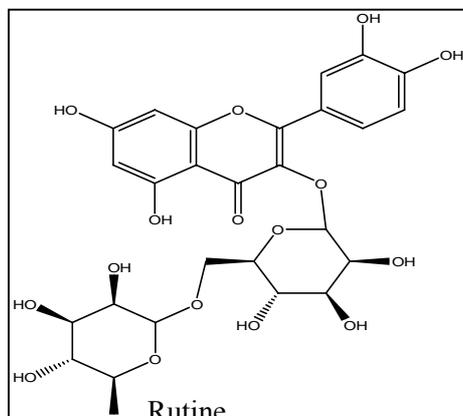
II.3. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des HETEROSIDES, c'est-à-dire des dérivés de GENINES sur lesquelles un ou plusieurs OSES sont greffés.

La liaison GENINE-OSE existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique du ou des ose(s).

On obtient alors des O-HETEROSIDES ou des C-HETEROSIDES.

O-hétéroside



C-hétéroside

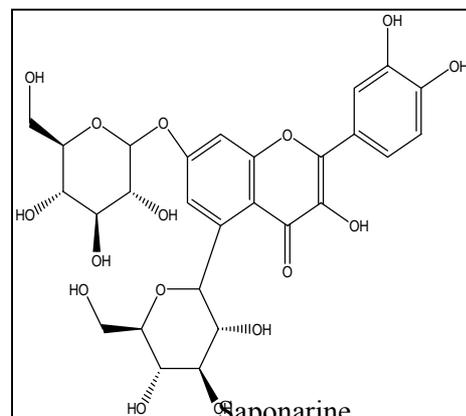
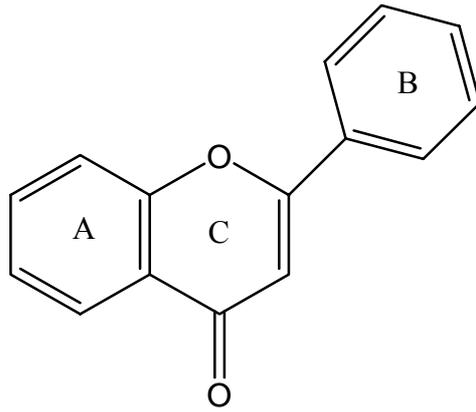


Figure 3 : Structure chimique de 2 flavonoïdes : la rutine et la Saponarine

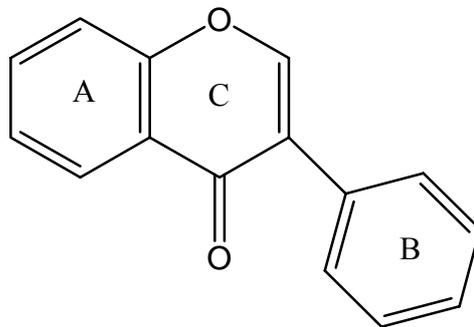
Les C-hétérosides semblent intéressants en thérapeutique. La rupture de la liaison GENINE-OSE est plus difficile dans le cas des C-hétérosides que dans celui des O-hétérosides.

- Différentes génines rencontrées

- FLAVONE (2-Phényl-chromone)



- ISOFLAVONE (3-Phényl-chromone)



- Les Oses

- De nombreux oses peuvent être rencontrés : D-Glucose/ L-Rahmnose/Glucorhamnose/Galactose/Arabinose/etc...

- Les hétérosides = Génine + Oses

- Les positions des substituants hydroxylés et méthoxylés des génines peuvent être très diverses. On obtient ainsi des O-hétérosides et des C-hétérosides ayant chacun des structures qui leur sont propres.

III. Sources

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs.

Par contre, on les trouve en abondance dans les familles suivantes :

- POLYGONACEES
- RUTACEES
- LEGUMINEUSES
- APIACEES (= OMBELLIFERES)
- ASTERACEES (= COMPOSEES)

De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique). Ils se répartissent aussi volontiers dans les racines.

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Le tableau 1 illustre la répartition des 4-oxo-flavonoïdes dans quelques fruits et légumes.

Tableau 1 : Teneur en 4-oxo-flavonoïdes de quelques fruits et légumes [Remesy C. et al.; 1996]

Fruits et légumes	mg/kg poids	Aglycones
Persil	500	Apigénine
Ciboulette	110	Quercétine + Kaempférol
Chou frisé	150	Quercétine + Kaempférol
Chou frisé (serré)	105	Quercétine + Kaempférol
Laitue	320	Quercétine
Oignon	300	Quercétine + Kaempférol
Endives	290	Kaempférol
Poireau	100	Quercétine + Kaempférol
Céleri	100	Apigénine + Lutéoline
Haricots verts	70	Quercétine + Kaempférol
Choux de Bruxelles	65	Quercétine + Kaempférol
Brocolis	35	Quercétine + Kaempférol
Tomate	10	Quercétine + Kaempférol
Chou-fleur	3	Quercétine + Kaempférol
Pomme de terre	3	Quercétine + Kaempférol
Orange	1700/2800	Hespérétine
Pamplemousse	2700/6000	Naringénine
Myrtilles cultivées	165	Quercétine
Cerises aigres	100	Quercétine + Kaempférol
Cerises douces	12	Quercétine + Kaempférol
Raisins	50/100	Quercétine + Myricétine
Cassis	80	Quercétine + Kaempférol
Abricots	55	Quercétine
Mûres	50	Quercétine + Kaempférol
Pommes	30	Quercétine
Groseilles	30	Quercétine + Kaempférol
Framboises	30	Quercétine + Kaempférol
Prunes	30	Quercétine + Kaempférol

IV. Propriétés des flavonoïdes

IV.1. Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire.

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires [Da Silva et al., 1994 ; Galati et al., 1994 ; Read, 1995] et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [Middleton et Elliott, 1996]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T [Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994]. Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'explication est encore inconnue. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) [Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994]. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes [Middleton et Drzewiecki ; 1984].

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles ce qui va promouvoir l'inflammation. D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose [Ward ; 1994]. Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles [Limasset et al., 1993]. Les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPc à la suite d'une inhibition des phosphodiésterases [Roengsumran et al., 2000]. En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca^{2+} impliquée dans l'agrégation de ces cellules [Bourdillat et al., 1988].

IV.2. Propriétés antivirales et antibactériennes

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte,
- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte,
- au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales,
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Ce mécanisme semble être impliqué dans la protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours [Vrijsen et al., 1987]. Mucsi et Pragai en 1985 ont également montré une

corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées.

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). De nombreux agents sont susceptibles d'inhiber la réplication du rétrovirus du SIDA par une inhibition de la reverse transcriptase. Toutefois, ils peuvent être toxiques pour l'organisme. Il a été étudié l'impact des flavonoïdes sur la « reverse transcriptase ». Les flavonoïdes se sont montrés de bons inhibiteurs de cette enzyme [Spedding et al., 1989]. Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale [Ono et al. ; 1990 ; Ono et Nakane, 1990]. Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gp120), empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte [Mahmood et al., 1993]. Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1. Cette enzyme permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte. Des études structure-activité devraient permettre de montrer quelles sont les molécules les plus actives [Fesen et al., 1994]. En fait, il semble que l'intérêt éventuel des flavonoïdes ou d'autres micro-nutriments pour combattre le virus du SIDA n'ait pas été suffisamment approfondi.

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase [Ohemeng et al., 1993]. Une étude récente a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *staphylococcus aureus* [Sato et al., 1995].

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- l'inhibition du métabolisme microbien [Mila et Scalbert ; 1994].

IV.3. Propriétés anti-carcinogènes

La quercétine, par exemple, est capable de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz(a)anthracène) ou la NMU (N-nitrosométhylurée) [Verma et al, 1988]. Les études réalisées chez la souris abondent dans le même sens et mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs [Kato et al., 1983].

L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par une interaction de celle-ci avec le **complexe calcium-calmoduline** [Nishino et al., 1984] qui jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur. C'est ainsi qu'un antagoniste de la calmoduline inhiberait l'induction de l'ODC (Ornitine Décarboxylase) par le TPA (12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate) [Verma et Boutwell, 1981]. Le complexe calcium-calmoduline pourrait médier l'action du TPA en augmentant la synthèse d'ADN dans les cellules de foie [Boynton et al., 1982].

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le **métabolisme des xénobiotiques** [Wattenberg, 1983], notamment en stimulant les systèmes de détoxification [Bu Abbas et al., 1995].

En donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, on peut observer des effets chimiopréventifs à divers niveaux, et en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion-S-transférase [Nijhoff *et al.*, 1995]. Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes [Obermeier *et al.*, 1995]. Les résultats dans ce domaine sont difficiles à interpréter car les flavonoïdes semblent avoir des effets divers sur l'activité des enzymes de détoxification [Lasker *et al.*, 1984].

IV.4. Propriétés antioxydantes et impact sur la peroxydation lipidique

Le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux [Halliwell *et al.*, 1994]. Les radicaux libres sont des espèces chimiques présentant un ou plusieurs électrons célibataires (le radical hydroxyle OH^\bullet , l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, l'oxyde nitrique NO^\bullet ...). Ils sont produits naturellement dans l'organisme :

- au niveau de la respiration mitochondriale lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H_2O ;
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes ;
- par diverses oxydases cellulaires ;
- au cours de la phagocytose.

De plus, les UV, la pollution, de nombreux agents chimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue de radicaux libres. Frenkel et Chrzan (1987) ont montré que des promoteurs de tumeurs tels que le (TPA) peuvent également induire la formation de peroxyde d'hydrogène par des leucocytes humains et provoquer des coupures de l'ADN.

L'organisme possède ses propres mécanismes de défense permettant de lutter contre les radicaux libres ou les espèces oxygénées réactives, Il s'agit principalement d'enzymes cytosoliques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase). L'action protectrice de ces enzymes est complétée par celle de différents réducteurs présents dans les structures lipoprotéiques (α -tocophérol, caroténoïdes, lycopène, ubiquinol) et dans le cytosol (acide ascorbique, glutathion réduit). De plus, certaines protéases semblent avoir pour rôle de reconnaître et de dégrader spécifiquement les protéines oxydées empêchant ainsi l'accumulation de protéines altérées et endommagées dans la cellule [Stadtman, 1992]. De plus, de nombreuses protéines ont un rôle antioxydant puisqu'elles vont pouvoir capter, stocker et transporter des métaux de transition (albumine qui piège le cuivre, ferritine qui stocke le fer) : en séquestrant ainsi ces métaux, ces protéines préviendront par exemple la formation de radical OH^\bullet par la réaction de Fenton :



Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité des systèmes de défense, ces radicaux libres n'auront pas d'effets néfastes majeurs. Toutefois, si des quantités importantes de radicaux sont générées, dépassant les possibilités de protection enzymatique et épuisant le pool de divers capteurs, alors, ces radicaux libres vont engendrer :

- des peroxydations lipidiques favorisant l'athérosclérose et le vieillissement,

- des modifications oxydatives des protéines les rendant inactives,
- des dommages oxydatifs de l'ADN et de l'ARN aboutissant à des mutations et à la cancérisation.

L'intérêt métabolique des antioxydants alimentaires fait, à l'heure actuelle, l'objet d'un grand nombre de travaux. Parmi ces antioxydants, de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant des polyphénols [Subirade et al., 1995]. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées [Fuhrman B. et al., 1995] En fait, leur activité antiradicalaire nécessite:

- la structure ortho-diphénolique du cycle **B**, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé,
- la double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo-, qui est responsable de la délocalisation d'électrons stabilisant le radical aroxy,
- les hydroxyles en positions 3 et 5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale.

Les flavonoïdes et en particulier la quercétine qui présente les trois éléments de structure décrits ci-dessus, sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique [Erben-Russ et al. ; 1987]. Enfin, les flavonoïdes possédant une structure catéchol sur le cycle B, et en particulier la (+)-catéchine, sont des piègeurs de l'oxygène singulet, une forme réactive de l'oxygène.

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique [Yoshino et al., 1994], ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire [Galvez et al., 1995]. Le rôle protecteur des flavonoïdes ou de divers acides phénoliques vis-à-vis de la peroxydation lipidique a fait l'objet d'une étude exhaustive. Un très grand nombre de ces molécules semblent plus efficaces que le trolox (une forme soluble de l' α -tocophérol) pour prévenir la production de diènes conjugués induite par le cuivre. Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés. Comme l' α -tocophérol, ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus, ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer [Van Acker et al., 1995].

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein) [De Whalley et al., 1990]. Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue, à la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que l' α -tocophérol, le β -carotène, le lycopène. On considère que la lipoperoxydation peut démarrer lorsque ces antioxydants sont épuisés. La question se pose de savoir dans quelle mesure les composés natifs (flavonoïdes ou acides phénoliques) ou des métabolites liposolubles provenant des polyphénols peuvent s'incorporer dans les LDL, agir en synergie ou remplacer les autres antioxydants normalement présents dans ces particules. Si leur biodisponibilité était suffisante, les flavonoïdes auraient la capacité d'interagir avec les radicaux libres empêchant ainsi la dégradation des antioxydants endogènes [Nègre-Salvayre et Salvayre, 1992]. Les LDL oxydées sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules endothéliales en culture. Elles augmentent la peroxydation lipidique cellulaire et provoquent une déplétion en ATP et en glutathion. La rutine est capable d'inhiber la déplétion intracellulaire en ATP et en glutathion

et donc empêche la cytotoxicité des LDL oxydées vis-à-vis des cellules endothéliales en culture induite par les LDL oxydées [Schmitt et al., 1995].

D'après une enquête récente de Hertog et al. en 1993, la présence des flavonoïdes en quantité importante dans l'alimentation diminue de 68% les risques cardiovasculaires par rapport à une alimentation qui en est faiblement pourvue [Hertog et al., 1993]. Parmi les composés les plus antioxydants, on peut citer l'épigallocatechine gallate, la catéchine, la quercétine, la lutéoline, la myricétine et l'apigénine mais aussi des acides phénoliques tels que les acides caféique et chlorogénique. La théorie du paradoxe français, à savoir qu'une grande partie de la population ingère autant de graisses que les Américains tout en présentant un moindre risque cardiovasculaire, a été reliée à une consommation plus abondante de produits végétaux et en particulier à celle de vin, riche en flavonoïdes [Commenges et al. ; 2000]. Il a été montré chez l'homme, que la consommation de vin rouge, contrairement au vin blanc, augmente la capacité antioxydante du sérum [Whitehead et al., 1995] et réduit la susceptibilité des LDL à l'oxydation [Fuhrman et al., 1995].

Le thé est également une source importante de flavonoïdes. La consommation de thé pourrait contribuer à diminuer les taux de cholestérol plasmatiques [Imai et Nakachi, 1995] et participerait à la protection des lipoprotéines.

Cependant, les influences nutritionnelles sont toujours très complexes et il est nécessaire de réunir le maximum de facteurs favorables pour bénéficier des effets protecteurs potentiels de l'alimentation.

IV.5. Propriétés pro-oxydantes des flavonoïdes [Laughton M.J. et al., 1989, Yen et al.; 1997, Kessler M. et al ;2003]

Nous avons décrit précédemment des propriétés antioxydantes des flavonoïdes mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes.

Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène.

Ainsi, ils seraient capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) aboutissant à la formation de radicaux hydroxyles par réaction entre Fe^{2+} et H_2O_2 .

En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*.

Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes.

L'activité pro-oxydante est le résultat de la capacité à réduire les métaux comme le Fe^{3+} pour donner Fe^{2+} qui réagira avec O_2 ou H_2O_2 avec génération d'initiateurs de l'oxydation.

Les attaques oxydatives des tissus *in vivo* induites par la réaction de Fenton sont les sources biochimiques principales du radical hydroxyle. Cette réaction est dépendante de la présence de fer non lié aux protéines. C'est pourquoi la clarification du rôle des métaux réduits actifs et des agents réducteurs comme catalyseurs de l'oxydation de molécules *in vivo* est intéressante.

Il semblerait que les composés phénoliques réduisent le Fe^{3+} et catalysent la formation de radical hydroxyle qui est responsable des dommages oxydatifs du désoxyribose, des bases de l'ADN et d'altérations diverses de l'ADN. Désormais, il s'agit d'éliminer les propriétés pro-

oxydantes des composés phénoliques doués d'une activité antioxydante tout en gardant cette dernière intacte, c'est pourquoi d'autres études doivent être menées à ce sujet.

IV.6. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent ainsi des propriétés bénéfiques biologiques et antioxydantes. Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif.

Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus [Hollman et al. 1997 ; Morand et al. 1998 ; Manach et al., 1999]. Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides, comme la rutine, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour leur permettre d'être absorbés au niveau du côlon [Hollman et Katan, 1998].

Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie [Haslam 1998].

Les métabolites, glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale.

CHAPITRE DEUX

Etudes expérimentales

I- CAPTURE DE L'ANION SUPEROXYDE

I. Choix de la méthode

Les réactions des radicaux libres sont souvent très complexes. Il n'est pas aisé de savoir quel est le radical présent et à quel moment de la réaction il intervient. La méthode classique consiste à ajouter un composé capteur dans un système où une réaction faisant intervenir des radicaux libres. Le problème se posant dans ce cas-là est la non spécificité des capteurs des radicaux libres.

La mesure directe de la présence radicalaire par l'enregistrement des signaux de résonance paramagnétique électronique (RPE) est une bonne solution, mais l'équipement nécessaire n'est généralement pas disponible dans la plupart des laboratoires. C'est pourquoi on fait appel à des techniques de dosages, dites indirectes, comprenant une source de production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en solution aqueuse et une molécule détectrice qui est soit oxydée, soit réduite par l'anion ($O_2^{\bullet-}$).

I.1. Systèmes de production et de détection de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)

Les méthodes de production et de réduction de l'anion ($O_2^{\bullet-}$) sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2: Méthodes de production et de détection de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)

Générateur de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)	Détecteur de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)
Enzymatique	Ferricytochrome C (cyto.C)
Chimique	Bleu de nitrotétrazolium (NBT)
Electrochimique	Produits d'auto-oxydation
Photochimique	Chimiluminescence
Radiolytique	Spectre RPE

I.1.a. Systèmes de production de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)

L'anion ($O_2^{\bullet-}$) peut être généré par différentes méthodes:

- une méthode enzymatique par exemple, le système xanthine/xanthine-oxydase [Ballou et al. ; 1969, Caselle et Fridovich ; 1975, Gotoh et Shikam ; 1976, Mc Cord et Fridovich ; 1969, Naqui et al. ; 1986, Misra et Fridovich ; 1972a, Misra et Fridovich ; 1972b, Misra et Fridovich ; 1971, Nishikimi ; 1975].

- une méthode chimique. L'auto-oxydation des molécules, comme l'adrénaline et le glutathion, est une des méthodes chimiques de la production d'anion $O_2^{\bullet-}$. Ce dernier peut être également généré par addition du superoxyde de potassium dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) en présence d'oxygène [Ruddock et al. ; 1981].

- une méthode électrochimique [Sawyer et al. ; 1986]. La réduction de l'oxygène sur une électrode inerte génère l'anion ($O_2^{\bullet-}$) comme produit primaire. L'anion ($O_2^{\bullet-}$) ainsi généré s'hydrolyse rapidement quand le processus se déroule dans un milieu protique. Par contre, il est très stable quand ce dernier se déroule dans un milieu aprotique et une solution fortement alcaline. Sa demi-vie par exemple peut être d'au moins 7 heures à une concentration millimolaire dans le DMSO.

L'anion ($O_2^{\bullet-}$) peut être également généré en milieu aprotique par la réduction du peroxyde d'hydrogène dans une solution pyridinique.

- une méthode photochimique. Les molécules du type chromophore peuvent être photoréduites en présence d'un donneur d'hydrogène convenable. Les molécules ainsi réduites réagiront ensuite avec l'oxygène par transfert d'électron en produisant l'anion ($O_2^{\bullet-}$) [Michelson ; 1986].

- une méthode radiolytique. L'anion ($O_2^{\bullet-}$) peut être généré par irradiation γ d'une solution aqueuse contenant l'oxygène et le formate de sodium ou l'éthanol. Une solution alcaline est nécessaire pour obtenir l'anion ($O_2^{\bullet-}$) stable. Plus le pH du milieu est élevé, plus la solution d'anions ($O_2^{\bullet-}$) obtenue est stable [Bielski ; 1986].

Parmi les nombreuses méthodes de production de l'anion ($O_2^{\bullet-}$) citées ci-dessus, les méthodes enzymatiques et chimiques sont les plus souvent utilisées.

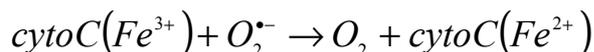
Dans notre travail, la méthode de la xanthine/xanthine oxydase sera utilisée comme source d'anion ($O_2^{\bullet-}$).

I.1.b Système de détection de l'anion ($O_2^{\bullet-}$)

Les méthodes décrites dans la littérature pour détecter l'anion ($O_2^{\bullet-}$) comprennent la réduction du ferricytochrome C, la conversion du bleu de nitrotétrazolium en formazan, l'oxydation de l'adrénaline, la chimiluminescence et le spectre RPE.

- Ferricytochrome C (cytochrome C) [Fridovich ; 1986]

La réaction entre l'anion ($O_2^{\bullet-}$) et le cytochrome C (cyto.C) consiste en une réduction du fer hémique, et la constante de vitesse de cette réaction est de $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{Sec}^{-1}$ [Butter ; 1982]:

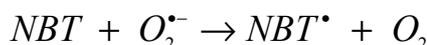


Cette réduction peut être suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm, qui correspond au pic d'absorption du ferrocyclochrome C. Le coefficient d'extinction molaire est de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [Greenwald ; 1978].

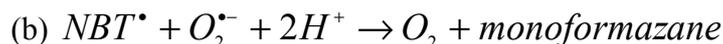
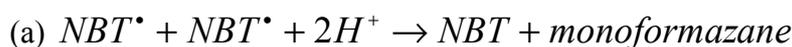
Il est à noter que le cyto. C peut être réduit par de nombreux composés autres que l'anion ($O_2^{\bullet-}$). C'est pourquoi, il est nécessaire de montrer l'effet inhibiteur de la superoxyde dismutase (SOD), enzyme spécifique pour l'anion ($O_2^{\bullet-}$) sur la réduction du cyto. C.

- Bleu de nitrotétrazolium (*NBT*)

Le mécanisme de la réaction entre l'anion ($O_2^{\bullet-}$) et le bleu de nitrotétrazolium (*NBT*) est très complexe et quelques étapes sont encore controversées. En fait, la réduction du *NBT* en monoformazane débute par la formation du radical tétrazolynyle:



Ensuite, deux réactions sont possibles: la dismutation (a) ou la réduction du radical *NBT*[•] par un deuxième anion ($O_2^{\bullet-}$) (b). Dans les deux cas, il y a formation de monoformazane.



La constante de vitesse de la réaction du *NBT* avec l'anion ($O_2^{\bullet-}$) à pH 9,8 est de $5,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ [Bielski ; 1977]. Cette réduction du *NBT* peut être suivie à 560 nm, et la quantité de *NBT* réduit est transformée en $\mu\text{mol}/\text{min}$ par l'utilisation d'un coefficient d'extinction de $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ [Auclair et Voisin ; 1986].

La réduction du *NBT* en formazane a été largement utilisée comme signe de l'intervention de l'anion ($O_2^{\bullet-}$) dans les systèmes chimique et biologique [Auclair et Voisin ; 1986]. Cependant, cette réaction est non spécifique, car selon certains auteurs [Bors et al. ; 1978a] la SOD n'inhiberait que partiellement la réaction.

- Oxydation de l'adrénaline

L'adrénaline, stable à pH acide, s'oxyde d'une manière spontanée à pH alcalin. Le mécanisme de cette auto-oxydation est mal défini. Elle serait initialisée, selon Misra [Misra ; 1986], par des traces de métaux lourds contenus dans l'adrénaline utilisée. L'anion ($O_2^{\bullet-}$) interviendrait dans les étapes suivantes, qui conduisent à la formation d'adrénochrome. Bors et al. (1978) ont exclu cependant l'effet de la stimulation des métaux lourds, puisqu'ils ont montré que la présence d'EDTA n'influence pas la formation d'adrénochrome. D'après ces auteurs, l'anion (*NBT*) serait déjà formé lors de la première dissociation de l'adrénaline. Puis, l'anion ($O_2^{\bullet-}$) réagirait avec la semiquinone d'adrénaline formée pendant la première étape, en produisant la quinone. Une fois la quinone formée, elle se cycliserait irréversiblement en adrénochrome. L'adrénaline serait ainsi à la fois la source d'anions ($O_2^{\bullet-}$) et la molécule détectrice.

La formation d'adrénochrome peut être suivie à 480 nm et la conversion en mol/min se fait à l'aide d'un coefficient d'extinction molaire de $4,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ [Misra et Fridovich ; 1972a].

Il a été proposé que le radical hydroxyle pourrait aussi oxyder l'adrénaline et aboutir à la formation d'adrénochrome. Comme la réduction du cyto. C et du *NBT*, cette réaction n'est pas spécifique. Une démonstration de l'effet inhibiteur de la SOD est souhaitable.

- Chimiluminescence [Rao et al. ; 1988]

Le principe de cette technique est que tous les radicaux libres dérivés de l'oxygène produisent une chimiluminescence faible qui peut être renforcée par le luminol. L'intensité de cette chimiluminescence varie en fonction de la concentration du radical. Cette méthode est donc quantitative, simple, sensible et spécifique.

- Spectre RPE [Thornalley et Bannister ; 1986]

La technique RPE est considérée comme la méthode la moins ambiguë pour détecter les radicaux libres. Cependant, l'anion ($O_2^{\bullet-}$) est si instable en solution aqueuse qu'il n'y a pas de signal mesurable sur le spectre RPE. Par contre, l'anion ($O_2^{\bullet-}$) peut réagir avec les "spin trap", tels que les nitrones, et donner des produits stables, paramagnétiques connus sous le nom de "spin adducts". L'anion ($O_2^{\bullet-}$) peut être ainsi détecté indirectement par la mesure des signaux des "spin adducts". Malgré sa spécificité, cette technique est peu utilisée à cause du besoin en matériels non disponibles dans tous les laboratoires.

Notre choix de méthode de détection de l'anion ($O_2^{\bullet-}$) s'est porté sur la réduction du *NBT*. C'est l'une des méthodes les plus utilisées actuellement.

Les activités des composés vis-à-vis de l'anion ($O_2^{\bullet-}$) seront évaluées par les variations des pourcentages d'inhibition de la réaction de la molécule détectrice avec l'anion ($O_2^{\bullet-}$).

I.2. Principe de production et de détection du radical superoxyde choisis

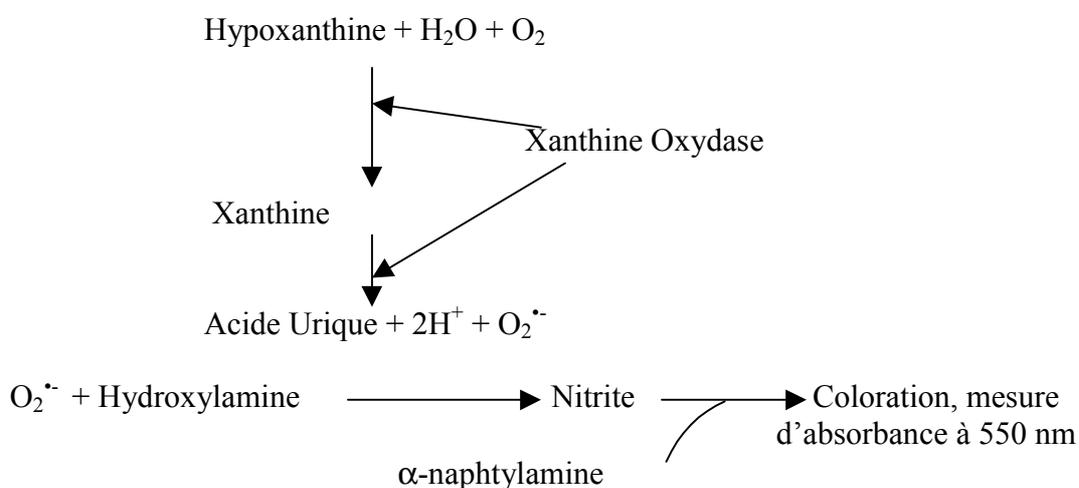


Figure 4 : Principe de production et de détection des anions superoxydes

La production de l'anion superoxyde est basée sur une méthode enzymatique décrite précédemment et faisant intervenir l'hypoxanthine et la xanthine oxydase [Kessler et al. ; 2002]. En présence de bases puriques telles que l'hypoxanthine ou la xanthine, la xanthine oxydase produit des anions superoxydes. Cette génération d'anions superoxydes peut être mise en évidence à l'aide de la méthode des nitrites.

L'hydroxylamine présente dans le milieu réactionnel, sera oxydée par les anions superoxydes générés pour former des nitrites. Leur production est ensuite quantifiée par réaction de ces nitrites avec l' α -naphtylamine qui donne une coloration violette. Par une mesure de l'absorbance à 550 nm, il sera donc possible de quantifier la production de nitrites et par conséquent de quantifier les anions superoxydes formés.

Une baisse de cette absorbance traduit la présence d'un capteur de ces radicaux.

Certaines de ces molécules peuvent agir directement sur l'enzyme (xanthine oxydase) et peuvent fausser les résultats obtenus [Kessler et al. ; 2002]. Il est indispensable de s'assurer que cette activité est due vraiment à une capture de l'anion superoxyde et non pas à une influence sur l'enzyme. Dans cette optique, nous avons réalisé un test qui consiste à déterminer la vitesse de production de l'urée, qui peut être suivie à 295 nm pendant deux minutes à 37°C. Soit (V) la vitesse déterminée en présence de différentes concentrations de la molécule à

tester et (V°) la vitesse en absence de celle-ci. Le rapport (V°/V) indique le type d'inhibition exercé sur l'enzyme :

- si $V^\circ/V = 1$ cela implique qu'il n'y a pas d'influence sur l'activité de l'enzyme.
- si $V^\circ/V > 1$ cela implique qu'il y a une inhibition de l'activité enzymatique.
- si $V^\circ/V < 1$ cela implique qu'il y a une augmentation de l'activité enzymatique.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Préparation des différentes solutions

- Tampon de phosphate mono et disodique à pH 7,4 ; $C = 0,1$ M
- Solution d'hypoxanthine (concentration finale 0,2 mM)
- Solution d'hydroxylamine (concentration finale 0,2 mM)
- Solution EDTA (concentration finale de 0,1mM)
- Solution de xanthine oxydase (concentration finale de 2,5 μ M) \Rightarrow cette solution doit être préparée juste avant l'ajout de l'enzyme au milieu réactionnel.
- Réactif coloré : dans une fiole de 100 mL, on dissout 45 mg d'acide sulfanilique (concentration finale de 300 μ g/mL) et 11 mg d' α -naphtylamine (concentration finale de 0,74 mg/mL) sont dissous dans l'équivalent de 25,05 g d'acide acétique, puis l'ensemble est ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée.

II.2. Mode opératoire

Les différents tests sont réalisés dans un même volume final de 1 mL. Pour chaque substance à étudier, 10 concentrations finales différentes sont préparées, allant de 0 μ M à 80 μ M. Pour chaque concentration, trois tubes sont préparés. Chaque série de mesure est répétée deux fois, soit donc un ensemble de 6 mesures différentes pour une concentration donnée. Ainsi dans chacun des tubes à essais (plongés dans un bain d'eau et de glace) sont ajoutés 100 μ L de solution 0,2 mM d'hypoxanthine, 100 μ L de solution 0,2 mM d'hydroxylamine, 100 μ L de solution 0,1 mM d'EDTA et 390 μ L de solution 0,1 M de tampon phosphate.

Avant d'homogénéiser le milieu, 150 μ L de la substance à étudier (ou 150 μ L de solvant pour le témoin) sont ajoutés. Ensuite, à chaque tube, 160 μ L de la solution de xanthine oxydase sont rajoutés. Après une nouvelle homogénéisation, les tubes sont placés dans un bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 2 mL du réactif chloré. Une dernière homogénéisation des tubes est réalisée avant de revenir à la température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Les absorbances sont alors mesurées à 550 nm.

Le pourcentage de capture des radicaux libres est ensuite déterminé par la relation suivante :

$$\frac{(A^\circ - A)}{A^\circ} \times 100 = \%O_2^{\cdot -} \text{ captés} \quad \text{Equation n}^\circ 1$$

A° = absorbance obtenue pour le témoin.

A = absorbance obtenue pour une concentration donnée de substance à tester.

II.3. Validité de la méthode

Avant de commencer les diverses expériences, nous avons vérifié la validité de la méthode en utilisant les molécules de référence suivantes :

- Une substance comme l'acide ascorbique, ayant un fort pouvoir de capture des anions superoxydes, a été utilisée comme témoin positif.
- Le mannitol a été utilisé comme témoin négatif. Nous l'avons choisi pour sa sélectivité dans la capture des radicaux libres : il capte les radicaux hydroxyles mais non les radicaux superoxydes. Dans ce cas, nos mesures d'absorbance ne doivent en aucun cas varier avec la concentration du mannitol ajoutée. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 5 :

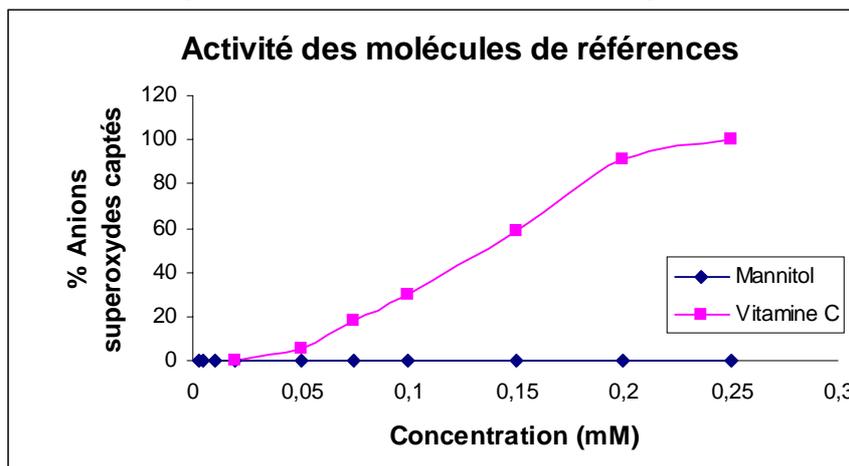


Figure 5 : pourcentage des anions superoxydes captés en fonction de la concentration de la molécule de référence.

Les deux molécules de référence répondent à nos attentes : le mannitol ne capte pas les anions superoxydes et l'acide ascorbique présente un fort pouvoir de capture de ces radicaux. Nous avons ainsi vérifié avec le mannitol, l'absence du radical hydroxyle dans le milieu réactionnel. Donc, le modèle enzymatique ne produit pas de radicaux OH^\bullet , évitant d'induire des erreurs lors des interprétations.

II.4. Choix des hydroxyflavones

L'objectif de notre travail est d'établir une relation structure-activité entre les molécules de type 4-oxoflavones et le pouvoir de capture des deux types de radicaux libres oxygénés (l'anion superoxyde et le radical hydroxyle) en tenant compte de leur faible solubilité et de leur caractère pro-oxydant. Cette relation structure/activité sera étudiée premièrement sur les flavonoïdes et ensuite sur leur forme salifiée afin d'améliorer leur hydrosolubilité. Ces composés sont présentés dans le tableau 3 et la figure 6.

Tableau 3: Différentes formes de flavonoïdes étudiées.

Composé	Substitution OH	Substitution OC ₂ H ₅ OH	Substitution O-Rutinosé
Quercétine	3,5,7,3',4'	—	—
MonoHEQ	3,5,3',4'	7	—
DiHEQ	3,5,3'	7,4'	—
Rutine	5,7,3',4'	—	3
MonoHER	5,3',4'	7	3
DiHER	5,3'	7,4'	3
Fisetine	3,7,3',4'	—	—

Galangin	3,5,7	—	—
Kaempferol	3,5,7,4'	—	—
Luteoline	5,7,3',4'	—	—
7-Hydroxyflavone	7	—	—

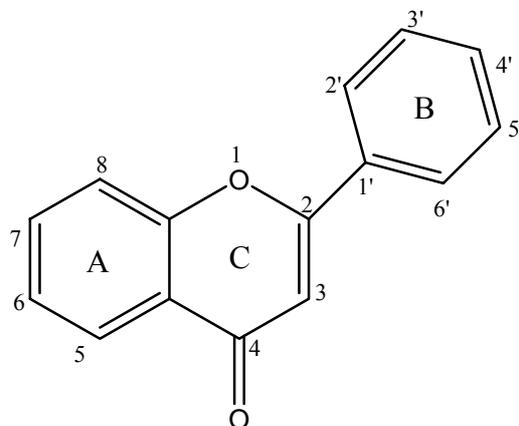


Figure 6 : Structure principale des flavonoïdes (la flavone)

HEQ : hydroxyéthyle quercétine
HRE : hydroxyéthyle rutine

Ces molécules sont choisies pour cette étude car elles possèdent toutes la même structure de base qui est la flavone et car elles diffèrent par la position et le nombre des groupements. Les groupements hydroxyles sont:

- substitués par des fonctions $\text{OC}_2\text{H}_5\text{OH}$
- substitués par des fonctions O-Rutinoses

Cette variabilité est nécessaire pour déterminer quelles sont les modifications qui augmentent l'activité de capture des radicaux hydroxyle et superoxyde.

III. Résultats et discussions

Les courbes obtenues concernant les résultats de la capture de l'anion superoxyde par les différents composés choisis précédemment sont regroupées dans les figures 7 et 8.

D'après les courbes de la figure 7, nous constatons que dans nos conditions opératoires, les composés les plus actifs sont le MonoHER et la rutine. Ils inhibent 80% de radicaux superoxydes produits par le système xanthine /xanthine oxydase à une concentration de 0,1 mM.

Les autres composés relativement actifs sont la quercétine, le MonoHEQ, le DiHEQ et le DiHER. Leurs pourcentages d'inhibition pour une concentration de 0,1 mM se situent entre 50% et 65%.

En comparant ces différentes structures, nous pouvons conclure que les dérivés de la rutine sont plus actifs que la quercétine et ses dérivés. Ceci peut être expliqué par la présence d'un sucre en position 3 qui rend les molécules plus hydrophiles et donc plus actives dans le milieu aqueux. Concernant le DiHER, la substitution de l'hydroxyle en position 4' par un hydroxyéthyle a diminué l'activité du catéchol vis-à-vis de la capture de radicaux superoxydes.

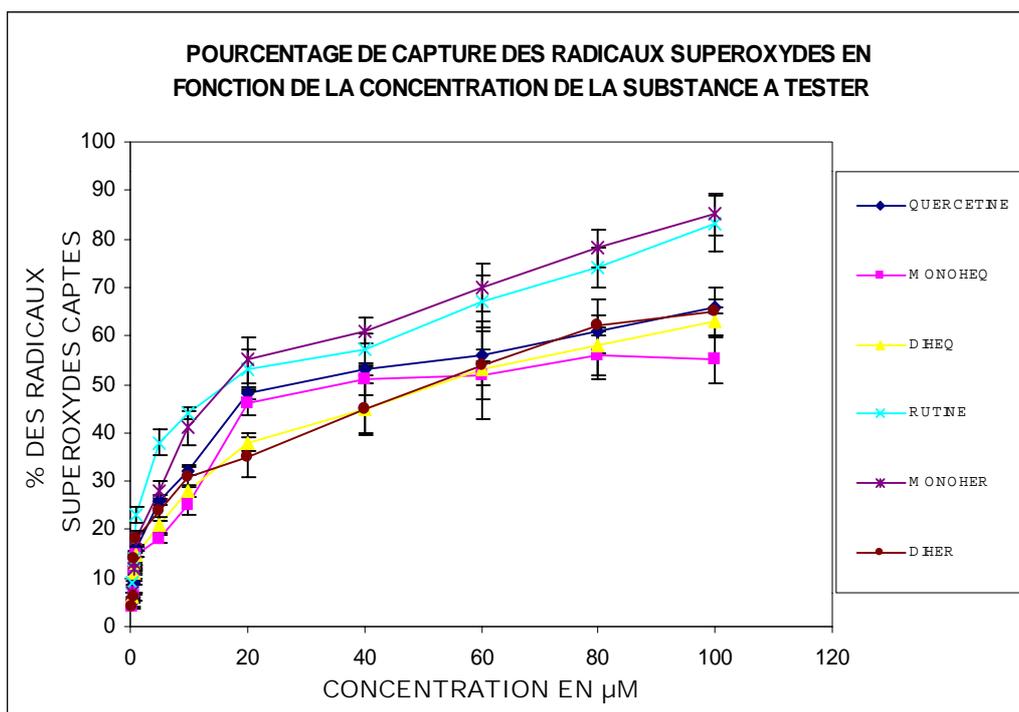


Figure 7 : Courbes de capture des radicaux superoxydes par la quercétine, rutine et leur dérivés hydroxyéthylés.

Afin de comparer les réactivités entre les dérivés de la quercétine ayant différents nombres d'hydroxyles, nous avons regroupé les courbes de capture de ces dérivés dans la figure 8. Nous pouvons constater que la lutéoline et la fisétine possèdent l'activité de capture la plus importante parmi la série (70% de radicaux superoxydes inhibés pour une concentration de 0,1 mM).

Pour la galangine, le kaempférol et le 7-hydroxyflavone il faut plus de 0,08 mM pour inhiber 50% de radicaux superoxydes produit par l'hypoxanthine.

Nous concluons que cette différence d'activité est due au groupement catéchol présent dans la lutéoline et la fisétine alors qu'il est absent dans la galangine, le kaempférol et le 7-hydroxyflavone.

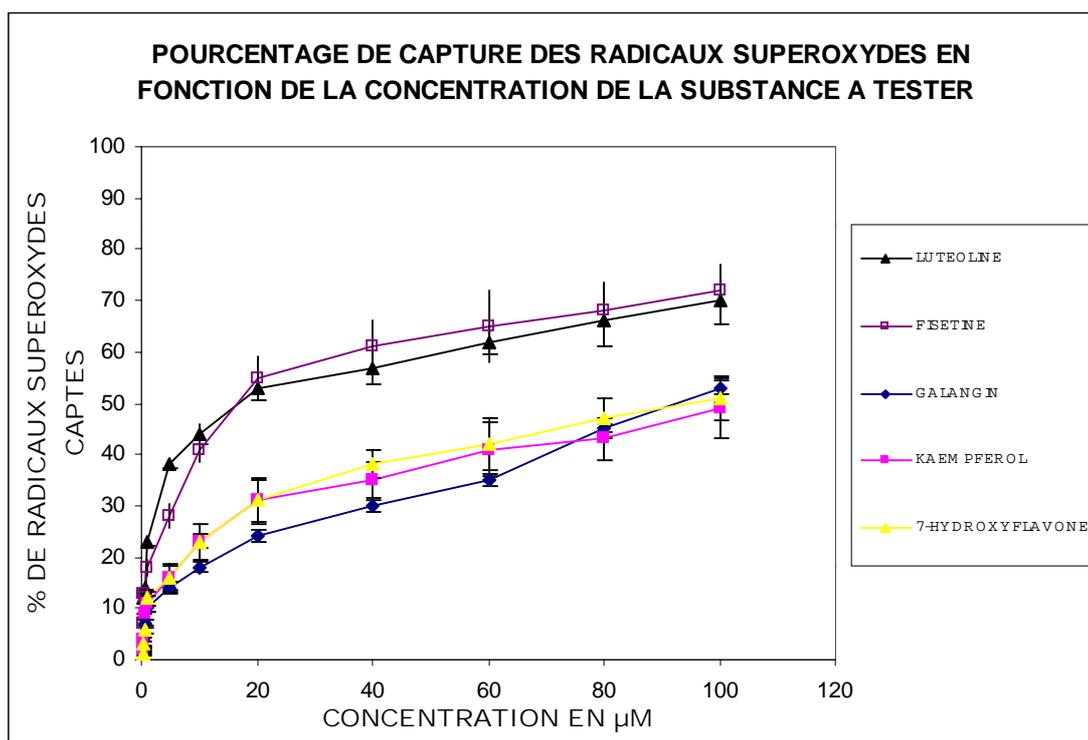


Figure 8 : Courbes de capture des radicaux superoxydes par des dérivés de la quercétine ayant des groupements OH en moins.

II- CAPTURE DU RADICAL HYDROXYLE

I. Choix de la méthode

L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est formé dans tous les organismes aérobies. Il a été observé que les systèmes capables de générer l'anion $O_2^{\bullet-}$, peuvent tuer les bactéries, inactiver les virus, endommager les enzymes et les membranes, et enfin détruire les cellules en culture [Fridovich ; 1978, Bors et al. ; 1978b]. Puisque l'anion $O_2^{\bullet-}$ lui-même, est peu réactif en milieu aqueux [Sawyer et Gibian ; 1979], ceci suggère que ces endommagements sont causés par certaines espèces plus réactives, dépendant de l'anion $O_2^{\bullet-}$. En fait, la plupart de ces effets sont diminués par les capteurs du radical hydroxyle. Cette capture est souvent en corrélation avec les constantes de vitesse de réaction de ces capteurs avec le radical hydroxyle. Il a été suggéré que le radical OH^{\bullet} , extrêmement réactif, provenant de l'anion $O_2^{\bullet-}$ était la véritable espèce nocive [Fridovich ; 1978, Bors et al. ; 1978b, Sawyer et Gibian ; 1979, Halliwell et al. ; 1980]. La formation du radical OH^{\bullet} à partir de l'anion $O_2^{\bullet-}$ a été observée au cours de nombreux essais, grâce à ses actions diverses:

- oxydation du méthional et des composés apparentés à l'éthylène [Beauchamp et Fridovich ; 1970],

- dégradation du tryptophane [McCord et Day ; 1978],
- réaction avec le “spin trap” pour former le signal caractéristique d’ESR [Buettner et al. ; 1978],
- décarboxylation de l’acide benzoïque [Sagone et al. ; 1980] et
- oxydation du désoxyribose en composé acide thiobarbiturique actif [Halliwell et Gutteridge ; 1981].

I.1. Production et détection du radical hydroxyle

I.1.a. Production du radical hydroxyle

Nous citerons ici les trois méthodes les plus courantes pour générer le radical OH^\bullet :

- radiolyse de l’eau : pendant la radiolyse de l’eau, deux radicaux libres sont principalement formés: le radical OH^\bullet et l’électron aqueux (e_{aq}). Si ce processus se déroule en présence de N_2O ou de peroxyde d’hydrogène, le radical OH^\bullet sera presque le seul radical libre formé.
- photolyse : plusieurs systèmes de photolyse ont été utilisés pour générer le radical OH^\bullet , mais la photolyse du peroxyde d’hydrogène est la plus pratique, produisant deux radicaux OH^\bullet par molécule de peroxyde d’hydrogène.
- réactions chimiques : la source la plus utilisée pour générer le radical OH^\bullet est la réaction de Fenton [Cohen ; 1986] ou décomposition catalytique de l’ H_2O_2 par l’action du fer:



Cette source est simple, pratique et non coûteuse. Winterbourn en 1987 a montré récemment qu’environ 90% des oxydants formés semblent être des radicaux OH^\bullet , si le fer chélaté par l’EDTA est utilisé.

Trois systèmes de production de radicaux OH^\bullet , à partir de la réaction de Fenton, sont décrits et utilisés dans la littérature:

- système xanthine/xanthine oxydase (X.O.)/complexe (Fe^{2+} -EDTA) [Richmond et al. ; 1981]
- système H_2O_2 /(Fe^{3+} -EDTA) [Gutteridge et al. ; 1990, Gutteridge ; 1985]

Le complexe (Fe^{3+} -EDTA) préparé directement ou à partir de sel ferreux, réagit avec le peroxyde d’hydrogène et forme le radical hydroxyle.

- système complexe (Fe^{3+} -EDTA) acide ascorbique avec ou sans H_2O_2 [Cohen et Cederbeau ; 1980, Mahoney et Graf ; 1986 ; Scraps et al. ; 1983] .

L’acide ascorbique peut jouer deux rôles dans ce système. D’une part, après avoir été oxydé par catalyse du Fe^{3+} , il peut produire l’anion superoxyde qui se dismute en H_2O_2 fournissant à son tour le radical OH^\bullet . D’autre part, il peut régénérer le fer (II) et ainsi produire à nouveau le radical OH^\bullet .

Dans notre laboratoire, nous ne disposons pas d’installations pour réaliser la radiolyse et la photolyse. Nous avons utilisé des systèmes basés sur la réaction de Fenton comme source de radical OH^\bullet : le système H_2O_2 -(Fe^{3+} -EDTA) acide ascorbique.

I.1.b. Détection du radical hydroxyle

Comme nous l'avons dit précédemment, la mise en évidence de la formation du radical hydroxyle n'est pas facile. Le radical OH^\bullet est très réactif et a une durée de vie très courte. De plus, il se trouve généralement en concentrations très faibles.

En principe, pour le détecter, des méthodes dites indirectes sont utilisées qui détectent les produits de sa réaction. Par exemple, peuvent être mesurées l'oxydation et/ou la décomposition de certains substrats cibles, tels que le désoxyribose, l'acide linoléique, la méthionine, etc... [Greenwald ; 1986]. La conséquence de cette oxydation est la formation de nouveaux produits (le malonaldéhyde, l'éthylène) qui seront détectés et quantifiés.

Comme méthode directe, la résonance paramagnétique électronique (RPE) est utilisée pour détecter l'adduit radicalaire formé par addition du radical OH^\bullet sur un "spin trap", le DMPO (5,5-diméthyl 1-pyrroline N-oxyde) qui est le plus employé.

La capacité des substances à piéger le radical hydroxyle est souvent évaluée par le pourcentage d'inhibition de la réaction du radical OH^\bullet avec une molécule détectrice. Cette mesure est relative et dépend surtout de la méthode utilisée et des conditions expérimentales. Il est donc très important de connaître la constante de vitesse (k) de réaction de la substance concernée. La technique de radiolyse pulsée permet de déterminer avec plus de précision ces constantes [Clement et Armstrong ; 1972].

La méthode indirecte est en général la plus utilisée et les constantes de vitesse relatives sont mesurées. La réaction de la molécule détectrice avec le radical OH^\bullet , en présence et en absence de substance à étudier, est alors suivie par une méthode d'analyse appropriée. La constante de vitesse relative de cette substance peut être obtenue par la valeur de k_s pour la molécule détectrice.

Les molécules détectrices utilisées dans la littérature, sont nombreuses. On peut citer le désoxyribose [Halliweli et al. ; 1987], la dopamine [Slivka et Cohen ; 1985], la thymine [Hicks et Gebicki ; 1986], la 4- nitrosodiméthylaniline [Kraljic et Yrumbore ; 1965], etc...

Dans nos expérimentations nous avons choisi le désoxyribose. Cette molécule est dégradée par le radical hydroxyle en malonaldéhyde (MDA) [Cheeseman et al. ; 1988]. Le MDA ainsi produit peut réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide et par chauffage pour former un complexe qui absorbe à 532 nm. Cette réaction peut être suivie par spectrophotométrie visible [Read et Randat ; 1988].

La molécule capable de réagir avec le radical OH^\bullet , une fois ajoutée dans le milieu réactionnel, va entrer en compétition avec le désoxyribose pour capter le radical OH^\bullet . Il va en résulter une diminution de la vitesse de la dégradation du désoxyribose. Cette dernière dépend d'une part, de la constante de vitesse de la molécule à étudier et d'autre part, de sa concentration relative par rapport à celle du désoxyribose. Si on suppose que l'attaque initiale du radical OH^\bullet sur le désoxyribose est l'étape déterminante de la vitesse de formation du MDA alors, l'analyse des résultats en terme de simple compétition doit permettre de calculer la constante de vitesse de la molécule concernée.

I.1. Réaction de Fenton choisie pour étudier l'activité de capture du radical OH^\bullet

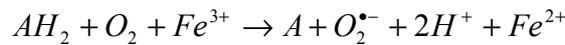
I.2.a. Production des radicaux hydroxyles

La réaction la plus utilisée pour générer le radical hydroxyle (OH^\bullet) est la réaction de Fenton (schématisée ci-dessous) où il y a une décomposition catalytique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action du fer.



Nous avons utilisé comme système de production du radical OH^\bullet la méthode validée au laboratoire [Zhao ; 1991]. Il s'agit du système complexe ($Fe^{2+}/EDTA$)-acide ascorbique et H_2O_2 . L'acide ascorbique joue deux rôles dans ce système :

- D'une part, après avoir été oxydé par catalyse du Fe^{3+} , il peut produire l'anion superoxyde qui se dismute en H_2O_2 , fournissant à son tour le radical OH^\bullet :



AH_2 : acide ascorbique A : acide déhydroascorbique

- D'autre part, l'acide ascorbique peut régénérer le fer (II) et ainsi produire à nouveau le radical OH^\bullet .

En résumé, le radical hydroxyle est produit par réaction entre le fer ($Fe^{2+}/EDTA$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence d'acide ascorbique.

I.2.b. Principe de détection du radical hydroxyle

La mise en évidence du radical hydroxyle n'est pas facile, car il est très réactif et a une durée de vie très courte. Pour le mettre en évidence, des méthodes indirectes qui détectent les produits de sa réaction sont utilisées.

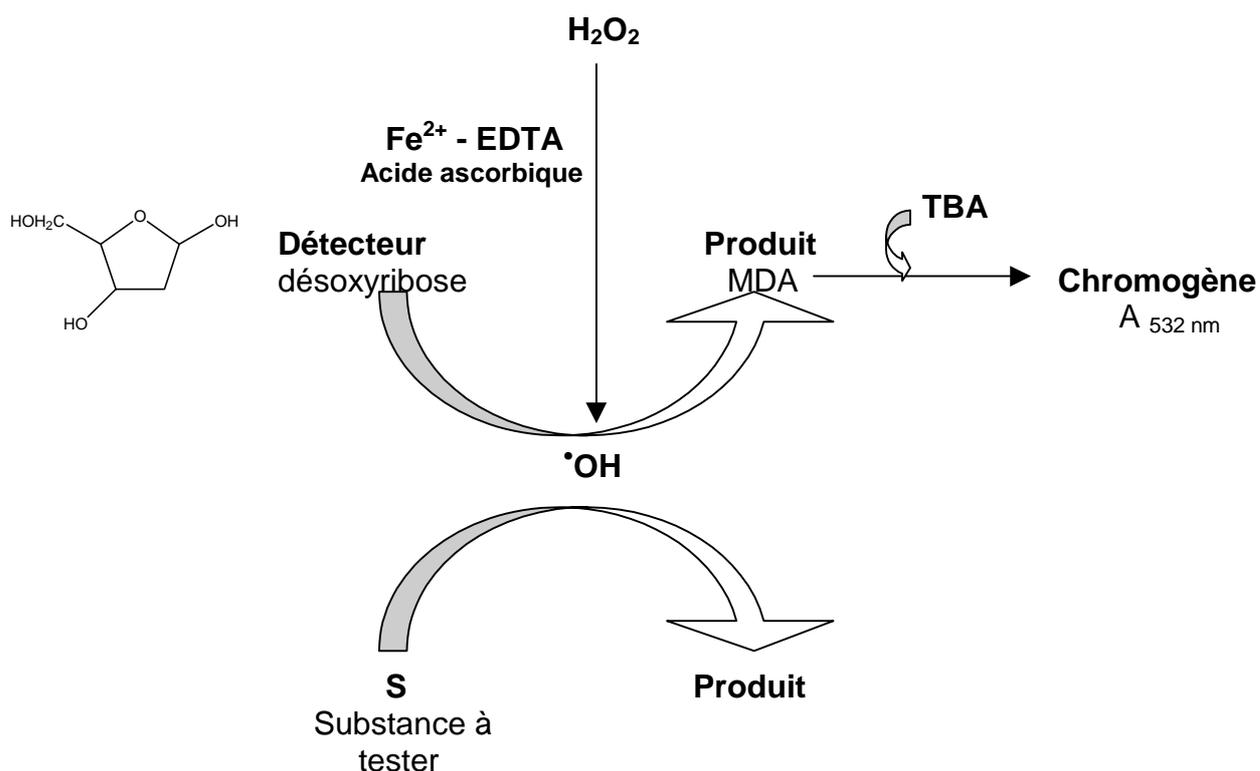


Figure 9 : Principe de détection des radicaux OH•

Le désoxyribose, par action du radical hydroxyle, va être dégradé en malondialdéhyde (MDA) dont l'apparition est suivie par réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le produit ainsi formé est détectable par une mesure d'absorbance à 532 nm. La capture du radical OH• par la substance à étudier, se fait par compétition avec le désoxyribose. Ainsi une diminution de la quantité du chromogène formé est observée se traduisant par une diminution de l'absorbance (Figure 9).

Pour cette étude, la formule suivante a été développée :

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A^\circ} \left(1 + \frac{K_s[S]}{K_D[D] + K_x} \right) \quad \text{Equation n° 1}$$

On pose l'hypothèse suivante : La vitesse de production du radical est égale à la vitesse de production du radical en présence de la substance, c'est-à-dire, la substance n'intervient pas dans le système de production du radical hydroxyle ($V_{OH^\bullet} = V^s_{OH^\bullet}$).

k_D et k_S représentent respectivement les constantes de vitesse de réaction du désoxyribose (D) et de la substance à tester (S) ; $k_D = 2,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{Sec}^{-1}$ [Zhao et Jung ; 1995].

A° : absorbance à 532 nm en absence de la substance à étudier S

A : absorbance à 532 nm en présence d'une concentration donnée de S

$[S]$: concentration de la substance à étudier

$[D]$: concentration en désoxyribose = 0,6 mM

k_x représente la part des radicaux réagissant avec l'acide ascorbique, le complexe Fe-EDTA ou le peroxyde d'hydrogène.

k_X : constante de capture du radical hydroxyle par le milieu réactionnel

On considère que les radicaux hydroxyles peuvent réagir avec la substance à étudier (S), le détecteur (D), mais aussi avec les composés du milieu réactionnel (X).

Le schéma cinétique des réactions du radical OH^\bullet avec les composés D et S est présenté sur la figure 10:

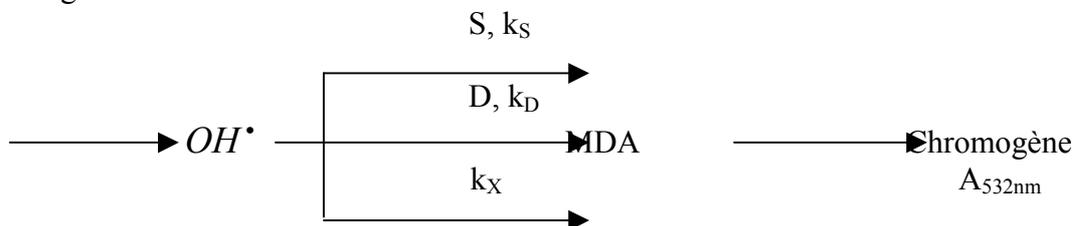


Figure 10 : Schéma cinétique de la réaction du radical OH^\bullet

La représentation A°/A en fonction de $[S]$ donne une droite de pente « a » qui permet la détermination de la constante cinétique de capture des radicaux hydroxyles selon l'équation:

$$k_S = a (k_D \times [D] + k_X) \quad \text{Equation n}^\circ 2$$

Remarque :

La valeur de k_X dépend des conditions expérimentales. Sa détermination se fait par l'étude de l'influence de la concentration en désoxyribose à l'absorbance de 532 nm, en traçant la courbe $1/A$ en fonction de $1/[D]$ (annexe 11), selon l'équation :

$$\frac{1}{A^\circ} = \frac{1}{V_{OH}} \left(1 + \frac{k_X}{k_D [D]} \right) \quad \text{Equation n}^\circ 3$$

On obtient une droite de pente « a » et d'ordonnée à l'origine « b », d'où la détermination de k_X selon l'équation :

$$k_X = \frac{a}{b} \times k_D \quad \text{Equation n}^\circ 4$$

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

- Les différentes substances à étudier sont présentées dans le Tableau 3.
- Les substances nécessaires à la production des radicaux OH^\bullet sont :
 - Acide ascorbique
 - Sulfate d'ammonium ferreux
 - EDTA
 - Peroxyde d'hydrogène
- Les substances nécessaires pour la détection sont:
 - Désoxyribose
 - Acide thiobarbiturique (TBA)

II.2. Préparation des différentes solutions

- Tampon phosphate mono et disodiques à pH 7,4
- Solution de désoxyribose (concentration finale 0,6 mM)
- Solution d'acide ascorbique (concentration finale 0,6mM)
- Solution de Fe^{2+} /EDTA (0,2 mM)
- Solution d'acide thiobarbiturique (ATB) (0,2 mM)
- Solution d'acide trichloracétique (0,2 mM)
- Solution de peroxyde d'hydrogène (0,86 mM)
- Une gamme de 7 concentrations du produit à étudier

II.3. Protocole expérimental

Trois tubes pour chacune des 7 concentrations du produit à tester, sont préparés. Dans chacun, 2,5 mL de tampon phosphate à pH 7,4 sont introduits et ceci dans un bain de glace pilée. Sont ajoutées 100 μl de la solution à tester (concentrations variées), 100 μl de la solution de désoxyribose (0,6 mM) et 100 μl d'une solution d'acide ascorbique (0,6mM). Après addition de 100 μl d'une solution de peroxyde d'hydrogène (0,86 mM), 100 μl d'une solution de Fe^{2+} /EDTA qui initie la réaction sont introduits.

Les tubes sont mis immédiatement au bain-marie à 37 °C pendant 15 minutes. Pour arrêter la réaction, 1,5 mL d'acide trichloracétique froid sont ajoutés.

Un aliquot de 1 mL de chaque solution ainsi obtenue, est mélangé avec 1 mL d'ATB dans le but d'obtenir une solution colorée du chromogène par interaction entre l'ATB et le MDA à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, les absorbances des différentes solutions sont mesurées. Chaque expérience est répétée trois fois.

$k_x = 3,11 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ (annexe 11).

II.4. Molécule de référence

Avant de commencer les diverses expériences, nous avons vérifié la validité de la méthode en utilisant comme molécule de référence le mannitol, car il présente un pouvoir capteur des radicaux OH^\bullet . La constante de vitesse du mannitol selon la littérature est de 10^9 à $2.10^9 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ [Goldstein et Czapski ; 1984].

Le résultat obtenu est représenté dans la figure 11:

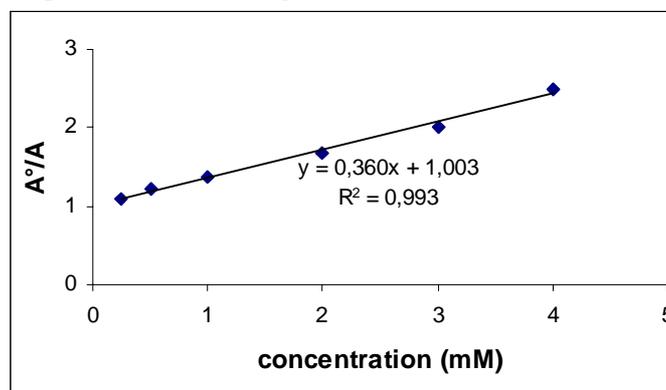


Figure 11 : Variation de A°/A en fonction de la concentration de mannitol

On trouve une constante de capture : $k_s = 1,68.10^9 \text{ M}^{-1}\text{Sec}^{-1}$ en accord avec celle observée dans littérature.

III. Résultats et discussions

Les constantes de vitesse de capture du radical hydroxyle k_s , obtenues d'après les courbes de A°/A en fonction de la concentration de la substance à tester (annexe 1-4), sont regroupées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Constantes de capture de OH^\bullet

Composé	Constante ($M^{-1}.Sec^{-1}$)
Quercétine	Résultats inexploitable
MonoHEQ	Résultats inexploitable
DiHEQ	Résultats inexploitable
Rutine	$5.2 \pm 0.12(x10^9)$
MonoHER	$5.2 \pm 0.56(x10^9)$
DiHER	$5.2 \pm 0.44(x10^9)$
Fisetine	Résultats inexploitable
Lutéoline	$2.7 \pm 0.35(x10^9)$
Galangin	Résultats inexploitable
Kaempférol	Résultats inexploitable
7-hydroxyflavone	Résultats inexploitable

Les valeurs des constantes sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

D'après le tableau 4 nous constatons que parmi la série de molécules choisies, seules les molécules présentant un caractère hydrophile (substituées par un sucre) à l'exception de la lutéoline ont permis de calculer une constante de capture.

La droite des rapports des absorbances en fonction de la concentration en quercétine n'a pas pu être tracée car les résultats obtenus étaient chaotiques.

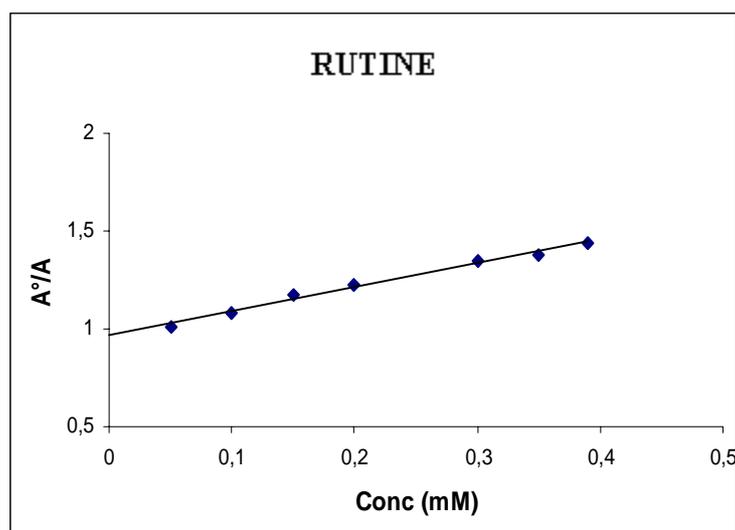


Figure 12: Rapport des absorbances (A°/A) en fonction de la concentration en rutine

Par contre, pour la rutine, le fait qu'elle soit soluble dans le milieu réactionnel (milieu aqueux) permet l'obtention d'une droite qui passe par 1 de la forme : $A^\circ/A = a [S] + 1$.

Cela permet ainsi la détermination d'une constante de capture d'après l'équation (3) $k_s = 5,2 \pm 0,12 \times 10^9 M^{-1}Sec^{-1}$ (figure 12).

La mesure de la capture du radical hydroxyle k_s semble être lié à l'absence du groupement OH en position 3. En effet pour la rutine et ses dérivés, cet OH est substitué par un sucre. Pour la lutéoline le groupement OH est absent en position 3. Or l'hydroxyle en position 3 est responsable du caractère pro-oxydant de la quercétine selon *Jovanovic, S.V. et al. (1998)*. Le principe de Fenton consiste à avoir la même quantité produite de radicaux OH^\bullet en présence et en absence de la substance à tester. Par conséquent si celle-ci est pro-oxydante nous ne serions plus dans les bonnes conditions et la droite si elle existe ne passera plus par 1. C'est le cas de la quercétine qui présente une non linéarité rendant la détermination de k_s impossible. Donc la linéarité est assurée par la solubilité et l'absence du caractère pro-oxydant.

IV. Conclusions

Nous constatons que les principaux problèmes rencontrés durant les études de capture par des systèmes de Fenton sont dus à la solubilité et au caractère pro-oxydant de ces molécules [*Kessler et al. ; 2002*]. Le caractère pro-oxydant est dû à l'hydroxyle en position 3 selon *Jovanovic et al (1998)*. Afin d'étudier l'activité antioxydante des hydroxyflavones nous avons préparé des molécules sous forme hydrosoluble tout en substituant surtout l'hydroxyle en position 3. Ainsi, c'est sous forme salifiée que nous avons décidé d'étudier l'activité antioxydante de ces molécules.

III- ETUDE DES HYDROXYFLAVONES APRES DISSOLUTION DE DIFFERENTES HYDROXYFLAVONES DANS LA SOUDE A PH 10

I. Introduction

Nous avons étudié les propriétés antioxydantes par capture de radicaux libres oxygénés d'une série de flavonoïdes, dont la quercétine. Il a été montré que la quercétine et certains dérivés possèdent un pouvoir de capture des anions $O_2^{\bullet -}$, alors qu'ils semblent participer à la production des radicaux OH^\bullet .

Selon l'équation (1), la représentation de A°/A en fonction de la concentration en produit testé ne passe pas par 1 et n'est linéaire que si $V^{OH^\bullet} = V^s OH^\bullet$.

V^{OH^\bullet} peut être différente de $V^s OH^\bullet$ s'il existe une stimulation de la production des radicaux hydroxyles par la quercétine. Or la représentation A°/A en fonction de la concentration en quercétine n'est pas linéaire, ce qui suggère qu'elle intervient dans le système de production des radicaux OH^\bullet [*Kessler ; 2000*].

Ce caractère pro-oxydant a été observé par différents auteurs dans des systèmes du type Fenton [*Kessler et al. ; 2002, Laughton et al ; 1989, Miura et al. ; 1998*]. En effet, les absorbances obtenues en présence de la quercétine sont supérieures à celles du témoin. Or une augmentation d'absorbance est directement proportionnelle à une augmentation de MDA formé, donc à une augmentation de la quantité de radicaux formés. De ce fait, ils ont conclu, que la quercétine possède un caractère pro-oxydant dans le système de production des radicaux OH^\bullet .

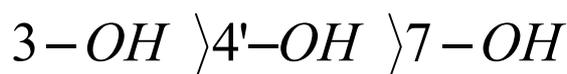
La quercétine ainsi que d'autres flavonoïdes étant insolubles dans le milieu aqueux réactionnel, une suspension dans la gomme arabique a été utilisée pour l'étude de la capture

des radicaux OH^\bullet et dans le triton pour l'étude de la capture des anions superoxydes. Dans ces conditions, on peut s'attendre à des résultats variables ou inexploitable. Pour éviter cela, nous avons poursuivi l'étude du pouvoir capteur de la série des hydroxyflavones étudiée précédemment dans des conditions expérimentales différentes. Au lieu d'utiliser une suspension dans la gomme arabique ou bien dans le triton, nous avons utilisé une solution de soude pour solubiliser ces molécules avant de les étudier dans le milieu réactionnel à pH 7,4. Les hydroxyflavones ainsi pré-solubilisés sont devenus l'objet de nos études.

D'une part, *Kadykova et al. (1993)*, *Georgievskii (1980)* et *Rybachenko (1981)* ont démontré que les hydroxyflavones possèdent des protons ayant des propriétés acides selon la position du groupement hydroxyle par spectroscopie et luminescence. Selon ces auteurs l'ordre croissant des pK_a des groupements hydroxyles présentent dans nos structures est le suivant :



D'autre part *Agrawal et al.* en 1983 attribue un ordre de pK_a différent aux groupements OH par C^{13} RMN :



Dans la série de molécules choisies, les hydroxyflavones portent des hydroxyles en positions 3, 4', 3', 7 et 5.

La quercétine par exemple dissoute à pH 10 permettent l'obtention d'une solution alcaline de quercétine en solution aqueuse.

Selon *Kadykova et al. (1993)*, les acidités de la quercétine par ordre décroissant ont été décrits comme suit:

$$pK_1 = 7,70 \text{ (position 3)} > pK_2 = 8,77 \text{ (position 4')} > pK_3 = 9,81 \text{ (position 7)}.$$

Quand au H^+ en position 5, il paraît moins acide du fait d'un pont d'hydrogène entre ce H^+ et le carbonyle en position 4. D'autres auteurs comme *Escandar et Sala* en 1991, ont déterminé des valeurs de pK_a plus faibles 5,54, 6,95, 8,21, 9,77.

L'attribution des pK_a s pour chaque position est statistiquement difficile à déterminer expliquant ces controverses dans la littérature.

Avec les valeurs données par les premiers auteurs cités précédemment nous pouvons imaginer qu'à pH 10 nous arrivons à former un tri-anion de quercétine (Fig.13a):

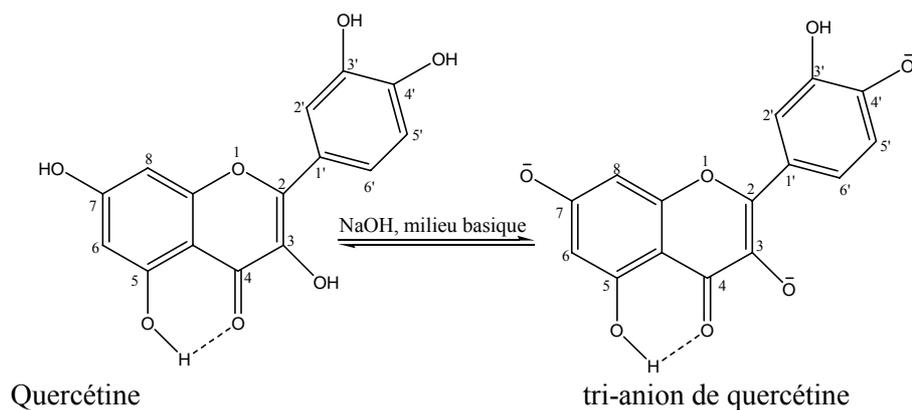


Figure 13a : réaction de déprotonation de la quercétine

Alors que si nous tenons compte des valeurs données par Escandar et Sala nous pouvons imaginer qu'à pH 10 nous arrivons à former un tétra-anion voir un penta-anion de quercétine (Fig.13b) :

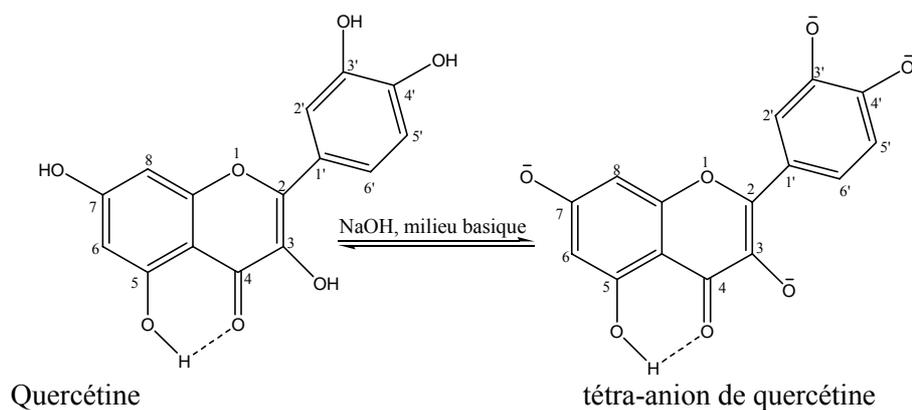


Figure 13b : réaction de déprotonation de la quercétine

II. Matériels et méthodes

II.1. Préparation des solutions alcalines de quercétine et d'autres flavonoïdes

La solution alcaline de quercétine est préparée en ajoutant à une suspension aqueuse de quercétine, une solution de NaOH 0,1M et en mesurant progressivement le pH de la solution. L'addition de NaOH 0,1M est arrêtée lorsque la valeur de pH était de 10, puisque d'après *D.W. Salter et al. en 1978*, un pH supérieur à 10,2 risque de dégrader la molécule. Le milieu réactionnel dans l'étude de la capture des radicaux libres oxygénés présente un pH de 7,4 (tampon phosphate). L'addition de cette solution de quercétine ainsi préparée à ce tampon n'entraîne aucune variation de pH. De cette façon, nous avons pu préparer des molécules solubles dans l'eau tout en restant dans les valeurs de pH inférieures à celles de la dégradation des hydroxyflavones.

De la même manière, les autres solutions de flavonoïdes sont préparées. Les structures chimiques de ces molécules sont présentées dans la figure 14 et le tableau 5. Le pouvoir de

capture de radicaux libres oxygénés de ces solutions de flavonoïdes sera étudié ultérieurement.

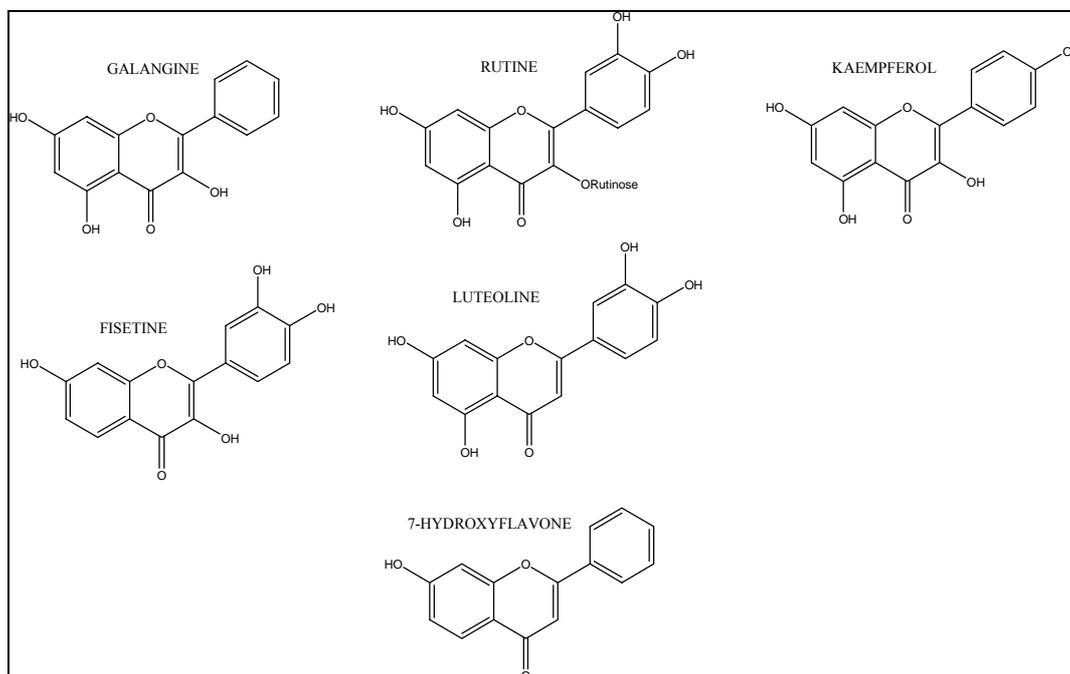


Figure 14 : flavonoïdes étudiés.

Tableau 5 : Structure de la forme anionique la plus déprotonée des hydroxyflavones formés à pH 10 selon les pKa de *Kadykova*

Composé	substitution OH	O ⁻	substitution OC ₂ H ₅ OH	substitution ORutine
Quercétine	5,3'	3,4',7	—	—
MonoHEQ	5,3'	3,4'	7	—
DiHEQ	5,3'	3	7,4'	—
Rutine	5,3'	4',7	—	3
MonoHER	5,3'	4'	7	3
DiHER	5,3'	—	7,4'	3
Fisetine	3'	3,7,4'	—	—
Galangine	5	3,7	—	—
Kaempferol	5	3,7,4'	—	—
Lutéoline	5,3'	7,4'	—	—
7-Hydroxyflavone	—	7	—	—

II.2. Etude de stabilité des anions formés

Les anions des hydroxyflavones sont préparés dans un milieu alcalin à pH 10 et leur activité antioxydante par capture de radicaux libres est étudiée dans un tampon à pH 7,4. Aussi, il est indispensable d'étudier la stabilité de ces anions dans un milieu à pH 10 et après solubilisation dans le milieu réactionnel à pH 7,4.

II.2.a Spectroscopie UV/Visible

- Dans cette étude, la stabilité des anions dans le tampon phosphate de sodium à pH 7,4 est suivie par spectrophotométrie d'absorbance dans l'UV/VIS en fonction du temps à la longueur d'onde spécifique de chaque molécule. Dans nos conditions expérimentales, nous avons noté que la valeur de l'absorbance reste stable dans le temps durant notre expérimentation (30 minutes). Dans les figures 15 et 16 sont représentés deux exemples de cette étude parmi les différents solutions des hydroxyflavones : celle de la quercétine et celle de la lutéoline.

Dans le cas du mélange de la solution alcaline de quercétine formés à pH 10 (Figure 15), l'absorbance à 370 nm dans un tampon à pH 7,4 est stable durant 60 minutes puis diminue au cours du temps. Ceci nous a conduit à envisager deux possibilités : soit la molécule se dégrade avec le temps, soit il y a formation des formes protonées après 60' puisque le pH du tampon est de 7,4 et à ce pH il existe une quantité de quercétine de départ qui se forme et précipite au fur et à mesure.

Dans le cas de la solution de lutéoline (Figure 16), l'absorbance est stable durant 200 minutes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la lutéoline ne possède pas un hydroxyle en position 3. En effet si la plus forte acidité se trouve surtout en position 3, la lutéoline se dégrade moins facilement que la quercétine à ce pH. Les structures des autres molécules se positionnent entre ces deux molécules du point de vue stabilité et solubilité car ils possèdent moins de groupements hydroxyle que la quercétine dont l'un se trouve en position 3, à l'exception du 7-hydroxyflavone.

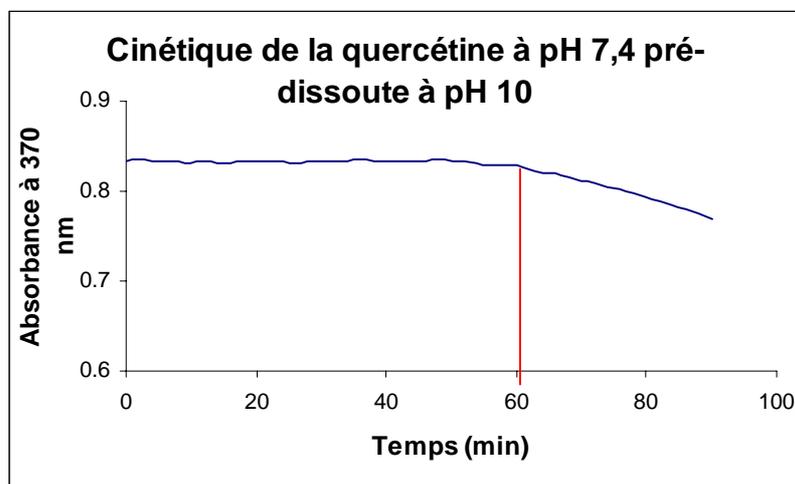


Figure 15 : variation de l'absorbance en fonction du temps pour la quercétine pré-dissoute à pH 10 et diluée dans le tampon à pH 7,4

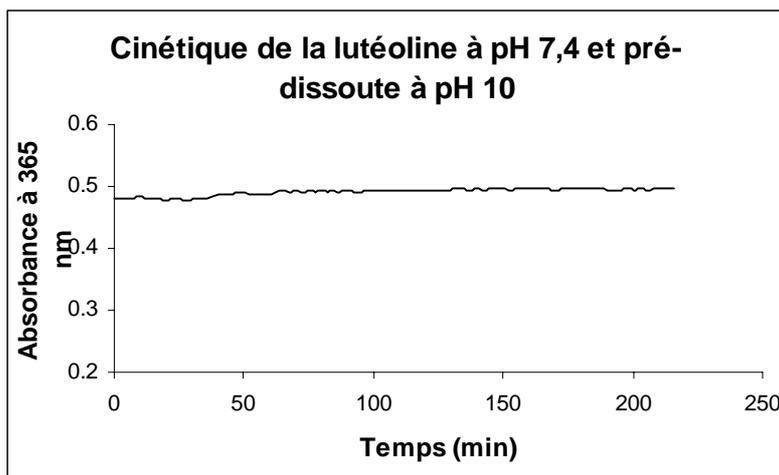


Figure 16 : variation de l'absorbance en fonction du temps pour la lutéoline pré-dissoute à pH 10 et diluée dans le tampon à pH 7,4

- Une deuxième étude est réalisée afin de déterminer la demi-vie de la quercétine à pH 10. Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet visible de la solution de quercétine à pH présente un pic avec un maximum d'absorption à 462 nm. L'étude de la cinétique est réalisée donc à 462 nm (Fig 15 a).

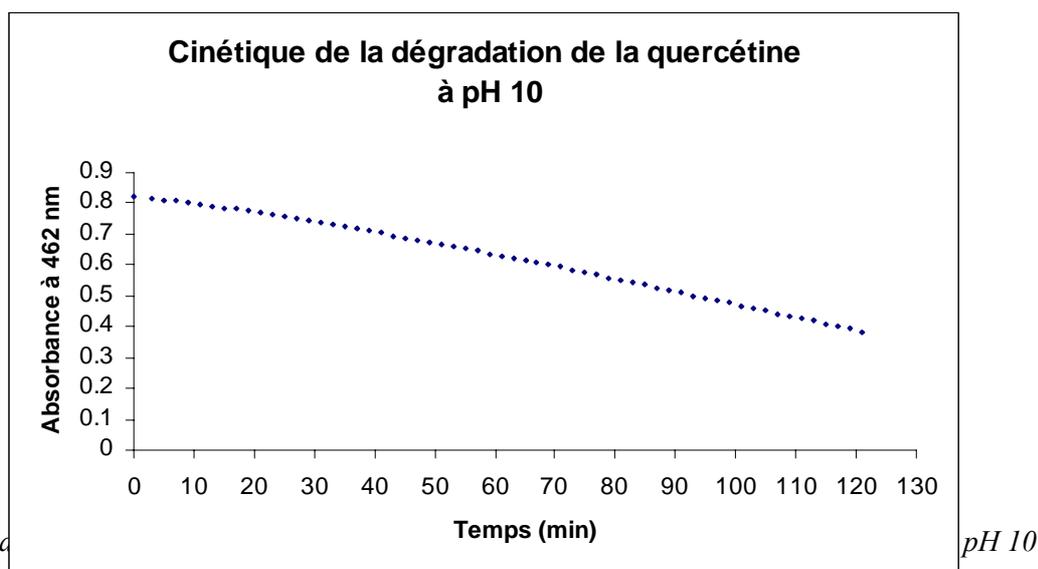


Figure 15a

pH 10

La demi-vie de la quercétine à pH 10 est déterminée par la mesure de l'absorbance de la forme anionique de la quercétine à 462 nm en fonction du temps à 25°C. Nous trouvons une demi-vie de 1h 55 minutes. Durant nos expériences la quercétine est pré-dissoute à pH 10 et puis ajoutée dans le milieu réactionnel après cinq minutes. Durant cette période (5 minutes) et d'après ce résultat la quercétine se dégrade donc à 1,2 %.

II.2.b Chromatographie liquide

Conditions expérimentales :

Appareil : BECKMAN GOLD.

Colonne :

- Dimension : longueur = 250 mm, diamètre = 4 mm.
- Phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 µm).
- Température : 15-25 °C

Débit : 1,3 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à la longueur d'onde de 370 nm.

Injection : 20 µL.

Phase mobile : eau acidifiée à pH 2,3/acétonitrile (65/35, v/v)

Pour vérifier que, durant la préparation des solutions alcalines à pH 10, les molécules ne sont pas dégradées, nous avons étudié leur stabilité par chromatographie liquide. Des solutions des différents flavonoïdes à concentration de 20µg/mL dans le méthanol sont préparées puis injectées sous les conditions chromatographiques précédemment citées. En parallèle, nous avons incubé les mêmes molécules à pH 10 pendant 2 heures à l'abri de la lumière et de l'air. Après réacidification par l'acide chlorhydrique 0,1 M, dans le but de récupérer le produit de départ, nous avons injecté la solution sous les mêmes conditions chromatographiques. Dans la figure 17 les résultats montrent que les surfaces des pics chromatographiques ne présentent aucun changement après 2 heures d'incubation dans un milieu alcalin à pH 10. Des chromatogrammes de certaines molécules sont donnés dans les annexes 5 à 10 qui montrent aussi la présence d'un seul pic au même temps de rétention. Tous ces résultats sont récapitulés dans le Tableau 6.

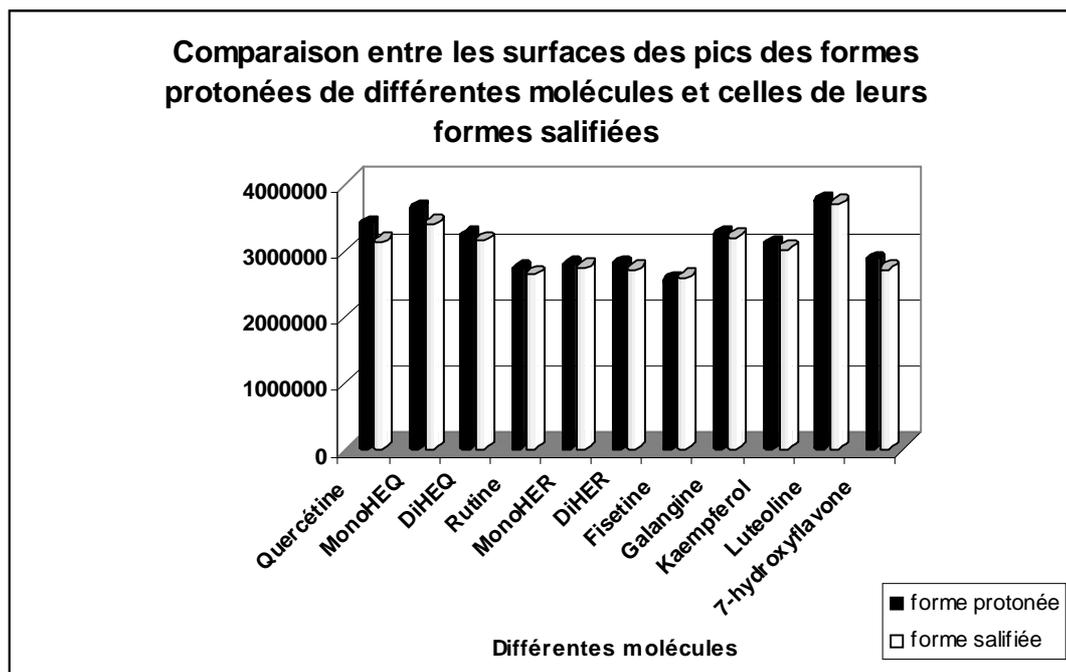


Figure 17 : stabilité des molécules après deux heures d'incubation à pH 10

Tableau 6 : Temps de rétention et surfaces des pics déterminés par CLHP

Molécule	t _r .	t _r . Ap.Inc.	S de pic	S de pic Ap. Inc.
Quercétine	5.1	5.1	3385612	3124575
MonoHEQ	4.5	4.5	3623125	3388175
DiHEQ	4.9	4.9	3211343	3144589
Rutine	2.6	2.6	2701245	2634211
MonoHER	2.6	2.6	2767881	2733122
DiHER	2.6	2.6	2782213	2700134
Fisetine	5.1	5.1	2534122	2581341

Galangine	5.3	5.3	3224415	3194551
Kaempferol	5.2	5.2	3084101	3012355
Luteoline	5.1	5.1	3742451	3701201
7-hydroxyflavone	5.9	5.9	2844667	2712131

t_r : temps de rétention ; *Ap.Inc.* : après deux heures d'incubation à pH 10 ; *S* : surface

III. Résultats de la capture des radicaux libres oxygénés par les solutions pré-dissoutes à pH 10

Le pouvoir de capture des anions superoxydes et le pouvoir de capture des radicaux libres hydroxyles par les solutions pré-dissoutes à pH 10 des hydroxyflavones sont étudiés par les mêmes méthodes décrites précédemment à pH 7,4.

III.1. Résultats de la capture de l'anion superoxyde

Les tests réalisés pour ces solutions permettent d'obtenir des courbes qui présentent le pourcentage des anions superoxydes captés dans le milieu en fonction de la quantité de la substance utilisée. Ces courbes sont présentées dans les figures 18 et 19.

Nous remarquons dans la figure 18 que le MonoHER et la rutine pré-dissouts à pH 10 inhibent entre 75% et 80% de radicaux superoxydes produits dans le milieu à une concentration de 0,1 mM. La quercétine, le MonoHEQ, le DiHEQ et le DiHER pré-dissouts à pH 10 inhibent entre 45% et 60% de radicaux superoxydes produits dans le milieu à une concentration de 0,1 mM.

D'après la figure 19, nous pouvons constater que la lutéoline et la fisétine pré-dissouts à pH 10 possèdent la capacité de capter entre 60% et 70% de radicaux superoxydes pour une concentration de 0,1 mM. La galangine, le kaempférol et le 7-hydroxy-flavone à 0,1 mM inhibent entre 40% et 50% de radicaux superoxydes produits par l'hypoxanthine.

L'activité de capture de l'anion superoxyde des différents composés dissouts directement dans le tampon à pH 7,4 n'est pas significativement différente de celle trouvée lorsque nous pré-dissolvons ces molécules à pH 10 avant de les étudier à pH 7,4.

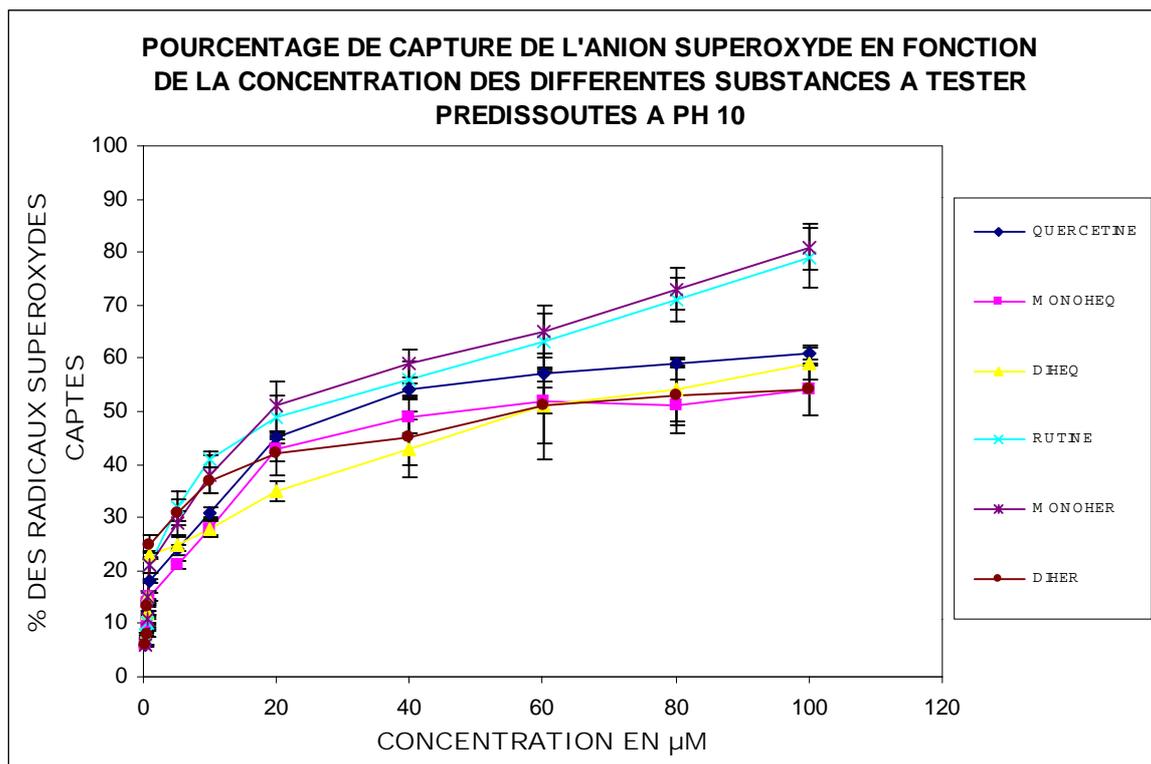


Figure 18 : activité de capture de l'anion superoxyde par les hydroxyflavones prédissoutes à pH 10

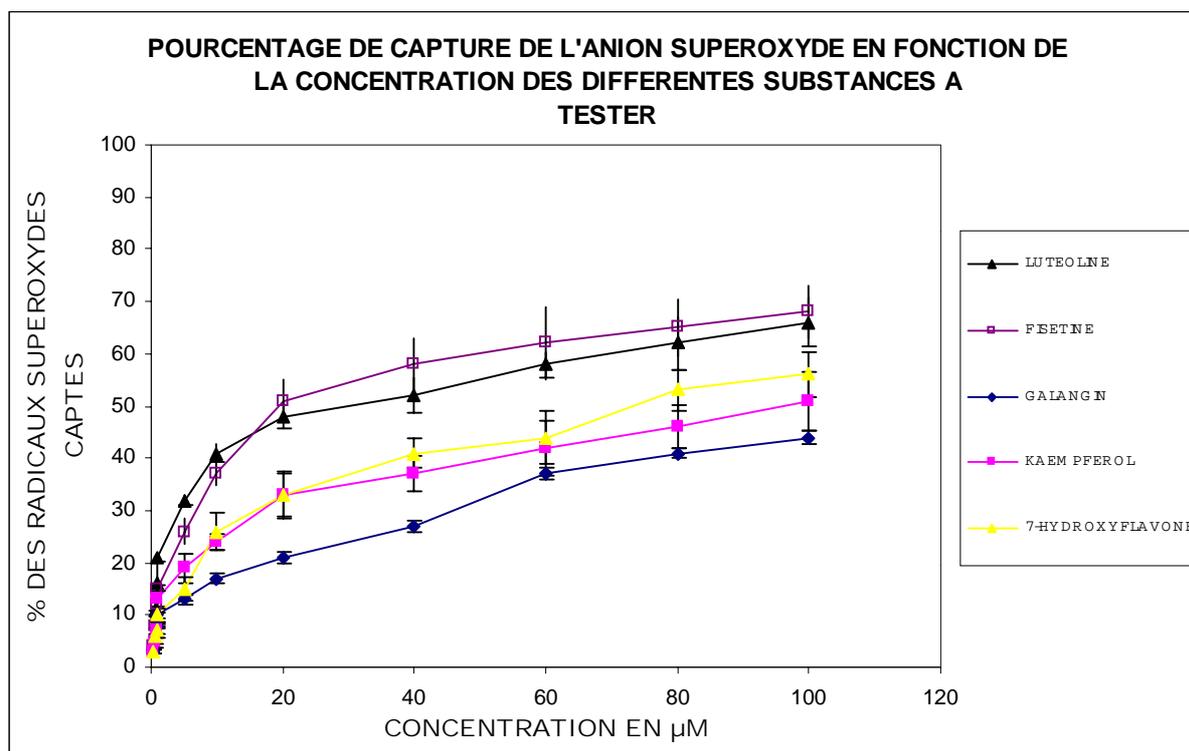


Figure 19 : activité de capture de l'anion superoxyde par les hydroxyflavones prédissoutes à pH 10

En particulier, nous avons représenté dans les figures 20 et 21 les courbes de la capture de l'anion superoxyde de la quercétine préparée de deux manières différentes, ces derniers étant l'objectif principal de nos recherches.

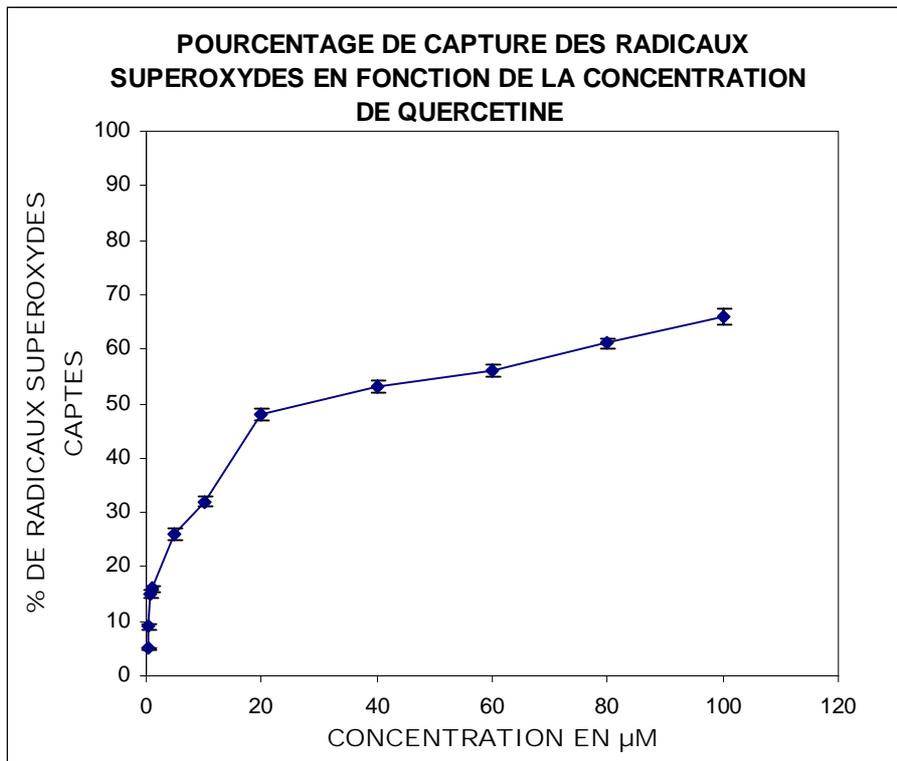


Figure 20 : activité de capture de l'anion superoxyde en fonction de la concentration de la quercétine dissoute directement dans le tampon à pH 7,4

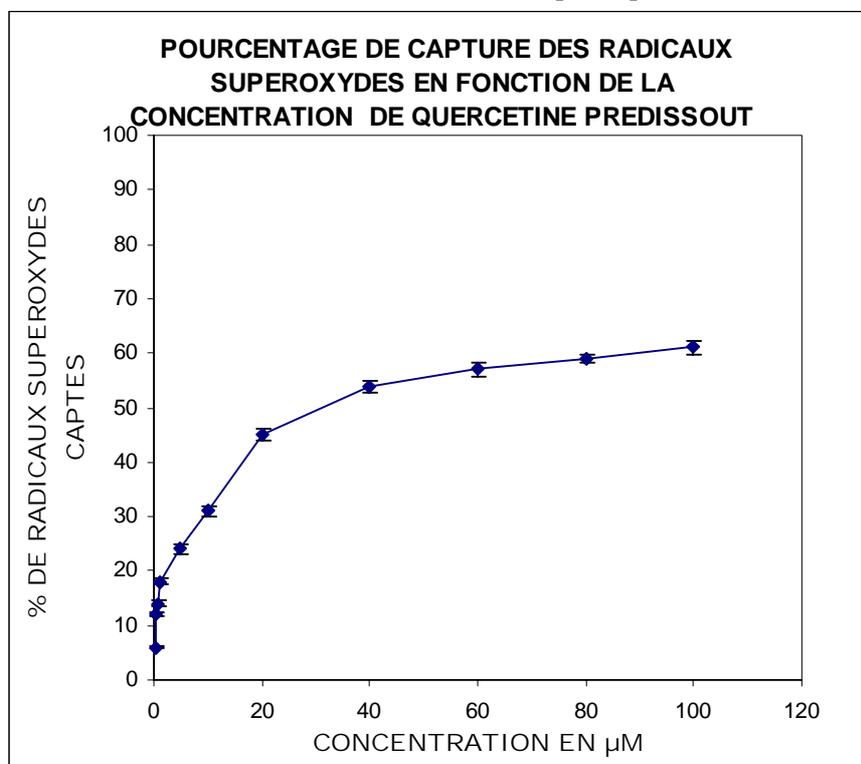


Figure 21 : activité de capture de l'anion superoxyde en fonction de la concentration de la quercétine pré-dissoute à pH 10 puis étudiée dans le tampon à pH 7,4

Ainsi, le fait de pré-dissoudre la quercétine à pH 10 ne modifie pas les résultats concernant la capture des anions superoxydes. En effet, pour la quercétine dissoute directement à pH 7,4 le pourcentage de capture des anions superoxydes est de 66% pour une concentration de 100 μM . Pour la quercétine pré-dissoute, ce pourcentage de capture est de 61% pour la même concentration. Aucune différence significative n'est observée entre ces deux études. Nous concluons que ces résultats reflètent les pKas de *kadykova* et nous estimons qu'à pH 7,4 la quercétine se reforme en solution sachant que la concentration maximale est à 100 μM .

Les IC50 obtenues des hydroxyflavones préparées de deux manières différentes sont calculées et représentées dans le tableau 7. L'IC50 représente la concentration correspondant à la capture de 50% de radicaux superoxydes produits par le système xanthine/xanthine oxydase.

Tableau 7 : Valeurs des IC50.

Composé	IC50 (μM)	composé	IC50 (μM)
Quercétine pré-dissoute	18 \pm 5	Quercétine	21 \pm 3
MonoHEQ pré-dissoute	19 \pm 2	MonoHEQ	18 \pm 6
DiHEQ pré-dissoute	48 \pm 7	DiHEQ	57 \pm 9
Rutine pré-dissoute	19 \pm 3	Rutine	19 \pm 4
MonoHER pré-dissoute	19 \pm 5	MonoHER	19 \pm 3
DiHER pré-dissoute	50 \pm 4	DiHER	53 \pm 6
Fisétine pré-dissoute	19 \pm 2	Fisétine	19 \pm 3
Galangine pré-dissoute	> 80	Galangine	> 80
Kaempferol pré-dissoute	> 80	Kaempferol	> 80
Lutéoline pré-dissoute	18 \pm 4	Lutéoline	18 \pm 7
7-Hydroxyflavone pré-dissoute	> 80	7-hydroxyflavone	> 80

Il n'y a pas de modification de l'activité de xanthine oxydase par les molécules. Tous les rapports (V°/V) obtenus d'après le test de modification de l'activité de la xanthine oxydase sont égaux à l'unité. Les valeurs des constantes sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

D'après le tableau 7, nous remarquons que la présence du groupement catéchol dans la molécule augmente l'activité de capture de l'anion superoxyde. Ceci est nettement démontré en comparant les IC50 de la fisétine et celle du kaempférol, qui possèdent tous les deux le même nombre de groupements hydroxyles. Cette différence est due au fait que la fisétine contient le groupement catéchol.

Que le groupement hydroxyle en position 3 soit présent, libre ou substitué, cela influence peu le pouvoir de capture des radicaux superoxydes. Ceci est constaté par comparaison des IC50 de la lutéoline, de la rutine, du MonoHEQ et de la quercétine qui possèdent tous les mêmes groupements hydroxyles dans les quatre positions à l'exception de celui en position 3.

NB : Les structures chimiques se trouvent dans le tableau 3 et tableau 5.

Comme les résultats sont identiques pour les hydroxyflavones préparées par les deux manières, nous n'avons pas poursuivi les études concernant la capture des radicaux superoxydes.

III.2. Résultats de capture du radical hydroxyle

Les résultats de capture du radical OH^\bullet par les différents flavonoïdes pré-dissouts à pH 10 sont représentés sous forme de graphiques (annexes 11-16). La figure 22 représente un exemple des trois tests réalisés correspondant à la capture du radical hydroxyle par la quercétine pré-dissoute à pH 10.

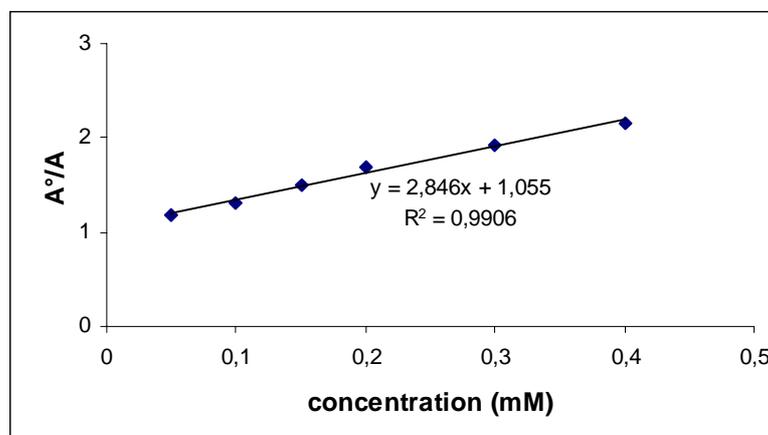


Figure 22 : A°/A en fonction de la concentration en quercétine de la solution alcaline

La constante de capture k_s calculée d'après la pente obtenue, a une valeur très élevée de $1,312 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Le fait de pré-dissoudre la quercétine à pH 10 permet de solubiliser la quercétine : seules les propriétés antioxydantes persistent, le caractère pro-oxydant n'étant plus détectable. La linéarité est une preuve de la solubilité et l'ordonnée à l'origine égale à l'unité est une preuve de l'absence d'interférences dans la production des radicaux OH^\bullet et donc de l'absence du caractère pro-oxydant.

Afin de mieux comprendre l'effet de la pré-dissolution dans un milieu alcalin correspondant à chaque forme des hydroxyflavones, nous avons regroupé les constantes de vitesse de capture du radical OH^\bullet des deux façons de dissolutions dans le tableau 8 pour pouvoir les comparer :

Tableau 8 : Valeurs de la constante de vitesse de capture du radical hydroxyle (k_s).

Composé	$k_s \text{ (M}^{-1} \text{ Sec}^{-1}\text{)}$	Composé	$k_s \text{ (M}^{-1} \text{ Sec}^{-1}\text{)}$
Quercétine pré-dissoute	$1.22 \pm 0.09(x10^{10})$	Quercétine	Résultats inexploitables
MonoHEQ pré-dissoute	$1.19 \pm 0.04(x10^{10})$	MonoHEQ	Résultats inexploitables
DiHEQ pré-dissoute	$1.17 \pm 0.03(x10^{10})$	DiHEQ	Résultats inexploitables
Rutine pré-dissoute	$1.30 \pm 0.15(x10^{10})$	Rutine	$5.2 \pm 0.12(x10^9)$
MonoHER pré-dissoute	$1.31 \pm 0.08(x10^{10})$	MonoHER	$5.2 \pm 0.56(x10^9)$
DiHER pré-dissoute	$1.24 \pm 0.05(x10^{10})$	DiHER	$5.2 \pm 0.44(x10^9)$
Fisétine pré-dissoute	$1.35 \pm 0.02(x10^{10})$	Fisétine	Résultats inexploitables
Galangine pré-dissoute	$0.50 \pm 0.02(x10^{10})$	Galangine	Résultats inexploitables
Kaempferol pré-dissoute	$0.49 \pm 0.06(x10^{10})$	Kaempferol	Résultats inexploitables
Lutéoline pré-dissoute	$0.78 \pm 0.01(x10^{10})$	Lutéoline	$2.7 \pm 0.35(x10^9)$
7-hydroxyflavone pré-dissoute	$0.09 \pm 0.01(x10^{10})$	7-hydroxyflavone	Résultats inexploitables

Les valeurs des constantes sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

IV. Discussions

1. En comparant les résultats de capture par la quercétine à ceux par la lutéoline, nous constatons que la constante diminue fortement, la différence entre les deux molécules étant l'absence de groupement *OH* en position 3 pour la lutéoline.

2. Pour étudier l'influence du groupement *OH* en position 5, nous avons testé la fisétine. Dans la quercétine, le groupement *OH* en position 5 forme un pont hydrogène avec le carbonyle en position 4. Pour prouver que ce groupement *OH* en position 5 n'intervient pas dans la capture, nous avons testé la fisétine et nous avons trouvé approximativement les mêmes résultats qu'avec la quercétine pré-dissoutes à pH 10. Ainsi le groupement *OH* en position 5 n'intervient pas ou peu dans la valeur de la constante k_s de la quercétine.

3. L'importance des deux groupements *OH* phénoliques du noyau B (figure 6, page 43) peut également être étudiée en comparant les résultats obtenus avec la quercétine et ceux obtenus avec le kaempférol et la galangine. Dans le cas du kaempférol, nous voyons que la constante k_s diminue fortement. Le groupement catéchol est un élément clé dans cette étude.

4. Si nous comparons la constante de capture de la quercétine pré-dissoute avec celle de la rutine pré-dissoute, nous voyons que les résultats sont approximativement les mêmes. Comme nous l'avons mentionné en comparant la lutéoline avec la quercétine, le groupement *OH* substitué en position 3 est important dans la structure de la quercétine pour avoir une constante de capture de $1,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ après pré-dissolution.

5. Le 7-hydroxyflavone présente un hydroxyle en position 7 sans autre structure hydroxylée. La valeur de la constante k_s est la plus faible de toutes les molécules étudiées. On peut conclure, en première approximation, que le groupement *OH* en position 7 n'intervient pas dans le pouvoir capteur. Ces résultats confirment l'importance des groupements hydroxyles en position 3, 3' et 4' dans le pouvoir capteur. Nous observons une constante très petite qui nous montre l'importance des autres groupements *OH* dans la molécule.

V. Conclusion

Les hydroxyflavones pré-dissouts à pH 10 et étudiés à pH 7,4 avec le test de Fenton présente une activité deux fois plus importante que dans le cas de la dissolution dans le milieu à pH 7,4 directement. En effet, la réaction de Fenton nécessite des concentrations plus élevées que dans le cas de l'étude de capture de l'anion superoxyde. Si nous tenons compte des valeurs de pKa données par *kadykova* à pH 7,4 pour la quercétine par exemple nous reformons cette molécule et donc nous pouvons conclure que cette méthode de pré-dissolution améliore l'activité de capture. D'autre part, si nous tenons compte des valeurs de pKa données par *Escandar et sala*, à pH 7,4 la quercétine est sous forme di-anionique et la pré-dissolution à pH 10 nous permet de faciliter la dissolution et donc l'obtention rapide des formes anioniques sachant que la quercétine additionnée directement dans le tampon à pH 7,4 se dissout lentement dû à des phénomène de stacking.

Nous pourrions dire que la pré-dissolution des hydroxyflavones à pH 10 nous a facilité l'étude de ces molécules sans recourt à des co-solvants organiques ; ceci nous a permis de conclure la possibilité d'obtenir une forme di-anionique active.

La variation des résultats nous a conduit à penser à l'isolement des différentes formes anioniques de la quercétine en essayant de les précipiter sous forme de sel de sodium.

DEUXIEME PARTIE

SELS SODIQUES DE QUERCETINE

I- SEL MONOSODIQUE, SEL DISODIQUE ET SEL TRISODIQUE DE QUERCÉTINE

La terminologie sel monosodique correspond à une entité monoanionique de quercétine, le sel disodique à une entité dianionique de quercétine et le sel trisodique à une entité trianionique de quercétine. La terminologie a été conservée dans le texte sachant qu'en solution en particulier on est en présence d'entités anioniques.

I. Introduction

Dans la première partie, nous avons démontré que les hydroxyflavones prédissoutes à pH 10 présentent une activité antioxydante par capture des radicaux superoxydes et hydroxyles. La quercétine, un de ces hydroxyflavones, préparée de la même manière ne montre plus de caractère pro-oxydant, et son activité de capture du radical hydroxyle est l'une des meilleures. D'où l'intérêt d'étudier précisément cette molécule qui possède 3 groupements hydroxyles, capables de s'ioniser à pH 10 [Kadykova *et al.*, 1993] ou les 5 groupements hydroxyles qui s'ionisent [Escandar *et Sala*, 1991]. De plus, la quercétine présente un intérêt biologique puisqu'elle est formée dans le tractus gastro-intestinal de l'homme après absorption de différents flavonoïdes.

I.1. Explication théorique des différentes acidités de la quercétine

Nous pouvons expliquer les différentes acidités des 3 protons de la manière suivante.

L'acidité du proton du groupement hydroxyle en position 3 est dû aux effets inductifs du carbonyle en position 4 et de l'oxygène en position 1 et aux effets mésomères. Ce dernier est expliqué par une délocalisation de la charge négative à travers la double liaison (2,3) conjuguée avec le phényle. Cette délocalisation est représentée dans la figure 23 :

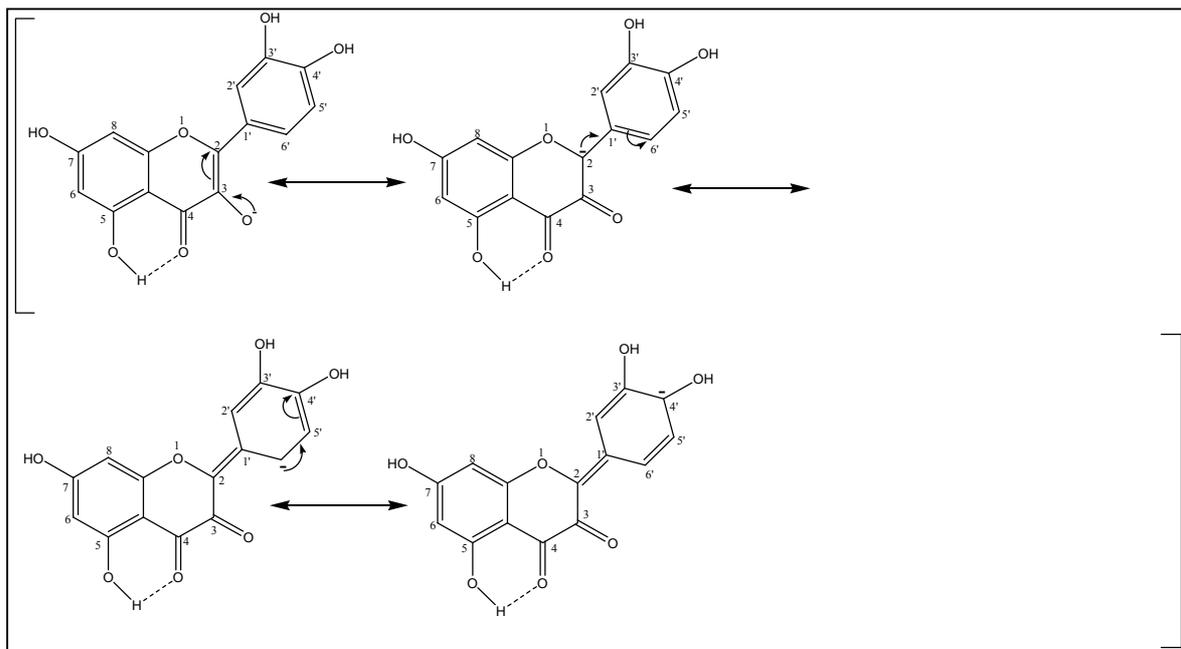


Figure 23 : Acidité du proton de l'hydroxyle en position 3

L'acidité du proton en position 4' peut être expliquée de la même manière que celui du proton de la position 3 ; dans ce cas, l'effet inductif est moins fort car le proton se trouve plus loin de

l'oxygène en position 1 et du carbonyle en position 3. Nous assistons aussi à un effet mésomère : une délocalisation de la charge négative à travers la double liaison vers le carbonyle. Cette délocalisation est représentée dans la figure 24:

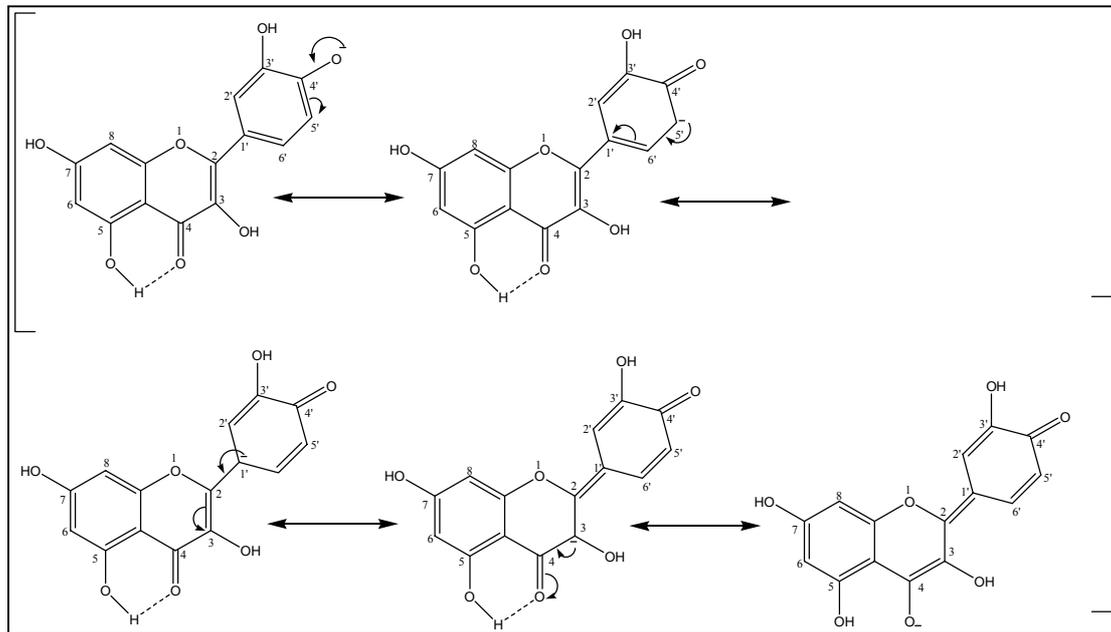


Figure 24 : Acidité du proton de l'hydroxyle en position 4'

L'acidité du proton du groupement hydroxyle en position 7 est expliquée dans la figure 25.

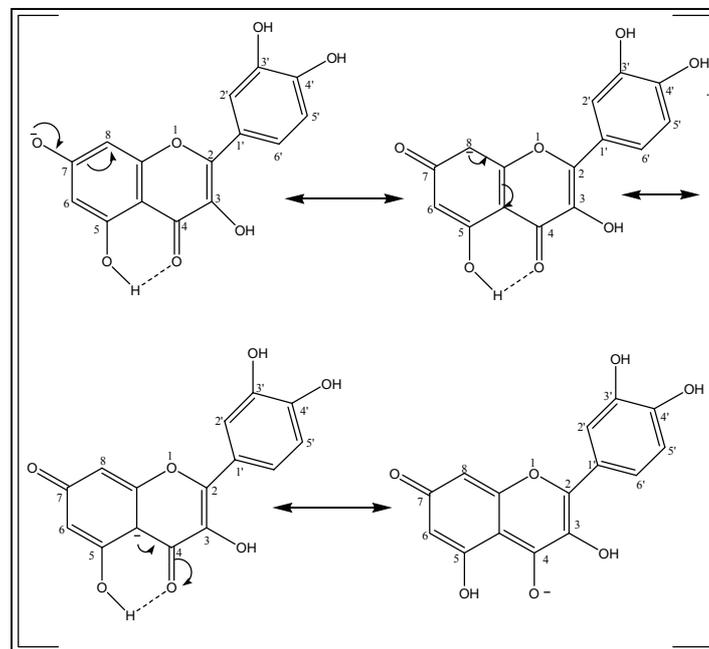
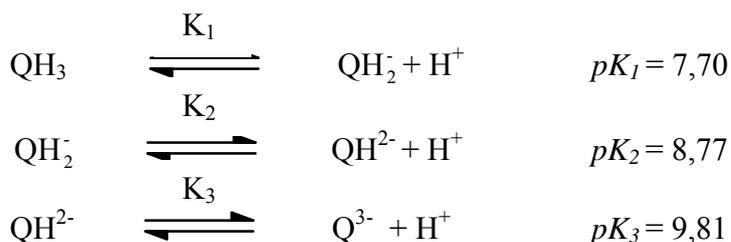


Figure 25 : Acidité du proton de l'hydroxyle en position 7

I.2. Explication théorique des différentes formes ioniques de la quercétine

La quercétine (Q), ayant trois acidités, peut exister sous trois formes ioniques dans des proportions dépendantes du pH du milieu. Ces trois formes ioniques sont : QH_2^- , QH^{2-} , Q^{3-} , et en présence de soude donnent respectivement QH_2Na ; QHNa_2 ; QNa_3 .

Les équilibres de dissociation acide de la quercétine s'écrivent :



Avec :

$$K_1 = \frac{[\text{QH}_2^-][\text{H}^+]}{[\text{QH}_3]} \quad (1) \quad K_2 = \frac{[\text{QH}^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{QH}_2^-]} \quad (2) \quad K_3 = \frac{[\text{Q}^{3-}][\text{H}^+]}{[\text{QH}^{2-}]} \quad (3)$$

On a :

$$[\text{QH}_3]_t = [\text{QH}_3] + [\text{QH}_2^-] + [\text{QH}^{2-}] + [\text{Q}^{3-}] = [\text{QH}_3] \left(1 + \frac{[\text{QH}_2^-]}{[\text{QH}_3]} + \frac{[\text{QH}^{2-}]}{[\text{QH}_3]} + \frac{[\text{Q}^{3-}]}{[\text{QH}_3]} \right)$$

D'où :

$$[\text{QH}_3] = \frac{[\text{QH}_3]_t}{1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1 K_2}{[\text{H}^+]^2} + \frac{K_1 K_2 K_3}{[\text{H}^+]^3}}$$

$$[\text{QH}_2^-] = \frac{[\text{QH}_3] K_1}{[\text{H}^+]} \text{ d'après (1), } [\text{QH}^{2-}] = \frac{[\text{QH}_2^-] K_2}{[\text{H}^+]} \text{ d'après (2) et } [\text{Q}^{3-}] = \frac{[\text{QH}^{2-}] K_3}{[\text{H}^+]}$$

D'après l'équation (3).

Avec : $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ et $[\text{QH}_3]_t$ = concentration totale de quercétine.

Nous pouvons ainsi calculer les différentes proportions des trois formes sodiques de la quercétine, pour une quantité de quercétine connue et pour un pH donné.

II. Mise en évidence de 3 formes anioniques de quercétine dans la solution préparée à pH 10

II.1. Vérification pratique de nombre de déprotonation par pH-métrie

Pour vérifier que la quercétine possède 3 protons acides, nous avons réalisé un titrage acido-basique à l'aide d'un pH-mètre (micro-computer pH-vision modèle 6072N model de LTD Electronics) en partant de la quercétine dans une solution alcaline 0,1 M et en ajoutant HCl 0,1M progressivement (annexe 17). Les 3 points d'équivalence peuvent être déterminés à partir de la courbe $(d(\text{pH})/dV) = f(V_{\text{HCl}})$; 3 maximums qui correspondent aux 3 points d'inflexion sont observés (annexe 18).

II.2. Analyse de la solution alcaline de quercétine par CLHP

Les analyses sont effectuées sur un appareil de type Beckman, utilisant une colonne en phase inverse présentant les caractéristiques suivantes : LiChrospher C18 (250 x 4 mm, 5 μ m) Merck, France et une pré-colonne C18 (10 x 4 mm) Merck, France.

Les conditions chromatographiques sont :

Phase mobile : acétonitrile /eau acidifiée à pH 2,3 (35/65, v/v)

Débit : 1,3 mL/min

Détection UV/VIS à 370 nm

La quercétine en solution méthanolique, apparaît à un temps de rétention de 5 min (annexe 5).

La solution alcaline de quercétine préparé à pH 10 est analysé par CLHP en utilisant deux phases mobiles différentes (acétonitrile/eau acidifiée à pH 2,3 et acetonitrile/eau à pH 7,4).

Les résultats observés sont les suivants :

- 1- dans le cas où la phase utilisée est composée de 35% acetonitrile et 65% d'eau à pH 7,4, le chromatogramme présente trois pics de temps de rétention à 2,37 min, 2,57 min et 4,44 min (annexe 19),
- 2- dans le cas où la phase utilisée est composée de 35% acetonitrile et 65% d'eau à pH 2,3, le chromatogramme du sel présente deux pics de temps de rétention de 2,57 min et de temps de rétention de 5,07 min (annexe 20).

Les constituants de la solution préparée à pH 10 mis en présence d'une solution tampon phosphate à pH 7,4 et conservé durant 2 heures à l'abri de la lumière sont analysés par chromatographie liquide dans les mêmes conditions chromatographiques en utilisant la même phase mobile que celle utilisée en 1 (annexe 21). Nous observons une modification des intensités relatives des trois pics chromatographiques avec apparition de nouveaux pics. Nous pouvons conclure que le contact des phosphates de sodium du tampon avec les anions de quercétine est probable.

A ce stade, il est difficile d'attribuer une forme anionique de quercétine à chaque pic caractérisé chromatographiquement. Il a donc été nécessaire de préparer et isoler les différents anions sous forme de sels sodiques de la quercétine afin de mieux préciser les résultats obtenus jusqu'à présent.

III. Préparation et propriétés physicochimiques des 3 sels de quercétine.

III.1. Préparation des sels de quercétine à partir des pKa donnée par *Kadykova*

Le principe de préparation des trois formes de sel de quercétine (mono, di et trisodique), est présenté dans la figure 26 ci-dessous :

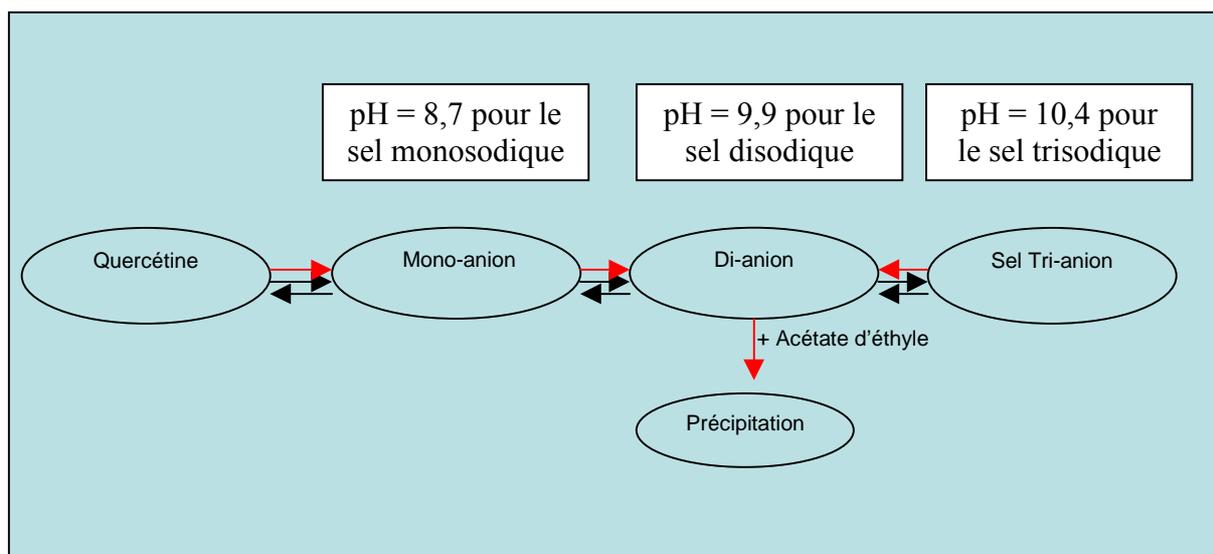


Figure 26 : Déplacement de l'équilibre dû à la précipitation du sel disodique

a. Préparation du sel monosodique de quercétine

Dissoudre 100 mg de quercétine dans 20 mL de méthanol ; ajouter progressivement une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M, jusqu'à obtention d'un pH de 8,7 (pH = 8,4 étant le pH correspondant à la formation maximale du mono-anion de quercétine en milieu aqueux). Après addition progressive d'acétate d'éthyle, le sel monosodique de quercétine précipite. Ce précipité est isolé par filtration sous vide (vide de 16 mm de mercure). Le rendement du précipité obtenu est 96,28 %.

b. Préparation du sel disodique de quercétine

Dissoudre 100 mg de quercétine dans 20 mL de méthanol ; ajouter progressivement une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M, jusqu'à obtention d'un pH de 9,9 (pH = 9,6 étant le pH correspondant à la formation maximale du di-anion de quercétine en milieu aqueux). Après addition progressive d'acétate d'éthyle, le sel disodique de quercétine précipite. Ce précipité est isolé par filtration sous vide (vide de 16 mm de mercure). Le rendement du précipité obtenu est 93,67 %.

c. Préparation du sel trisodique de quercétine

Dissoudre 100 mg de quercétine dans 20 mL de méthanol ; ajouter progressivement une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium 0,1 M, jusqu'à obtention d'un pH de 10,4 (pH = 10 étant le pH correspondant à la formation maximale du tri-anion de quercétine en milieu aqueux). Après addition progressive d'acétate d'éthyle le sel trisodique de quercétine précipite. Ce précipité est isolé par filtration sous vide (vide de 16 mm de mercure). Le rendement du précipité obtenu est 98,13 %.

Remarque : les quantités mises en œuvre peuvent être plus importantes ; cependant les rendements diminuent légèrement.

III.2. Propriétés physicochimiques des différents produits précipités (sels sodiques de quercétine)

a. Sel monosodique de quercétine

- Poudre brun verdâtre, soluble dans l'eau, insoluble dans l'acétate d'éthyle.
- Spectre d'absorption dans l'ultraviolet-visible avec deux maximums d'absorption à 371 nm et 256 nm (voir discussion)
- Chromatographie liquide (CL): temps de rétention de 4,4 min (pH 7,4).
- Spectre H^1 RMN : Δ 6,03 (s, 1H, H_6) ; Δ 6,19 (s, 1H, H_8) ; Δ 6,83 (d, $J = 6$, 1H, H_5) ; Δ 7,61 (d, $J = 6$, 1H, H_6') ; Δ 7,69 (s, 1H, H_2).
- Spectre de masse : $m/z = 301$ (voir discussion)
- Concentration en ion sodium ; Valeur obtenue: 2,1 mg/L, valeur théorique : 2,1 mg/L
- Essai de pureté : transformation du sel en quercétine et quantification par chromatographie liquide ; 95,7% en produit sec (voir discussion)

Conclusions : Ce produit obtenu semble avoir les mêmes propriétés que la quercétine elle-même en solution dans nos conditions d'analyse, et donc n'est pas une entité différente de la quercétine en solution sachant qu'une mole de ce produit précipite avec une mole de Na^+ .

b. Sel disodique de quercétine

- Poudre jaune, soluble dans l'eau, insoluble dans l'acétate d'éthyle.
- Spectre d'absorption dans l'ultraviolet-visible avec deux maximums d'absorption à 353 nm et 252nm (voir discussion)
- Chromatographie liquide (CL): temps de rétention de 2,6 min (pH 7,4).
- Spectre H^1 RMN: Δ 5,83 (s, 1H, H_6) ; Δ 6,02 (s, 1H, H_8) ; Δ 6,85 (d, $J = 6$, 1H, H_5) ; Δ 7,60 (d, $J = 6$, 1H, H_6') ; Δ 7,70 (s, 1H, H_2).
- Spectre de masse : $m/z = 150$ (voir discussion).
- Concentration en ion sodium ; Valeur obtenue : 2,2 mg/L, valeur théorique : 2,2 mg/L
- Essai de pureté : transformation du sel en quercétine et quantification par chromatographie liquide ; 97,7% en produit sec (voir discussion).

Conclusions : Ce produit obtenu ayant des propriétés différentes que la quercétine elle-même, pourrait être une entité différente de la quercétine même en solution (La formule brute peut être définie mais sa structure n'est pas claire).

- #### c. Le troisième produit obtenu est contaminé de plus que 50 % de produits de dégradation les analyses réalisées ne nous permettent pas de conclure ni sur la formule brute ni sur la structure. Malgré plusieurs variantes de préparation, il

n'a pas été possible d'obtenir le sel trisodique à l'état pur, la précipitation n'étant pas maîtrisée.

III.3. Analyse par spectrophotométrie d'émission de Na des sels de quercétine isolés

Les deux produits isolés, subissent un traitement préalable afin d'être analysées par spectrophotométrie d'émission de sodium dans le but de confirmer la présence des formes mono, disodique.

29 mg du précipité sec, considéré comme le sel monosodique de quercétine, sont solubilisés dans 1L d'eau acidifiée avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH de 2,5 dans le but de précipiter la quercétine tout en relarguant le sodium dans la solution. Cette solution, après filtration sur un filtre de 0,45 μm , qui ne doit plus contenir que 2,08 mg de Na, est analysée par spectrophotométrie d'émission de Na. Le produit considéré comme le sel disodique est traité de la même façon (annexes 22 à 24).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 9:

Tableau 9 : Caractérisation des deux formes de sels de quercétine.

Substance	[Substance] (mg/L)	[Na] calculée (mg/L)	[Na] mesurée (mg/L)
Quercétine	–	–	–
Sel monosodique	29,40 \pm 0,20	2,08 \pm 0,01	2,07 \pm 0,02
Sel disodique	16,03 \pm 0,10	2,15 \pm 0,01	2,16 \pm 0,01

Les valeurs du tableau représentent les moyennes \pm écart type de trois expériences différentes

La concentration de sodium calculée pour chacune des formes est confirmée par l'analyse effectuée. 1mole de Na^+ /mole de quercétine pour le monosodique, 2 moles de Na^+ /mole de quercétine pour le disodique.

III.4. Analyse par ^1H RMN des sels de quercétine isolés

Afin d'attribuer les pK_a s, déterminés par *Kardykova et al. 1993*, nous avons étudié l'effet de blindage dû à la déprotonation, sur le déplacement chimique des protons dans le spectre du ^1H RMN. La quercétine, son sel monosodique et son sel disodique représentent respectivement les nombres 0, 1 et 2 des fonctions sels ou de déprotonations des hydroxyles (Figure 27). Ces trois formes possèdent cinq protons positionnés exactement de la même façon sur la structure de base (figure 28). Donc, après isolement des deux formes de sels de quercétine, les précipités sont dissous dans le méthanol- d_6 pour les analyser avec un spectromètre de type BRUKER avec une fréquence de 200 MHz. De même, la quercétine est analysée.

A partir des spectres obtenus (annexes 25 à 27), nous avons regroupé les déplacements chimiques des cinq protons dans la figure 27 suivante afin d'expliquer le rang des sites de déprotonation responsables des effets divers de blindage et par conséquent d'attribuer les pK_a s aux différents sites.

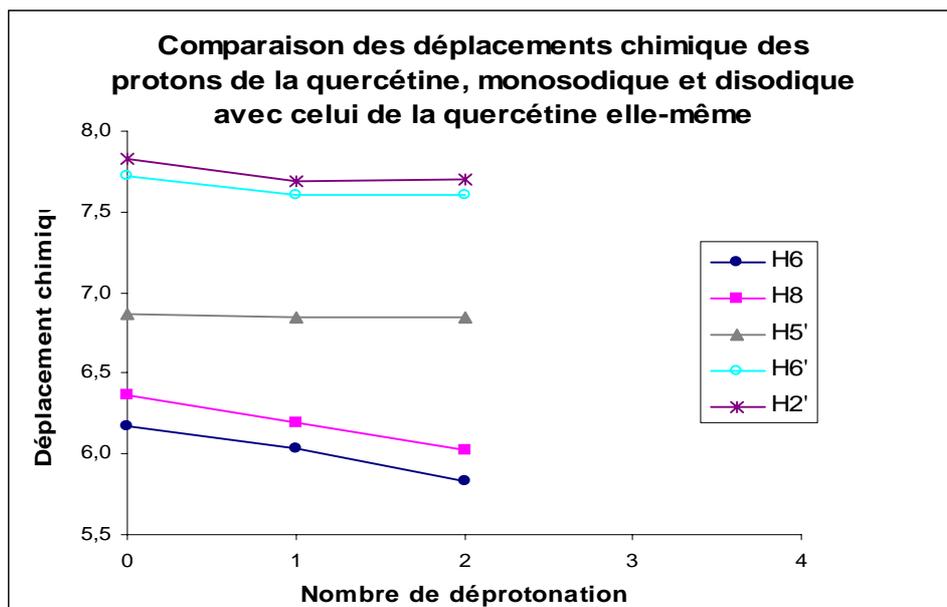


Figure 27 : Effet de la déprotonation sur les déplacements chimiques

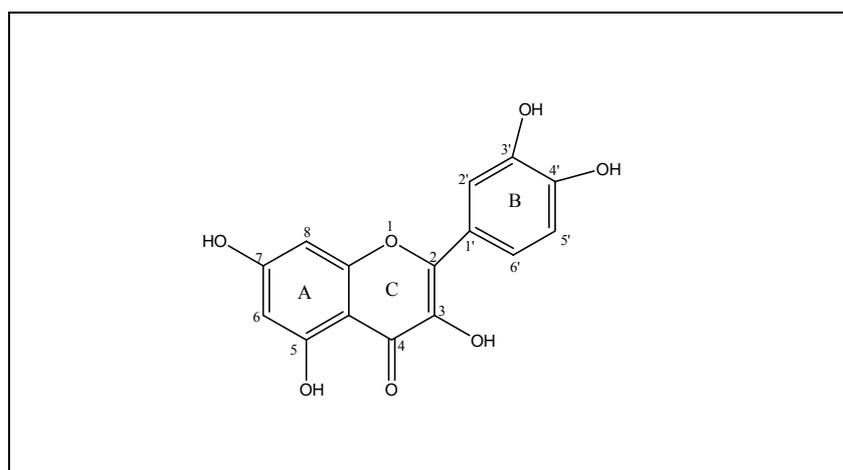


Figure 28 : Structure de la quercétine

D'après la figure 27, nous remarquons qu'il y a une diminution de déplacement chimique des protons en positions 6', 2', 8 et 6 en comparant les spectres de la quercétine (0) et celui du sel monosodique (1). Par conséquent, nous pouvons conclure qu'un effet de blindage a eu lieu sur ces positions et qu'il est dû à la première déprotonation. Or, le seul groupement hydroxyle qui peut avoir cet effet en même temps sur les deux cycles A et B est celui qui est en position 3 surtout que seuls les deux protons du cycle B proches du cycle C sont blindés et pas celui qui est en position 5'. Par conséquent, le proton du groupement OH en position 3 est le plus acide comme décrit par *Kadykova*.

En comparant les spectres des sels monosodique et disodique de la quercétine, nous constatons une diminution du déplacement chimique des protons en positions 6 et 8 alors que les trois autres gardent les mêmes valeurs de leur déplacement chimique. La deuxième déprotonation montre donc son effet dans le cycle A. De ce fait, cette déprotonation s'effectue au niveau de l'hydroxyle en position 7 ou 5. Mais, puisque ce dernier se trouve en position β d'un carbonyle, il forme un pont hydrogène ce qui rend sa libération difficile. Par conséquent,

le proton du groupement *OH* en position 7 est moins acide que celui en 3 mais plus acide que celui en 4' ce qui est en désaccord avec *Kadykova*.

L'attribution réelle des *pK_a* aux différentes positions est difficile car les valeurs sont proches. Cependant l'étude réalisée par H¹RMN nous a permis d'obtenir notre attribution. Le sel monosodique pourrait se former en position 3, le sel disodique pourrait se former en positions 3 et 7. Ces résultats sont en désaccord avec *kadykova* qui utilise la luminescence et la spectroscopie et *Agrawal* qui utilise le C¹³ NMR.

III.5. Analyse par chromatographie liquide des sels de quercétine isolés

Les trois entités de sels de quercétine ont été analysées par chromatographie liquide : identification et dosage. Les conditions opératoires sont identiques à celles décrites précédemment à l'exception de la phase mobile dont l'eau acidifiée est remplacée par de l'eau tamponnée à pH 7,4 (35% acétonitrile/65% eau à pH 7,4).

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans les annexes 25 à 27.

III.6. Analyse par C¹³RMN du sel disodique de quercétine

Le spectre obtenu montre 15 pics correspondant au 15 carbone de la molécule ayant les caractéristiques suivantes (annexe 28) :

Deux pics à 73 et 85 ppm correspondent à deux carbones tertiaires se trouvant dans le même champ énergétique le plus blindé (C₈ et C₆).

Trois pics qui se trouvent moins blindés à 96, 97 et 101 ppm correspondent à des carbones quaternaires dont nous estimons que ceux sont les carbones C₁₀, C_{1'} et C₂.

Trois pics à 115, 116 et 120 ppm correspondent aux trois carbones tertiaires du phényle. Ceux sont donc les carbones C_{2'}, C_{6'} et C_{5'}.

Le pic à 129 ppm correspond au carbone en position 3 qui subit un dé-blindage du fait de la charge de l'oxygène dont il est substitué.

Deux pics à 146 et 147 ppm correspondent aux carbones quaternaires du phényle C_{3'} et C_{4'} dé-blindés par rapport au carbones tertiaires de ce phényle du fait de leur substitution à l'hydroxyle.

Les deux pics à 164 et 165 ppm correspondent aux carbones quaternaires dont nous estimons le C₉ et C₅.

Le pic à 168 étant l'avant dernier des plus dé-blindé correspondant à un carbone quaternaire est estimé pour le carbone 7 du fait de l'ionisation de l'oxygène.

Le dernier pic correspond au C₄ le carbone du carbonyle donc le plus dé-blindé.

En conclusion les résultats en ¹HRMN sont cohérents aux résultats en C¹³RMN concernant les sites d'ionisations.

IV. Conclusion

Les sels de quercétine ont été isolés et leurs analyses ont montré qu'il s'agit d'un sel monosodique, d'un sel disodique et un troisième produit contaminé de produits de dégradation de la quercétine à plus 50% dont éventuellement des dérivés d'oxydation et de

condensation. Le sel monosodique en solution est instable et semble avoir les mêmes propriétés que la quercétine elle-même.

En plus, ces résultats nous ont permis d'avoir une idée sur les protons les plus acide de la quercétine (3 et 7). Cette conclusion est en désaccord avec celle décrite dans la littérature [kardykova et al. en 1993, Agrawal et al. en 1983] ; elle est en accord parfait avec la suggestion de Movileanu [Movileanu L. et al.; 2000].

II- SOLUTIONS DE QUERCETINE PREDISSOUTES A DIFFERENTS PH

I. Détermination de l'impact de la préparation à différents pH sur la capture du radical OH^\bullet

Les résultats de capture des anions superoxydes obtenus pour la quercétine dissoute à pH 7,4 et pré-dissoute à pH 10 puis étudiée à pH 7,4 sont identiques comme cela a déjà été démontré. En fait, la méthode de dissolution n'a pas d'influence sur la capture des radicaux superoxydes. Par contre les résultats concernant la capture des radicaux hydroxyles présentes une variation.

Des solutions alcalines de quercétine sont formées en ajoutant à une suspension de quercétine, différentes quantités d'une solution de NaOH 0,1M. En fonction de la quantité de soude

ajoutée, on obtient des solutions alcalines de quercétine à des pH allant de 8 à 10,3. Les différentes solutions de quercétine ainsi préparées sont diluées dans le milieu réactionnel à pH 7,4 afin d'obtenir la même concentration et d'étudier la capture des radicaux hydroxyles comme cela est illustré dans la figure 29 ci-après :

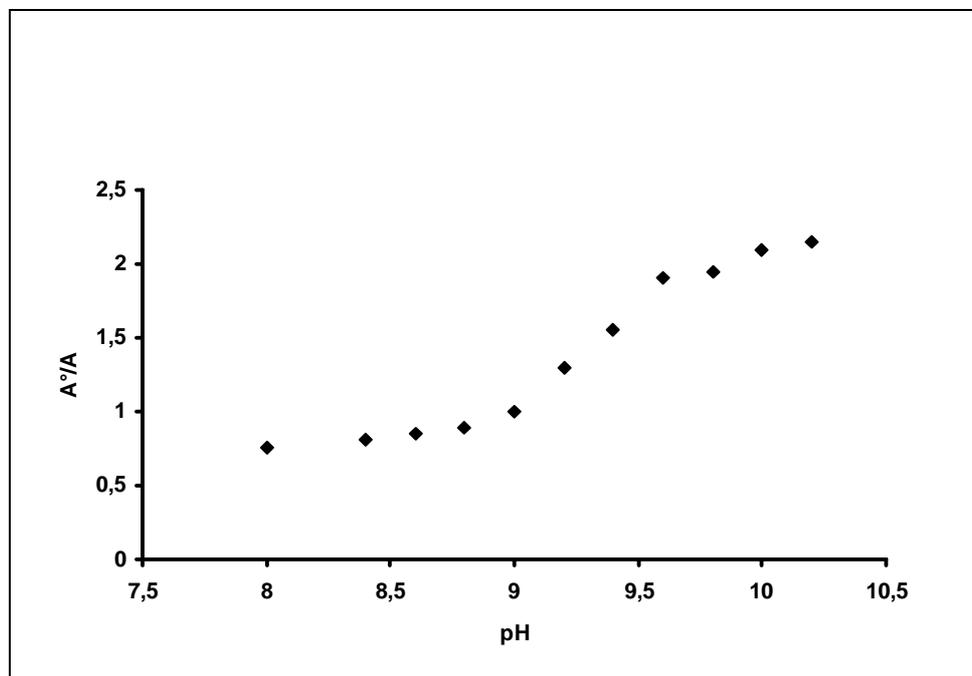


Figure 29 : A°/A en fonction du pH de pré-dissolution de la quercétine

Nous constatons qu'en augmentant le pH, nous favorisons la formation des anions de quercétine et le rapport A°/A augmente. En conséquence, plus le pH augmente plus la quercétine se solubilise et plus la capacité de capture des radicaux OH^\bullet augmente. Dans le cas où nous tenons compte des pKa d'Escndar et Sala nous favorisons la dissolution rapide de la forme di-anionique de quercétine persistant à pH 7,4.

La dissolution de la quercétine ou la forme di-anionique présente à pH 7,4 pourrait être à l'origine de cette variation.

II. Capture du radical OH^\bullet par le sel disodique isolé.

Le sel disodique de quercétine isolé par précipitation est dissout dans l'eau (la stabilité de ce sel pendant le temps de la réaction est vérifiée). Une gamme de concentrations entre 0,05 mM et 0,5 mM de cette solution est préparée pour étudier la capacité de capture du radical hydroxyle. La constante moyenne de capture pour les trois expériences successives est égale à $1,40 \pm 0,08 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (annexe 29). Donc cette capacité est supérieure à celle de la quercétine pré-dissoute à pH 10 et étudiée à pH 7,4 en solution. Ce composé obtenu après isolement, présentant une activité de capture du radical hydroxyle importante et dont sa formule brute est le $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_7\text{Na}_2$ alors que sa structure pourrait être originale (kryptand ou autres complexes de sel de quercétine disodique). La stabilité de ce produit à plus que deux heures dans le tampon à pH 7,4 et à une température de 37°C est montrée par une étude de la cinétique de dégradation du sel disodique dans ces conditions suivie par la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet visible (Fig 29a).

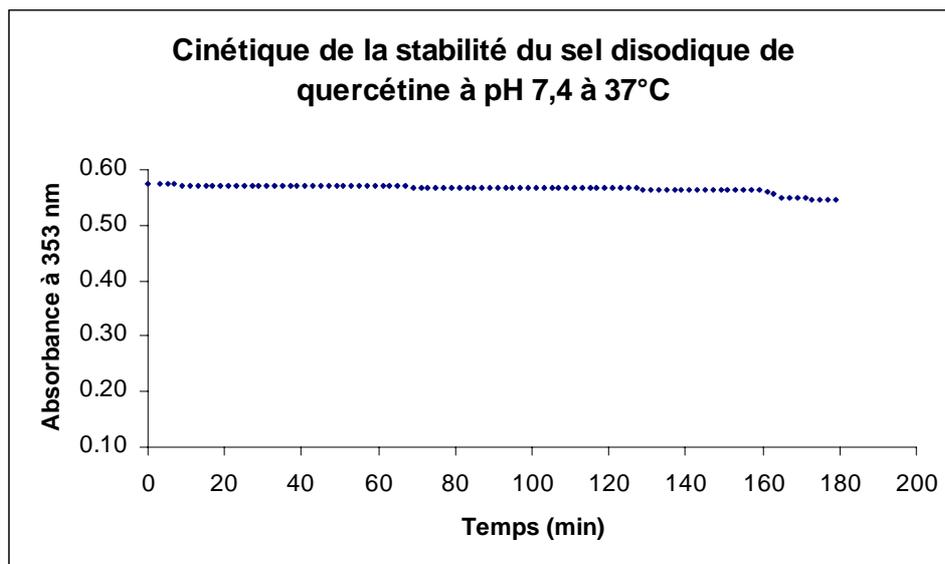
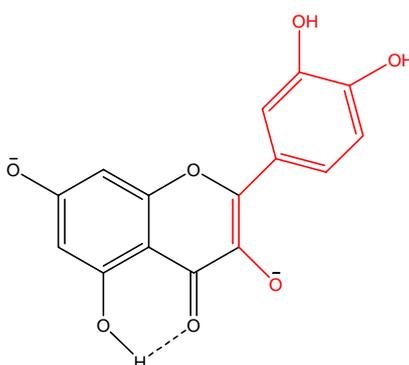


Figure 29a : Stabilité du sel disodique de quercétine à pH 7,4 et à 37°C pendant 3 heures

III. Détermination de la structure responsable de cette activité.

D'après les résultats obtenus, la structure responsable de la capacité de capture des radicaux hydroxyles de la quercétine disodique (structure estimée) peut être la partie présentée en rouge dans la molécule suivante :



Une structure (A) responsable de l'activité de capture pourrait être schématisée dans la figure 30 ci-après :

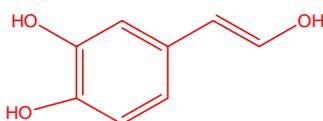
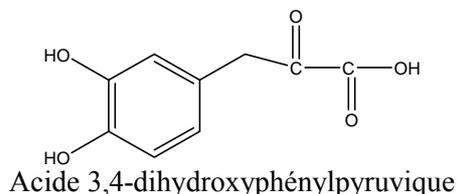


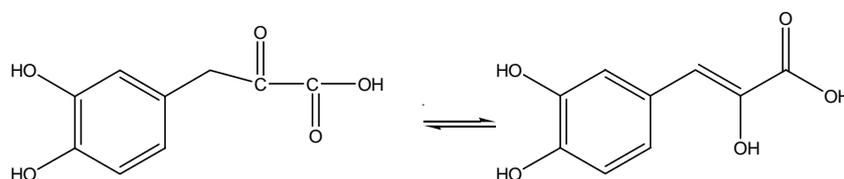
Figure 30 : structure responsable de la capture des radicaux hydroxyles (structure A)

Pour confirmer l'hypothèse de la responsabilité de cette structure vis-à-vis de la capture, nous allons la synthétiser et en déterminer la constante de capture, puis la comparer avec la constante k_s du sel disodique de quercétine isolé.

La synthèse d'un produit ayant approximativement la même structure ; l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique [Wilson. et Coscia ; 1979], est envisagée :



L'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique peut exister en équilibre céto-énolique.

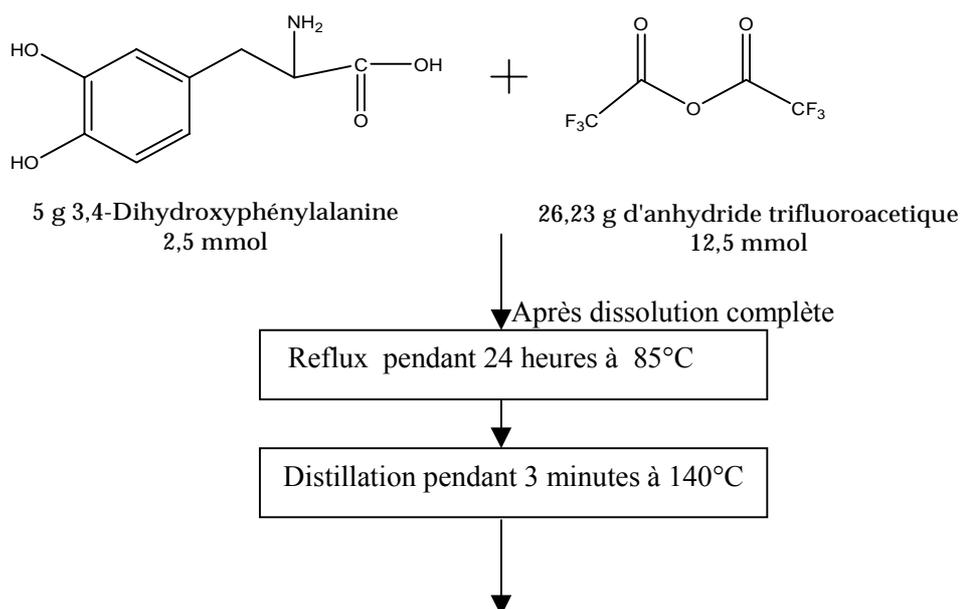


La forme énolique favorisée dans le milieu aqueux ressemble à la structure A (Figure 30).

Par la suite cette molécule est testée dans le but de montrer son potentiel antioxydant et de le comparer avec celui du sel disodique de la quercétine pour confirmer la structure responsable de la capture des radicaux OH^\bullet .

III.1. Synthèse de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique [Wilson. et Coscia ; 1979]

La synthèse de cette molécule est schématisée dans la figure 31.



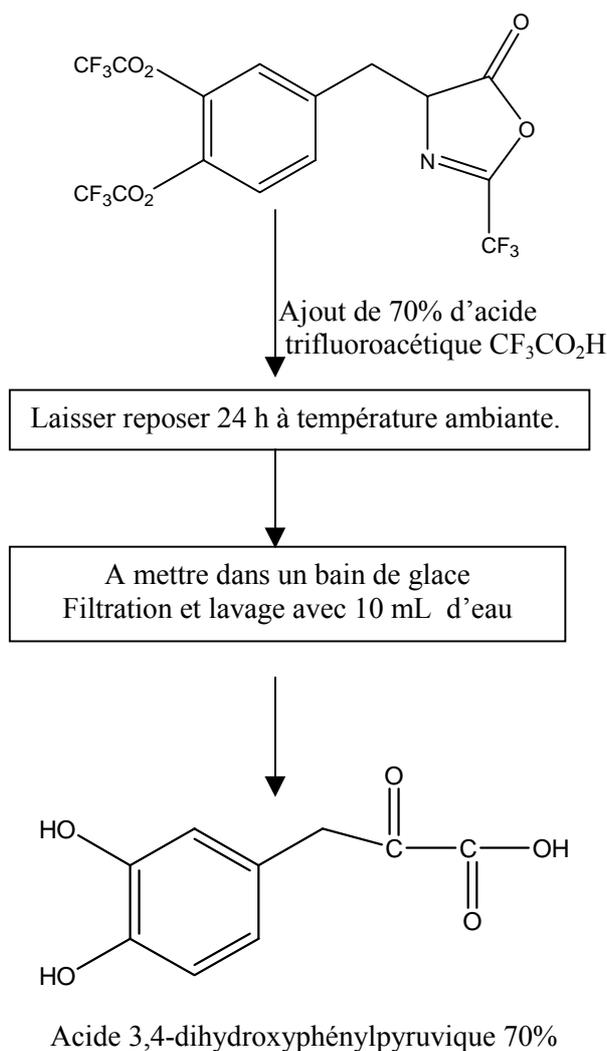


Figure 31 : synthèse de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique

III.2. Identification de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique

III.2.a Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

Mode opératoire :

1 mg de la substance à examiner est mélangé avec 300 mg de bromure de potassium finement pulvérisé et desséché. Ces quantités suffisent généralement pour préparer une pastille d'un diamètre de 13 mm et obtenir un spectre d'intensité satisfaisante. Le mélange est soigneusement broyé, étendu uniformément dans une matrice spéciale et est soumis à une haute pression.

Résultats et discussion :

Sur le spectre IR obtenu et donné en annexe 32, on observe plusieurs bandes :
A 1695 cm^{-1} une bande qui peut correspondre à l'acide carboxylique conjugué avec une double liaison, apparaît. Selon les tables théoriques, un acide carboxylique conjugué avec une double liaison a une bande caractéristique entre $1710\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$.

A 1650 cm^{-1} , une bande qui peut être la bande caractéristique d'une double liaison est observée. Selon les tables théoriques, une double liaison possède une bande à 1670-

1640 cm^{-1} . Normalement son intensité est très petite sauf si elle est conjuguée avec un carbonyle.

Les bandes à **1517 et 1445 cm^{-1}** sont caractéristiques du groupement phényle. Les groupements OH sont confondus. On ne peut pas les voir clairement en IR. Toutefois en RMN du proton on va pouvoir les identifier.

On n'observe pas de bande caractéristique du carbonyle cétonique à 1710-1730 cm^{-1} . On peut en conclure que le produit synthétisé est en équilibre entre la forme cétonique et la forme énolique.

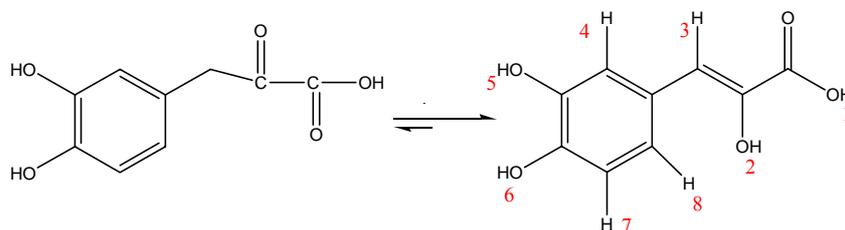
Pour avoir plus de renseignements, des spectres $^1\text{HRMN}$ et UV/VIS sont réalisés.

III.2.b Spectroscopie UV / VIS

Le spectre d'absorption de l'acide est fait dans le méthanol (annexe 33). On obtient deux maximums à $\lambda=294$ nm et à $\lambda=307$ nm avec la présence d'un épaulement. Ces deux maximums correspondent à la présence des deux formes carbonyle et énol. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la littérature [Wilson, et Coscia ; 1979].

III.2.c Spectroscopie de résonance magnétique protonique ($^1\text{HRMN}$)

Deux spectres de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique ont été réalisés, le premier dans le DMSO et le second dans un mélange DMSO/D₂O (annexes 30, 31).



$^1\text{HRMN}$ (DMSO) δ 6,23 (s, 2H, H₃); 6,67(d, J=8 Hz, 1H, H₇); 6,91 (d, J=8 Hz, 1H, H₈) 7,33(s, 1H, H₄); 12,87 (s, 1H, H₁).

Les pics à 8,75, 8,92 et 9,02 ppm correspondent aux 3 groupements OH de la molécule.

$^1\text{HRMN}$ (DMSO/D₂O) δ 5,93 (s, 1H, H₃); 6,62 (d, J=8Hz, 1H, H₇); 6,84 (d, J=8Hz, 1H, H₈) 7,12 (s, 1H, H₄), (forme énolique).

La différence entre les déplacements chimiques du proton 3 ainsi que les intégrations, permettent d'estimer la présence de deux formes.

En effet, il s'agit d'un équilibre tautomère céto-énolique. Généralement, ce type d'équilibre est très en faveur de la forme carbonyle, mais, dans cette structure la forme énolique est plus favorisée.

III.3. Etude de la capture du radical OH°

Dans le but de déterminer la structure responsable de cette capacité de capture du radical OH° du sel disodique de quercétine, la réaction de Fenton est mise en œuvre en utilisant le

dihydroxyphénylpyruvate de sodium synthétisé préalablement. Une étude similaire est réalisée pour le sel sodique de dihydroxyphénylpyruvate.

Les constantes de capture du radical OH^\bullet sont modérées et sont de l'ordre de $6,49 \pm 0,32$ ($\times 10^9$) $M^{-1}.Sec^{-1}$.

IV. Conclusion

Le sel disodique de quercétine a été isolé et a présenté une forte activité de capture du radical hydroxyle supérieure à celle de la quercétine en solution pré-dissoute à pH 10. La structure (Figure 30), qui est une partie du sel disodique de quercétine, n'est pas la seule responsable de cette activité. Ainsi notre intérêt s'est porté sur une étude de la capacité de capture des radicaux OH^\bullet par une série de 18 dérivés phénoliques, dans le but de trouver une relation entre les propriétés physicochimiques d'une molécule et la capacité à capter le radical OH^\bullet .

Les paramètres pris en compte sont :

- le pK_a du groupement OH phénolique,
- la position d'un deuxième groupement OH phénolique par rapport au premier,
- la fonction acide carboxylique,
- la formation d'une forme ionisée.

III- PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES LIES À L'ACTIVITE DE CAPTURE DU RADICAL OH^\bullet

I. Détermination des constantes d'acidité des molécules

De nombreuses méthodes physicochimiques peuvent être utilisées pour la détermination des constantes d'acidité des molécules [Albert et Serjeant ; 1984]. Les plus largement utilisées sont sans conteste les méthodes potentiométriques et spectrophotométriques [Aiache et al. ; 1982].

La réalisation de titrages acido-basiques suivis par potentiométrie à l'aide d'une électrode sélective des ions H^+ couplée à une électrode de référence, est la méthode de choix car la plus aisée et la plus rapide. Elle donne de bons résultats pour des valeurs de pK_a comprises entre 2 et 12 et peut être adaptée, dans certaines conditions, à la détermination des constantes d'acidité de composés peu solubles [Levy et Rowland ; 1971].

Dans les cas où la méthode potentiométrique ne peut être utilisée, la spectrophotométrie d'absorption U.V.-visible, bien que plus longue à mettre en oeuvre, est alors employée. Elle est basée sur l'existence de spectres d'absorption différents pour les formes moléculaire et ionisée du composé. Il est alors possible de déterminer la proportion de chacune des formes à différentes valeurs de pH réalisées par des solutions tampons [Hanocq et Vandamme ; 1982]. La précision obtenue est de $\pm 0,06$ unités de pK_a .

En plus de ces deux techniques de base, il existe d'autres méthodes, chacune ayant une utilisation limitée. C'est ainsi que la conductimétrie mesurant les variations de conductivité

ionique au cours de titrages acido-basiques est utilisée essentiellement pour des molécules ayant des valeurs de pK_a comprise entre 2 et 5. Cette méthode est très sensible aux variations de température et mal adaptée dans le cas de composés possédant plusieurs fonctions acides ou basiques [Aiache et al. ; 1982].

Les méthodes spectrométriques spécialisées telles que l'absorption infrarouge [Hanocq et Vandamme ; 1983] ou la résonance magnétique nucléaire [Kimberly et Goldstein ; 1981] ont également fait l'objet d'applications dans ce domaine, ainsi que des méthodes thermométriques [Bartgel ; 1976].

I.1. Généralités

I.1.a Méthodes potentiométriques

Les méthodes potentiométriques consistent à suivre les variations de pH lors de la réalisation de titrages acido—basiques. Les résultats expérimentaux obtenus sont généralement représentés graphiquement sous forme d'une courbe des valeurs de pH en fonction des volumes de réactifs titrant ajoutés ou du rapport de neutralisation $n_{\text{Base}}/n_{\text{Diacide}}$ (r_1).

Dans le cas du dosage d'une espèce monofonctionnelle (monoacide), cette courbe possède une allure bi-logarithmique (Figure 32). Les résultats les plus fiables sont ceux obtenus entre 20 et 80 % de neutralisation ou 2 et 8 mL de base, zone de valeurs de pH parfaitement définies.

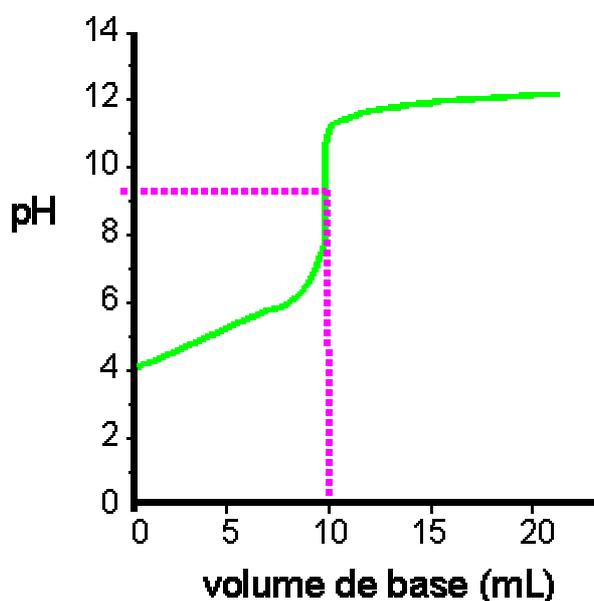


Figure 32 : Courbe de neutralisation (cas d'un acide faible)

Dans le cas d'espèces polyfonctionnelles (diacides), c'est l'écart entre les deux valeurs de pK_a qui conditionne l'allure des courbes de titrage. Si les deux pK_a sont suffisamment différents ($\Delta pK_a > 4$), les deux fonctions sont titrées successivement et indépendamment l'une de l'autre. Dans le cas contraire, on ne distingue pas nettement les deux étapes de neutralisation. La figure 33 présente ces différents cas de courbes de neutralisation correspondant à quatre produits diacide ayant la même constante $pK_2=8$ du proton le plus acide alors que leur constante d'acidité pK_1 du proton le moins acide est différente d'un produit à l'autre et est compris entre 10 et 12 ($pK_1=12$; $pK_1=11,5$; $pK_1=11$; $pK_1=10,2$).

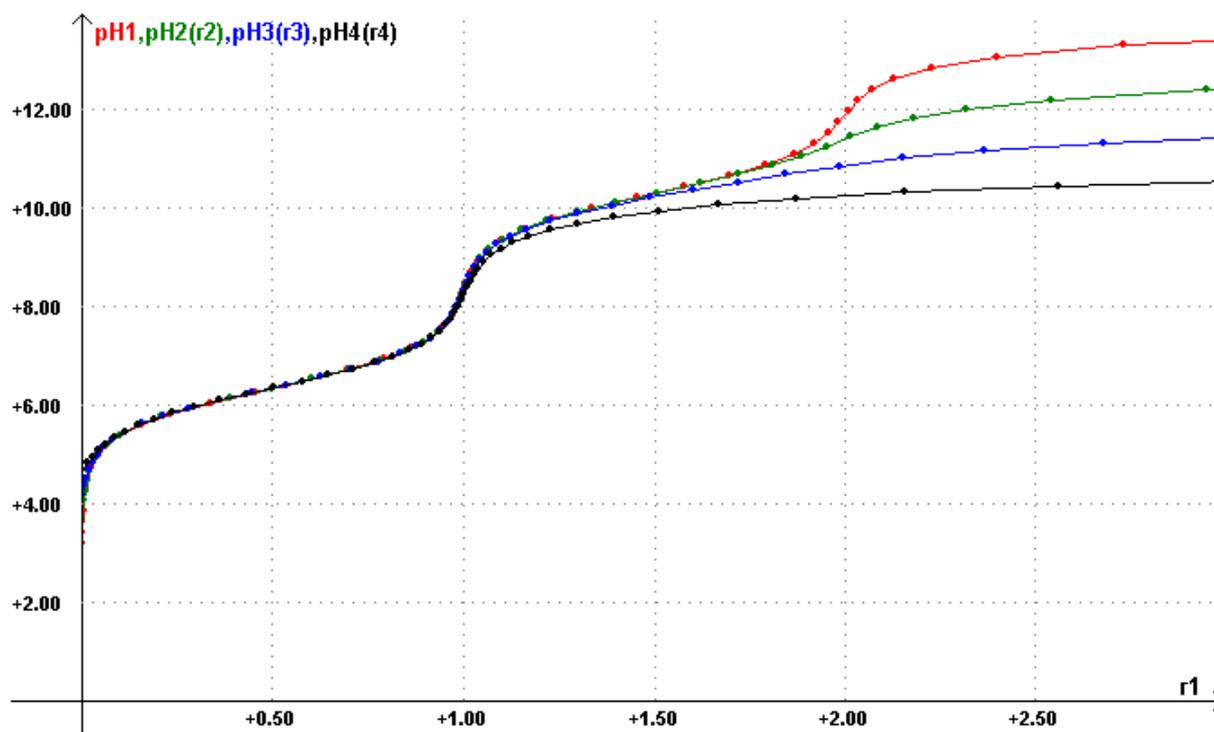


Figure 33 : Courbe de neutralisation d'un diacide faible par une base forte $pH = f(r_1)$
L'abscisse r_1 du graphe ci-dessus correspond au rapport des quantités de matière [BONIN Michel, 2000]

I.2. Matériels et méthodes

I.2.a Détermination des constantes d'acidité des composés solubles en milieux aqueux

Dans le cas d'un monoacide, la constante d'acidité pK_a est égale au pH correspondant au point d'inflexion de la courbe de titrage pH en fonction du volume de base ajouté et ce point correspond exactement à l'équivalence des espèces ioniques.

Dans le cas d'un diacide dont la différence des pK_{as} est ≥ 4 , les résultats concernant la neutralisation de la première fonction sont traités comme précédemment. Cependant, concernant la neutralisation de la deuxième fonction, ces calculs ne sont plus applicables, car la force ionique est différente. En effet, des espèces apparaissent possédant une charge double et résultant des équilibres caractérisés par des nouvelles équations de constante, mais nous pouvons toujours distinguer deux points d'inflexion correspondant à deux points d'équivalence bien espacés.

Lorsque les valeurs de pK_a obtenues par les calculs présentent une mauvaise précision, il est probable que la neutralisation de la première fonction est mal définie et que la neutralisation de la seconde débute avant la fin de la première. Ce fait se produit lorsque ΔpK_a est inférieur à 4. Dans ces conditions, des équations particulières sont nécessaires, telles que celles proposées par *Speakman (1940)* et reprises par *Albert et Serjeant (1984)*.

I.2.b Appareillage

L'appareil de base est un pH-mètre de type METROHM 716 DMS qui mesure le potentiel généré par les protons en solution. Il possède un thermomètre, une électrode de pH combinée qui remplace les deux électrodes suivantes : l'une au calomel saturé est l'électrode de référence ; l'autre généralement en verre est l'électrode de mesure. La relation liant le potentiel de l'électrode de verre au pH de la solution est de la forme

$$-\log[H^+] = pH = \frac{E_{cell} - E_{cal}}{0,0592} \quad \text{à } 25^\circ\text{C}$$

Le potentiel à travers la membrane de verre varie linéairement avec le pH de la solution. Dans les zones de pH élevé ($pH > 12$), la membrane devient perméable aux ions alcalins (en particulier aux ions Na^+) et le potentiel enregistré est affecté. A partir de valeurs comprises entre pH 12 et 14 toutes les électrodes en verre sont imprécises et on préfère l'emploi de l'électrode à hydrogène.

Il faut calibrer l'appareil avec une solution tampon de phtalate acide de potassium (étalon primaire) et une autre solution tampon de pH différent. Le pH d'une troisième solution tampon de pH intermédiaire affiché par l'appareil ne doit pas différer de plus de 0,05 unités de pH de la valeur correspondant à cette solution.

I.2.c Mode opératoire

Les substances à titrer sont mises en solution dans des béchers de 50 à 100 mL maintenus à température constante grâce à un bain thermostaté. Pour un meilleur contrôle des températures, ces béchers sont fermés par un couvercle percé de cinq trous permettant le passage de l'électrode, du thermomètre, de la burette automatique et de l'arrivée d'azote servant à éliminer les gaz dissous.

Le réactif titrant est additionné à l'aide d'une burette automatique dont la vitesse d'écoulement est adaptée automatiquement en fonction de l'approche aux points d'équivalence. L'agitation est maintenue grâce à un léger courant d'azote sous la surface de la solution, plutôt que par agitation magnétique, pour éliminer le CO_2 qui peut être présent en solution.

Le pH, le potentiel et le volume du réactif titrant sont affichés et enregistrés automatiquement pour chaque point équivalent détecté jusqu'à l'équilibre total. A la fin du titrage, l'électrode est lavée et à nouveau calibrée à l'aide des solutions tampon. Si les pH ont varié de $\pm 0,02$ unités, les résultats obtenus lors du titrage doivent être éliminés.

I.2.d Préparation des solutions

Si la solubilité de la substance le permet, une solution 0,01 M est utilisée car à cette concentration, les corrections d'activité peuvent être négligées.

Les substances à titrer sont mises en solution dans de l'eau distillée bouillie puis refroidie pour éliminer O_2 et CO_2 . La dissolution se fait par agitation magnétique. Si elle nécessite un chauffage, la solution devra être refroidie avant d'immerger les électrodes. Les électrodes ne sont plongées que lorsque toute la substance est dissoute. Les solutions titrantes alcalines doivent aussi être exemptes de CO_2 . C'est le cas généralement des solutions analytiques vendues dans le commerce.

I.2.e Causes d'erreurs et d'imprécision

Une meilleure précision dans cette étude de détermination des constantes d'acidité nécessite une expérimentation délicate dépourvue des erreurs suivantes :

- a) La présence d'impuretés dans la substance à titrer
- b) L'inexactitude des volumes de réactif titrant ajoutés
- c) Une mauvaise dissolution de la substance à titrer
- d) Pour les substances dont le pK_a est supérieur à 11, d'autres sources d'erreurs viennent s'ajouter aux précédentes :
 - la calibration de l'électrode par un tampon de pH trop éloigné de ceux rencontrés au cours du titrage
 - la porosité croissante de la membrane de verre aux ions alcalins
 - la présence de CO_2 en solution

I.2.f Détermination des constantes d'acidité des composés peu solubles en milieu aqueux

Lorsqu'une substance est peu soluble dans l'eau, sa constante d'ionisation peut être déterminée dans un milieu hydro-organique. Dans ce but, les mélanges eau-alcool (méthanol, éthanol) sont les plus utilisés [Benet et Goyan ; 1967].

Généralement, les valeurs de pK_a sont déterminées dans des mélanges eau-alcool en proportions variables ($pK_{a_{\text{solv}}}$) et extrapolées à la teneur nulle en solvant alcoolique ($pK_{a_{\text{eau}}}$). Cependant, les alcools diminuent la force des acides et des bases du fait de leur caractère moins dissociant que l'eau [Rosset ; 1979].

La proportion en alcool doit être limitée à 20 % (V/V) pour que les valeurs obtenues par extrapolation soient satisfaisantes. Les différences observées entre les valeurs de $pK_{a_{\text{solv}}}$ et de $pK_{a_{\text{eau}}}$ peuvent également s'expliquer par les solvations différentes des espèces moléculaires et ionisées, les premières étant préférentiellement solvatées par les molécules d'alcool et les secondes par les molécules d'eau.

Pour ces différentes raisons, les valeurs de pK_a déterminées par cette méthodologie restent des valeurs approchées.

I.2.g Méthode de calcul et détermination des pK_a

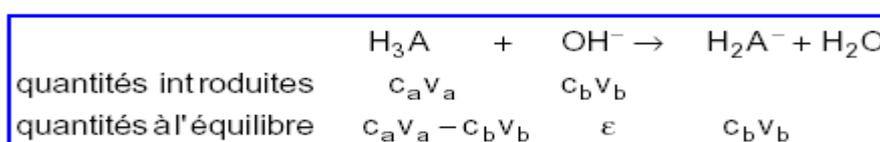
L'équivalence acido-basique est atteinte lorsque la quantité d'ions hydroxyles OH^- ajoutée est égale à la quantité totale de protons libérables par l'acide : $n_o(\text{HA}) = n(\text{OH}^-)$ c'est-à-dire lorsque $C_a \cdot V_a = C_b V_{b,\text{éq}}$.

Pour étudier la variation du pH en fonction de V_b , on utilise :

$$X = V_b / V_{b,\text{éq}} = C_b V_b / C_b V_{b,\text{éq}} = C_b V_b / C_a V_a.$$

Avec : $C_a \cdot V_a$ le nombre total de moles de protons libérables par la fonction acide en question.
 $C_b V_{b,\text{éq}}$ le nombre total de base ajoutée pour neutraliser les protons libérés par cette fonction acide c'est-à-dire le volume correspondant au point d'équivalence $V_{b,\text{éq}}$ et V_b volume de base versé.

Dans nos expériences, les molécules utilisées sont des mono-, di- et triacides. Or la détermination des pK_a s d'un triacide englobe celle du mono et du diacide.

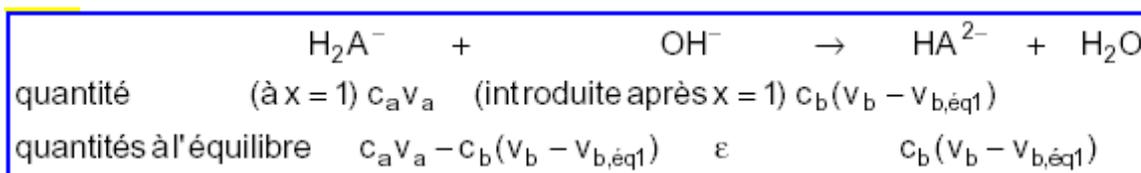


$$[\text{H}_2\text{A}^-] = \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \text{ et } [\text{H}_3\text{A}] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{a1} + \log \frac{C_b V_b}{C_a V_a - C_b V_b} = \text{p}K_{a1} + \log \frac{X}{1-X}$$

Pour la première fonction acide, nous remarquons que $\text{pH} = \text{p}K_{a1}$ pour $X = 1/2$.

Que la molécule soit sous forme monoacide, diacide ou triacide, le pK_a de la fonction la plus acide de la molécule est égale au pH correspondant au volume $V_b = 1/2(V_{b,\text{éq}})$ où $V_{b,\text{éq}}$ est déterminé automatiquement par l'appareil, correspondant au point d'équivalence E_p en question.



$$[\text{H}_2\text{A}^-] = \frac{c_a v_a - c_b (v_b - v_{b,\text{éq}1})}{v_a + v_b} = \frac{2c_a v_a - c_b v_b}{v_a + v_b}$$

$$[\text{HA}^{2-}] = \frac{c_b (v_b - v_{b,\text{éq}1})}{v_a + v_b}$$

$$\text{pH} = \text{pK}_{a2} + \log \frac{c_b v_b - c_a v_a}{2c_a v_a - c_b v_b} = \text{pK}_{a2} + \log \frac{x - 1}{2 - x}$$

Pour la deuxième fonction acide nous remarquons que $\text{pH} = \text{pK}_{a2}$ pour $X = 3/2$. Alors c'est le pH correspondant à $V_b = 3/2 (V_{b,\text{éq}})$.

Pour la troisième acidité $\text{pH} = \text{pK}_{a3}$ pour $X = 5/2$ donc pour $V_b = 5/2 (V_{b,\text{éq}})$.

Nous n'avons pas détaillé les calculs car dans nos expériences nous n'avons pas besoin de déterminer cette troisième acidité.

NB : dans le cas où les pK_a s sont différents, de façon à pouvoir bien déterminer le point d'inflexion de la courbe, nous calculons directement le pK_a , pour lequel sa valeur est égale à celle du pH correspondant au volume nécessaire pour neutraliser seulement la moitié des protons libérés par cette fonction acide.

I.3. Résultats

Les constantes d'acidité de 18 molécules étudiées sont calculées et regroupées dans le tableau 10. Quelques exemples de calcul sont montrés dans les annexes 35 à 42:

Tableau 10 : constantes d'acidité du groupement phénolique le plus acide

Dérivés phénoliques	pK_a moyenne du phénol
Phénol	$10,0 \pm 0,10$
3-hydroxybenzaldehyde	$8,87 \pm 0,13$
2-hydroxybenzaldehyde	$8,10 \pm 0,21$
4-hydroxybenzaldehyde	$7,71 \pm 0,24$
5-chlorosalicylaldehyde	$7,62 \pm 0,09$
3,5-dichloro-2-hydroxybenzaldehyde	$6,35 \pm 0,13$
2,3,5-trichlorophenol	$5,92 \pm 0,04$
2,3 dichloro-4 hydroxybenzaldehyde	$5,41 \pm 0,07$
2,3,5 trichloro 4-hydroxybenzaldehyde	$3,98 \pm 0,02$
4-hydroxybenzoic acid	$9,14 \pm 0,12$
2,5-dichloroquinone (para)	$7,84 \pm 0,05$
3,4-dihydroxybenzaldehyde	$7,50 \pm 0,31$
3,5-dichlorocatechol (ortho)	$7,49 \pm 0,15$

Catechol	9,68 ± 0,03
3,4-dihydroxybenzoic acid	8,97 ± 0,08
3,4-dihydroxyphenyl acetic acid	9,46 ± 0,05
4,6-dichlororesorcinol (metha)	7,51 ± 0,11

Les valeurs des constantes sont la moyenne des valeurs obtenues ± écart type lors de trois différentes expériences.

II. Relations entre les paramètres physicochimiques et l'activité de capture du radical hydroxyle des dérivés phénoliques.

Après la détermination des pKas du groupement phénolique des 18 molécules, une étude de leurs activités de capture du radical OH^\bullet est réalisée. Quelques exemples sont donnés dans les annexes 43 à 46. Les résultats obtenus ont servi à révéler les relations suivantes.

II.1. Relation entre le pKa et la constante de capture du radical OH^\bullet

La figure 34 met en évidence la variation de la constante de capture du radical OH^\bullet liée à la variation du pKa du groupement phénolique.

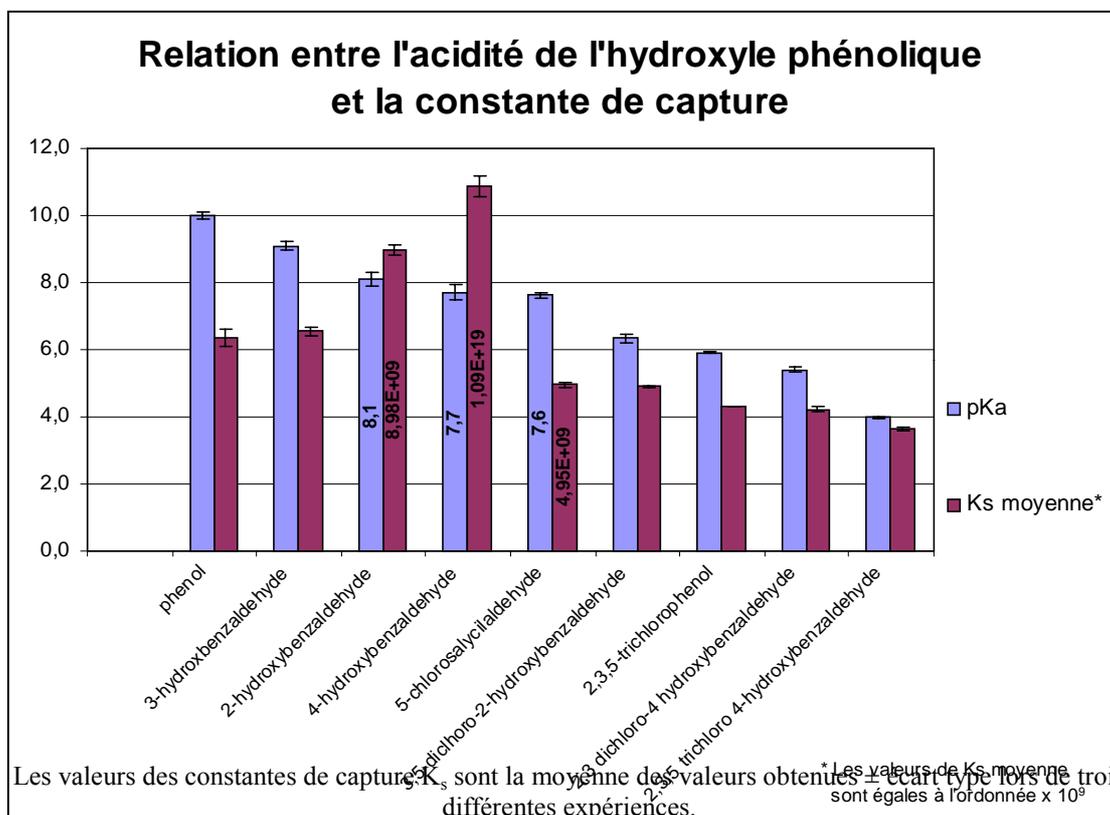


Figure 34 : Ks en fonction du pKa

La constante de capture du radical OH^\bullet augmente d'une manière inversement proportionnelle au pKa de l'hydroxyle phénolique pour des valeurs de pKa supérieures à 7,6. Dans les cas inverses, cette constante de capture diminue dans le même sens que le pKa . Aussi, nous pouvons conclure que les produits ayant des valeurs de $pKa > pH$ du milieu réactionnel se trouvent sous forme protonée et donc si le pKa diminue, la dissociation des liaisons homolytiques O-H devient plus facile [Brodwell et Cheng, 1991] permettant une meilleure activité de capture. Quant aux molécules possédant des valeurs de $pKa < pH$ du milieu, les résultats nous permettent de conclure que leur forme ionisée est moins active que celle non ionisée. Le fait d'être à pH 7,4 favorise la formation d'une fraction ionisée qui augmente d'un produit à l'autre chaque fois que leur pKa diminue.

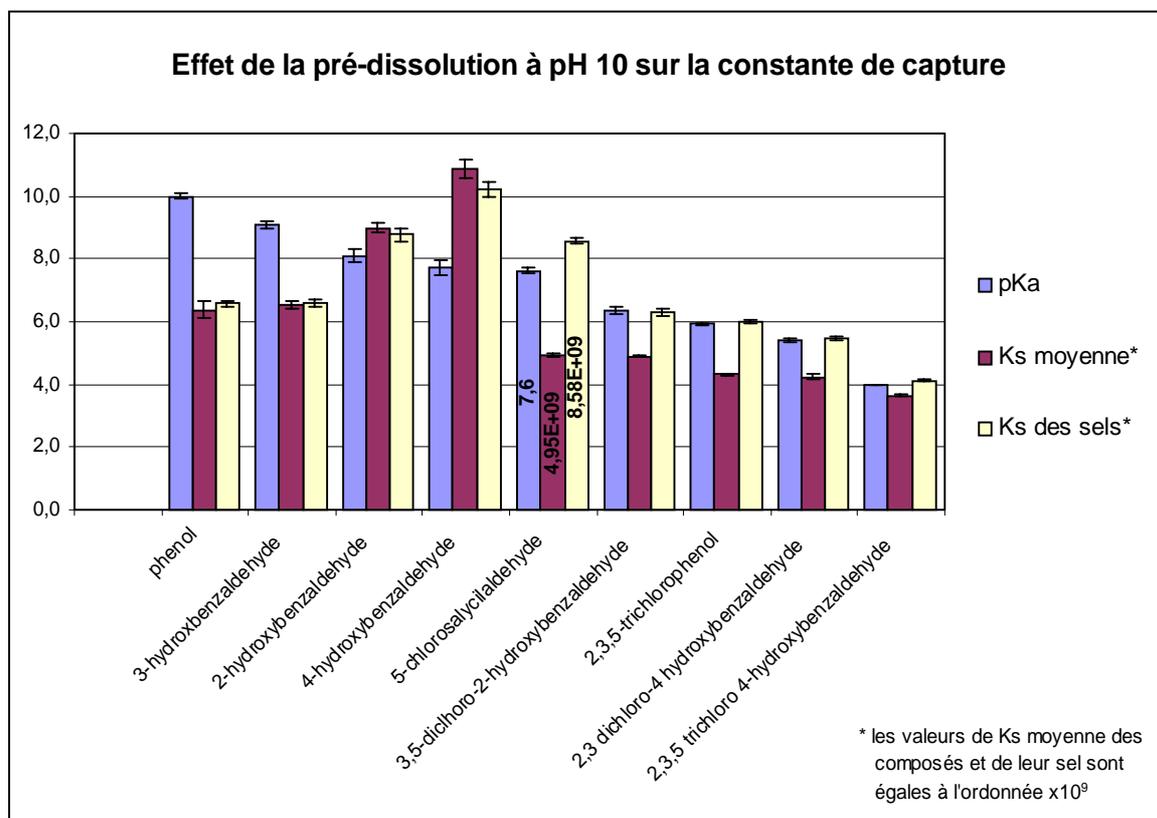
II.2. Effet de l'ionisation sur la constante de capture de radical OH^\bullet

L'ionisation de ces molécules est effectuée par l'addition de la soude 0,1 N jusqu'à l'obtention de l'équilibre où la valeur de pH est égale à celle du pKa ($pH = pKa$). Pour cette valeur de pH, toutes les molécules sont à moitié salifiées car ces molécules possèdent un seul hydrogène acide.

$$pKa = pH - \text{Log} \left(\frac{[S^-]}{[SH]} \right)$$

Pour $pH = pKa$ alors, $-\text{Log} \left(\frac{[S^-]}{[SH]} \right) = 0$ donc, $\left(\frac{[S^-]}{[SH]} \right) = 1$

Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 35.

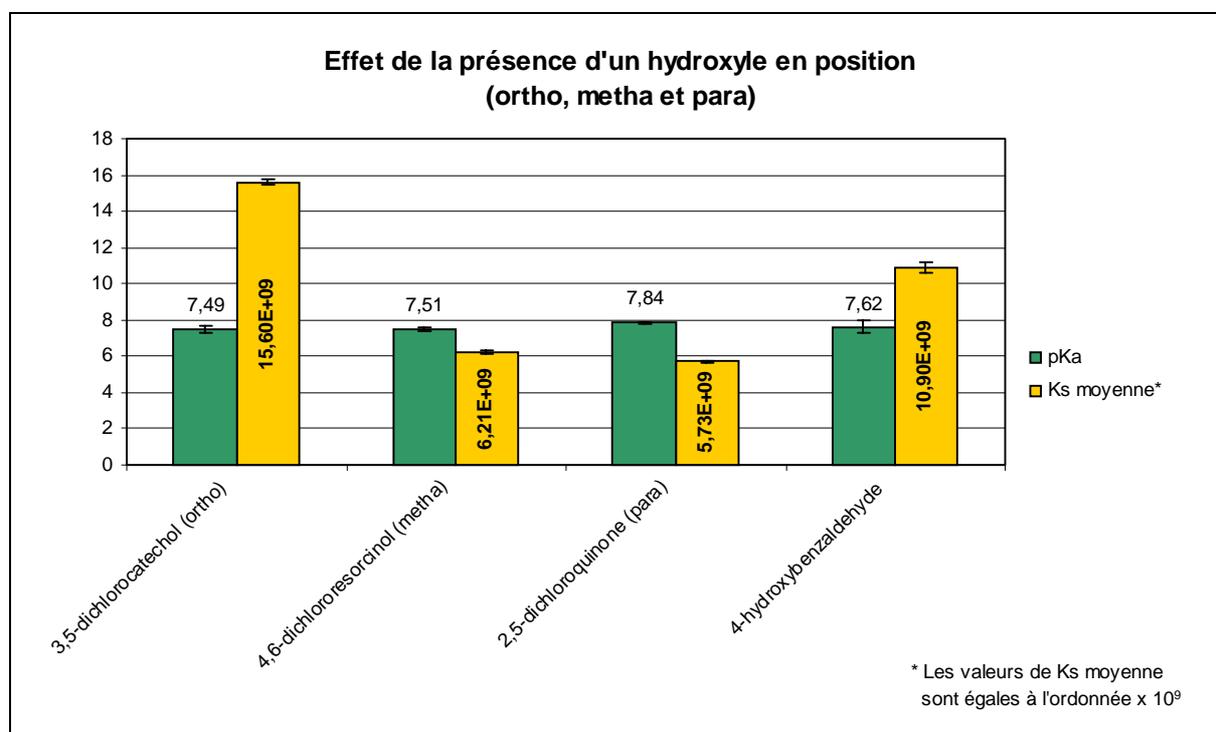


Les valeurs des constantes de capture k_s sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

Figure 35 : Effet de la pré-dissolution sur k_s

Dans cette figure 35, nous remarquons que la pré-dissolution dans le cas de la plupart des molécules étudiées n'a pas d'effet sur l'activité de capture du radical OH^\bullet sauf pour le 5-chlorosalicylaldehyde. Ceci est dû au pH du milieu qui reforme les mêmes produits qu'avant sauf pour la molécule ayant comme pKa 7,6 dont d'autres paramètres sont à l'origine de la variation de cette activité de capture.

II.3. Effet de la position d'un deuxième groupement hydroxyle phénolique sur la constante de capture du radical OH^\bullet



Les valeurs des constantes de capture k_s sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

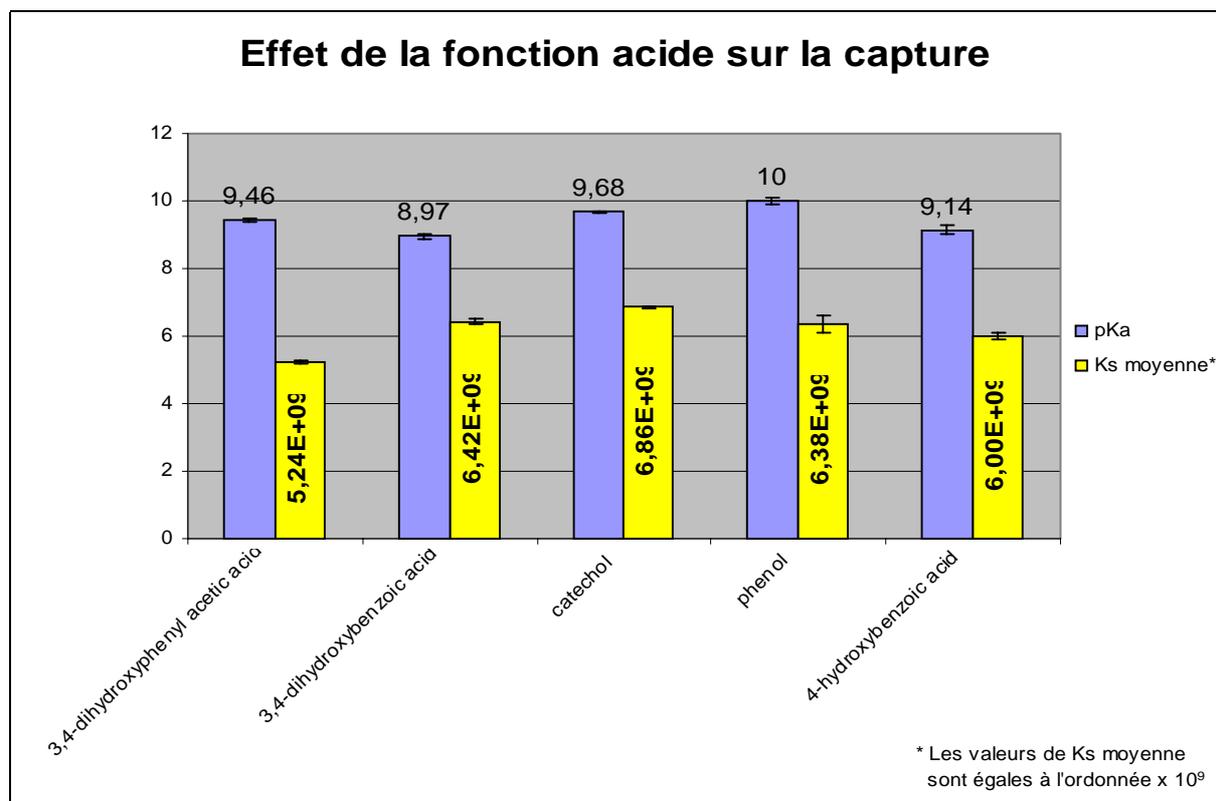
Figure 36 : Effet de la position du groupement hydroxyle sur k_s

La présence d'un deuxième groupement hydroxyle sur le noyau phénolique peut avoir un effet positif ou négatif sur la constante de capture k_s . En effet, la figure 36 nous montre que pour des molécules ayant une même valeur de pKa pour l'hydroxyle phénolique, la présence d'un groupement hydroxyle en position ortho du premier double la capacité de capture du radical OH^\bullet alors que sa présence en position para ou méta diminue de moitié cette capacité. Ainsi, le 4-hydroxybenzaldehyde ($pKa = 7,62$) possède une constante de capture du radical hydroxyle de $10,90 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Sec}^{-1}$ alors que le 2,5-dichloroquinone ($pKa = 7,84$) possède une constante de $5,73 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Sec}^{-1}$ car il renferme un deuxième groupement hydroxyle en position para du premier groupement. Quant au 3,5-dichlorocatechol ($pKa = 7,49$), la constante

trouvée est de $15,60 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Sec}^{-1}$ car le deuxième groupement hydroxyle est positionné en ortho par rapport au premier.

II.4. Effet de la présence d'une fonction très acide (carboxylique) sur la constante de capture du radical OH°

En examinant les données reprises à la figure 37, on remarque qu'une fonction très acide comme celle d'un groupement carboxylique a un effet négatif sur la vitesse de capture du radical hydroxyle. Par exemple, le pK_a phénolique du phénol est de l'ordre de 10 alors que celui de l'acide 4-hydroxybenzoïque est de 9. Au lieu d'observer que la constante de capture augmente, nous remarquons qu'elle diminue. De même dans le cas du catéchol, de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque et de l'acide 3,4-dihydroxyphényle acétique, nous remarquons qu'au lieu d'une augmentation, une diminution est aperçue mettant en évidence l'effet négatif de la fonction acide carboxylique.

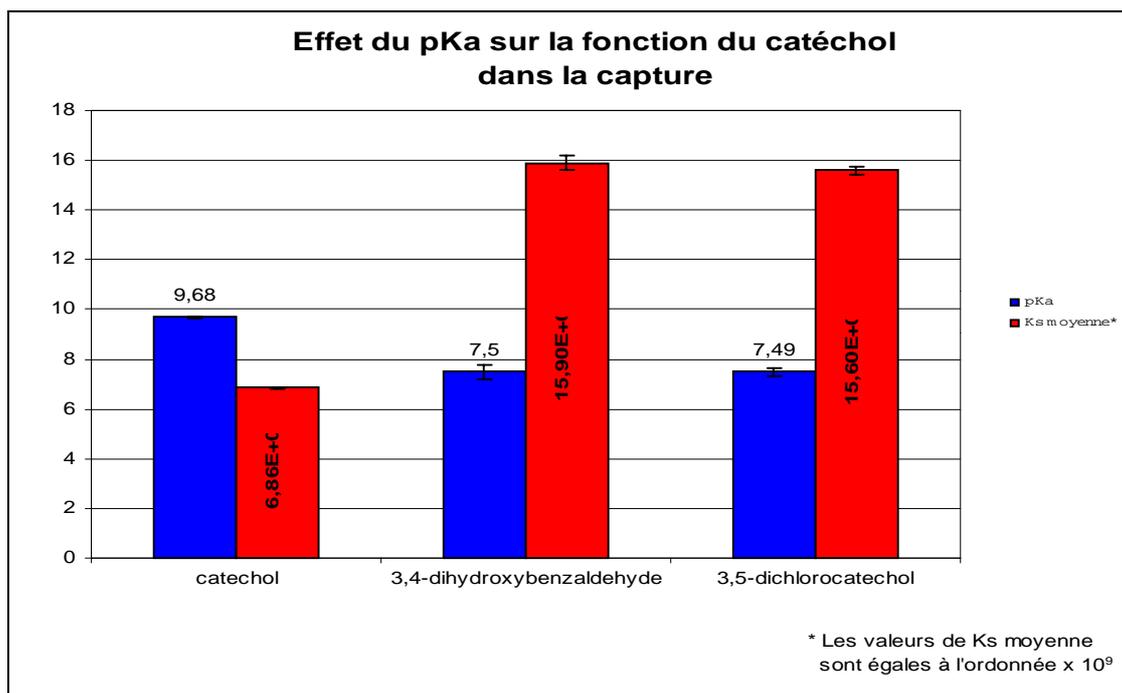


Les valeurs des constantes de capture k_s sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

Figure 37 : Effet de la position de l'hydroxyle sur k_s

II.3. Effet de pK_a sur k_s en présence de la fonction catéchol

La figure 38 nous permet de conclure que l'effet de la variation du pK_a en présence d'un groupement catéchol est très important, à savoir que la valeur de pK_a double pour une diminution de pK_a de deux unités. Nous pouvons également remarquer que quels que soient les groupements substituants responsables des valeurs du pK_a , l'activité ne varie pas comme dans le cas observé entre le 3,4-dihydroxybenzaldehyde et le 3,5-dichlorocatechol.



Les valeurs des constantes de capture k_s sont la moyenne des valeurs obtenues \pm écart type lors de trois différentes expériences.

Figure 38 : Effet de pK_a sur k_s pour les groupements catéchol

III. Conclusion

La quercétine est une molécule abondante dans notre alimentation mais sa solubilité est faible. La quercétine est active vis-à-vis de la capture des radicaux superoxydes alors que sa capacité de capture des radicaux hydroxyles par le modèle de Fenton n'a pas été étudiée du fait de la faible hydrosolubilité. La forme salifiée est beaucoup plus hydrosoluble et montre une meilleure activité antioxydante par capture des radicaux libres (hydroxyle et superoxyde) et ne présente pas un effet pro-oxydant. D'après les études précédentes nous avons pu conclure que des paramètres peuvent être à l'origine de cette augmentation d'activité de capture du radical OH^\bullet :

- Les hydroxyles avec des pK_a compris entre 7,71 et 8,87.

- La pré-dissolution (meilleure solubilité) peut être considérée comme avantageuse surtout qu'elle ne diminue pas l'activité mais dans des cas comme celle du 5-chlorosalicylaldehyde, elle a pour effet de doubler la capacité de capture du radical OH^\bullet .
- Un deuxième hydroxyle en position ortho (groupement catéchol)

Dans le cas du sel disodique de quercétine, nous remarquons que la molécule possède un groupement catéchol et deux groupements hydroxyles salifiés dont celui en position 3 est actif sous cette forme vis-à-vis de la capture alors que celui en position 7 contribue à la solubilité de la molécule.

Vu la capacité antioxydante de cette molécule, elle pourrait être utilisée en thérapeutique dans le traitement des maladies inflammatoires faisant intervenir la production des radicaux libres oxygénés comme le vieillissement cutané et les maladies inflammatoires intestinales comme la maladie de Crohn ou toutes autres maladies inflammatoires systémiques.

Cependant afin d'agir au niveau cutané ou intestinal, la biodisponibilité de cette molécule en particulier le transport à travers une membrane comme celle de la peau ou de la barrière intestinale doit être étudié. D'une part pour le traitement cutané du vieillissement de la peau, une crème antioxydante contenant le sel disodique de quercétine a été formulée et étudiée. D'autre part, afin d'être utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires ciblées sur l'intestin comme la maladie de Crohn ou systémiques après administration par voie orale, l'absorption intestinale du sel disodique de la quercétine doit également être étudiée.

TROISIEME PARTIE

APPLICATION THERAPEUTIQUE

I- APPLICATION CUTANEE

La peau constitue une barrière contre les agressions extérieures. En effet, elle est soumise à différentes contraintes mécaniques, aux diverses pollutions, aux rayons solaires, au froid qui lui sont particulièrement néfastes et qui entraînent son vieillissement. De nombreuses recherches ont montré que le vieillissement cutané est principalement dû à des espèces très réactives présentes naturellement dans notre organisme, les radicaux libres.

L'organisme possède des systèmes de défense naturels (enzymatiques ou non), mais souvent, lors d'une exposition prolongée aux rayonnements du soleil par exemple, ces mécanismes ne sont pas suffisants pour assurer l'équilibre entre la production et la destruction des radicaux libres avec pour conséquence une action nuisible de ces derniers. De ce fait, il est donc indispensable d'aider l'organisme à piéger ces éléments afin d'éviter les dégâts qu'ils entraînent.

Le sel disodique de quercétine dont la capacité de capture des radicaux hydroxyle et superoxyde a été mise en évidence précédemment a fait l'objet d'une étude de pénétration cutanée en formulant une crème destinée à une application par voie topique à partir du sel disodique de quercétine.

Après avoir formulé cette crème, nous avons étudié la pénétration cutanée de la molécule afin de vérifier que celle-ci était bien adaptée à une application topique. Pour étudier cette cinétique, nous avons utilisé une méthode préconisée par la FDA, la méthode des « strippings ».

Après un rappel sur la peau et ses propriétés, une formulation d'une crème à base de sel disodique de quercétine est formée. Une étude de stabilité de la molécule en solution est réalisée, ensuite la méthode d'analyse par CLHP du sel disodique de quercétine contenu dans la crème est validée. Enfin, la méthode des « strippings » est validée et l'expérimentation réalisée.

I. Généralités

I.1. Structure histologique de la peau

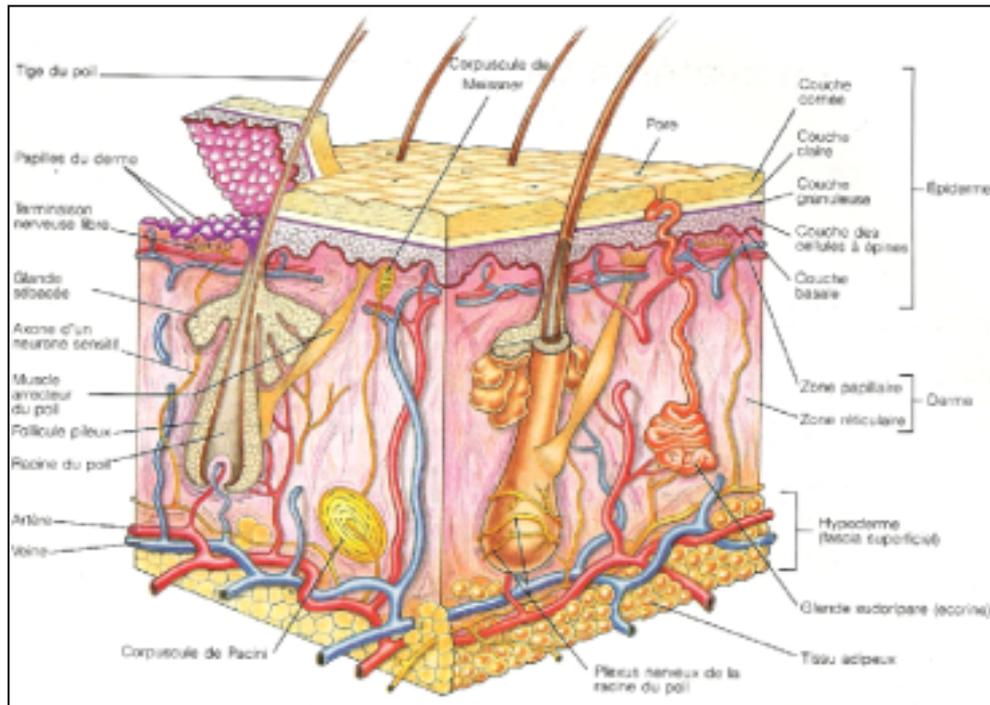


Figure 39 : Structure de la peau [Marieb, 1993]

La peau est constituée de trois parties principales (Figure 39) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

I.2. L'épiderme [Schmitt, 1995 ; Franceschini, 1994]

L'épiderme est un épithélium de Malpighi stratifié kératinisé et composé de plusieurs types cellulaires qui se renouvellent constamment et de nombreux éléments associés. La majorité des cellules épidermiques sont les kératinocytes (90%). Les kératinocytes sont des cellules épithéliales à différenciation particulière (kératinisation) ayant pour but, la formation de cellules anucléées aplaties (cornéocytes) qui se desquament à la surface cutanée.

I.2.a Les kératinocytes de l'épiderme

Ils sont agencés en couches continues de la profondeur à la surface reposant sur la membrane basale sous-jacente:

La couche basale ou germinative

Elle est constituée d'une rangée unique de cellules cubiques capables de se multiplier activement. Entre ces cellules, se trouvent les cellules de Merkel et les mélanocytes.

Le corps muqueux de Malpighi

Ce sont 5 à 6 couches cellulaires polyédriques. Au fur et à mesure de leur progression vers la surface, elles vont s'aplatir et leur cytoplasme va se charger de granulations pour former la couche granuleuse.

La couche granuleuse

Elle se compose de 1 à 3 assises de cellules aplaties

La couche cornée

C'est une membrane épaisse et rigide de 5 à 10 assises cellulaires. Les cellules la composant sont aplaties, dépourvues de noyau et ont perdu leurs granulations. Elles vont se détacher progressivement.

Les kératinocytes migrent de la couche basale vers la surface en 30 jours environ. Cette transformation est la kératinisation.

La kératine résulte de la transformation des éléments constitutifs de la cellule basale au cours de sa migration. Cette production de kératine est activée par le soleil.

I.2.b Les cellules non épithéliales de l'épiderme

Ce sont des cellules dendritiques épidermiques présentant des projections cytoplasmiques ramifiées s'intercalant entre les kératinocytes.

On trouve différents types cellulaires

- Les cellules de Langerhans
- Les mélanocytes
- Les cellules de Merkel
- Les fibres nerveuses

Aucun vaisseau sanguin ne traverse la couche basale épidermique.

I.2.c Les annexes épidermiques

Ce sont des invaginations épidermiques qui sont logées en grande partie dans le derme et l'hypoderme.

- Les poils et cheveux
- Les glandes sudoripares
- Les glandes sébacées

I.2.d La jonction dermo-épidermique (JDE)

Elle est très sinueuse et pénètre profondément dans le derme, permettant l'amarrage de l'épiderme au derme.

C'est une membrane basale complexe élaborée conjointement par les kératinocytes basaux et les fibroblastes. Elle joue un rôle fondamental comme support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et contrôle les échanges de produits métaboliques entre ces deux compartiments.

Par ailleurs, elle sert de support de migration des kératinocytes lors de la cicatrisation et elle est traversée par différents types cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes) lors de processus immunologiques et inflammatoires.

La JDE présente une structure composée de quatre étages

- La membrane basale des kératinocytes basaux et leurs hémi-desmosomes
- La lamina lucida
- La lamina densa
- La zone fibrillaire sous-basale

Sur la membrane basale sont fixées les cellules basales de l'épiderme. La fixation est assurée surtout par les hémidesmosomes et les fibres d'encrage. Les cellules sont réunies entre elles par les desmosomes.

I.3. Le derme [Schmitt, 1995 ; Franceschini, 1994]

C'est un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique qui protège l'épiderme, le réseau vasculaire et les fibres nerveuses qui la traversent.

Il est composé de cellules: les fibroblastes qui vont sécréter la substance fondamentale.

Il est l'objet d'un remodelage permanent, régulé par des mécanismes de contrôle de la synthèse et de la dégradation des éléments protéiques de la matrice.

C'est dans le tissu conjonctif que les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses s'épanouissent.

Le derme est composé de deux parties:

- le derme réticulaire profond (qui constitue les 4/5 de l'épaisseur)
- le derme papillaire superficiel sous l'épiderme

I.3.a Les fibres

- Les fibres de collagène
- Les fibres élastiques
- Les fibres de réticuline

I.3.b La substance fondamentale amorphe

Elle remplit tous les interstices entre les cellules et les fibres du derme.

Ce sont des protéoglycanes (acide hyaluronique, chondroïtines sulfates, kératane sulfate, héparane sulfate) produites par les fibroblastes. La fixation de l'eau par la peau dépend de la qualité et de la quantité de ces protéoglycanes, et donc de la vitalité des fibroblastes.

I.3.c Les cellules résidentes du derme

- Les fibroblastes
- Les histiocytes
- Les mastocytes
- Autres cellules

Certaines cellules sont quasiment absentes du derme non pathologique mais peuvent s'y trouver en transit pour jouer un rôle de défense: lymphocytes, polynucléaires, plasmocytes.

I.4. L'hypoderme [Schmitt, 1995 ; Franceschini, 1994]

C'est un tissu graisseux séparant le derme des plans aponévrotiques et périostes sous jacents. Il est constitué de sept couches d'anneaux conjonctifs qui cloisonnent les lobules adipeux et contiennent des cellules (fibroblastes, dendrocytes, mastocytes), la partie profonde des annexes épidermiques, les glandes sudorales, les follicules pileux et des troncs vasculaires et nerveux à l'origine des plexus vasculaires et nerveux dermiques. Sous l'action des rayons ultraviolets du soleil, les mécanismes naturels de défense de la peau ne sont pas suffisants. Un grand nombre des cellules de la peau se retrouvent alors sans protection face aux agressions oxydantes. Il peut en résulter un vieillissement précoce de la peau ou même induction de

cancers. Toutefois, un certain nombre d'études montrent que l'utilisation de certains antioxydants peut aider à lutter contre l'apparition de ces phénomènes [MAJ Octobre 2003].

I.5. Peau et filtre solaire

Pour comprendre la nocivité du rayonnement solaire, il est nécessaire de connaître sa composition. Il se divise en trois parties (voir annexe 47) :

- **La lumière visible** (entre 400 nm et 800 nm, du rouge au violet) que l'on peut voir à l'œil nu. Elle est peu arrêtée par l'atmosphère ; elle n'est pas nocive et intervient dans les phénomènes de vision.
- **Les rayons infrarouges** (de 800 nm à 1 micron) sont responsables de la sensation de chaleur. Ils ne constituent pas un danger pour l'homme.
- **Les rayons ultraviolets** (100 nm à 400 nm) sont plus énergétiques que les autres rayons. Ce sont eux qui nous intéressent au niveau de la protection cutanée car ils sont à l'origine des dangers suite à l'exposition au soleil.

Ces derniers sont divisés en i) UVA (320 nm à 400 nm), les plus abondants, ii) UVB (280 à 320 nm), moins abondants, et iii) UVC (100 nm à 280 nm) qui pourraient être extrêmement dangereux s'ils n'étaient pas absorbés par la couche d'ozone. L'atmosphère nous protège également des rayons X.

Les bons filtres solaires doivent donc nous protéger des UVA et des UVB. Ils peuvent être de deux types [MAJ Septembre 2003]:

- **minéraux** : ce sont des écrans physiques constitués d'oxydes de zinc, de dioxyde de titane ou d'autres pigments et qui agissent en réfléchissant les rayonnements ;
- **organiques** : ce sont des molécules carbonées complexes pouvant absorber les rayonnements dans une certaine gamme de longueur d'onde, sans être détruites.

I.6. Peau et radicaux libres

Par sa fonction de barrière, mais aussi par son exposition aux agressions physiques (telles que les radiations ultraviolettes provenant du soleil), chimiques (l'ozone ou tout autre agent toxique) virales et bactériennes, la peau est le siège privilégié de réactions inflammatoires et de production de radicaux libres, notamment par la présence de l'oxygène ambiant et par l'irradiation des ultraviolets.

L'exposition chronique aux ultraviolets du soleil est un facteur majeur dans l'apparition des cancers de la peau chez l'homme et contribue au vieillissement cellulaire.

Le photo-vieillessement cutané s'accompagne par l'apparition de rides, d'une perte d'élasticité et d'une augmentation de la fragilité de la peau qui perd peu à peu sa fonction de protection, avec diminution du pouvoir de cicatrisation.

Il est généralement admis que l'application topique d'antioxydant peut réduire les dommages causés par les radiations ultraviolettes au niveau de la peau.

Parmi ces antioxydants employés en dermatopharmacie, les flavonoïdes sont utilisés. Dans notre étude, nous avons choisi la forme du sel disodique de quercétine.

Le développement d'une crème dermo-cosmétologique, contenant cette molécule, est envisagé pour le traitement des dommages oxydatifs et dans la prévention du vieillissement cutané.

I.7. Peau reconstituée pour l'étude de biodisponibilité cutanée

Pour épargner la vie de milliers de cobayes en laboratoires et pour éviter les problèmes éthiques chez l'homme, de l'épiderme humain reconstitué est produit par la société **SkinEthic**. La technologie initiée par cette société permet de reconstituer *in vitro* 5000 échantillons d'épiderme à partir d'un fragment de peau de 5 millimètres.

A l'épiderme reconstitué se sont rajoutées les muqueuses de cornée, buccales, gingivales, vaginales, pulmonaires ou oesophagiennes. Les chercheurs peuvent utiliser désormais ces parcelles de peau d'une durée de vie d'une semaine pour tester l'efficacité et la toxicité d'une myriade de produits (crème de soin, collyres, contraceptifs, savons liquides...). Cette méthode est plus efficace et dix fois moins coûteuse que l'expérimentation animale. Par exemple, l'irritation cutanée se développe en un temps record de 72 heures sur les tissus, au lieu de dix à quinze jours sur la peau d'un sujet vivant. Ces tests *in vitro*, réduisent considérablement les expériences menées jusqu'à présent *in vivo*. La directive européenne prévoit d'interdire l'expérimentation animale pour la cosmétologie, dès le 11 mars 2009, d'où l'importance de l'enjeu.

II. Partie expérimentale

II.1. Formulation de la crème

II.1.a Définition des pommades

Il s'agit d'une préparation de consistance semi-solide destinée à être appliquée sur la peau ou les muqueuses afin d'exercer une action locale ou de réaliser la pénétration percutanée de principes actifs médicamenteux. Elle est constituée d'un excipient simple ou composé dans lequel sont dissous un ou plusieurs principes actifs. La composition de l'excipient a une influence sur les effets de la préparation car il conditionne la libération du principe actif. Cette préparation doit présenter un aspect homogène [*Pharmacopée Européenne 4e édition*].

II.1.b Choix de la forme thérapeutique

Parmi les différentes formes pharmaceutiques pour application cutanée qui existent (les pommades proprement dites, les crèmes, les gels et les pâtes), le choix s'est porté sur la crème car elle offre la possibilité d'avoir deux phases : une phase lipophile et une phase hydrophile, ce qui permet une meilleure pénétration des couches superficielles de l'épiderme en même temps que de nous permettre la solubilisation du sel disodique de la quercétine.

On doit ensuite choisir les composants de la crème pour favoriser la facilité d'utilisation, l'activité et la tolérance.

II.1.c Composition de la crème

Choix des excipients [*Le Hir A, 1997*]

Les excipients d'une crème doivent être choisis pour leur :

- Capacité à donner une **consistance** permettant **un étalement rapide**,
- **Compatibilité** avec le ou les principes actifs,
- **Tolérance** par la peau (pour éviter les allergies),
- **Stabilité** et leur durée de conservation,

Les constituants de notre crème sont choisis parmi les trois catégories d'excipients classiques.

- **Les excipients lipophiles** qui comprennent les hydrocarbures, les glycérides, les cires et dérivés et les silicones,
- **Les excipients hydrophiles** qui regroupent les PEG ou macrogols,
- **Les excipients émulsionnés** qui permettent de stabiliser ensemble les deux phases de la crème.

Composition définitive

Phase aqueuse	{	Sel disodique de quercétine à 2%
		Propylène glycol

	Eau distillée
Phase lipophile	{ Cire blanche Alcool cétylique Laurylsulfate de sodium

II.1.d Préparation de la crème

Celle-ci est effectuée selon le schéma de fabrication classique des crèmes présenté en annexe 48.

Les deux phases sont chauffées séparément dans des capsules : la phase aqueuse est portée à 70°C et la phase lipophile à 60°C. La phase hydrophile est ajoutée doucement à la phase huileuse. L'homogénéisation est réalisée par mélange dans un mortier et au moyen d'un pilon.

NB : Cette dernière étape est à effectuer avec soin car la formation de grumeaux se produit facilement et leur élimination est difficile.

II.1.e Améliorations éventuelles

Après avoir préparé plusieurs fois cette crème et l'avoir utilisée pour la validation de la méthode de quantification du sel disodique de la quercétine et l'étude de la pénétration cutanée, il apparaît que certaines améliorations pourraient lui être apportées.

- **la viscosité de la crème** est trop importante ce qui rend l'étalement peu agréable et favorise la présence de particules et de grumeaux. Une diminution de la quantité de cire blanche et/ou de l'alcool cétylique pourrait être une solution.
- **l'odeur de la crème** est peu agréable et assez caractéristique de la cire blanche. Diminuer la quantité de cire blanche ou ajouter un parfum (dans la mesure où celui-ci n'a pas d'influence sur l'activité de la molécule active et non allergisant) devrait résoudre ce problème.
- **la couleur de la crème** légèrement jaunâtre. Dans la mesure où cela ne réduirait pas l'activité antioxydante, une diminution de la quantité de sel disodique pourrait réduire cette couleur jaune. Dans le cas contraire, l'ajout d'un colorant dans les mêmes conditions de restriction que pour le parfum pourra être envisagé.

II.2. Etude du sel disodique de quercétine comme protecteur solaire

Un filtre solaire doit absorber entre 280 et 400 nm de façon importante et continue (<http://www.unice.fr/cdiac/congres/>). Nous allons étudier cette capacité avec le sel disodique de quercétine afin de voir si celui-ci peut jouer le rôle de protecteur solaire. Pour cela, nous allons procéder à une comparaison avec un filtre solaire classique par spectrophotométrie d'absorption.

Parmi la liste des filtres solaires pouvant être utilisés en cosmétique (disponible en annexe 49), nous avons choisi de comparer l'absorbance dans l'UV du sel disodique de quercétine avec le paraméthoxycinnamate d'éthylhexyle (PMC).

II.2.a Préparation des solutions

Solution A : solution de PMC à 20 µg/mL dans l'eau

Solution B : solution de sel disodique de quercétine à 20 µg/mL dans le méthanol

II.2.b Méthode

Réalisation d'un spectre par passage de ces solutions au spectrophotomètre entre 280 et 400 nm.

II.2.c Résultats

A la même concentration, les absorbances maximales sont les suivantes (les spectres sont présentés en annexe 50) :

PMC (280 nm) : 3,2

Sel disodique de quercétine (353 nm) : <0,5

II.2.d Conclusion

L'absorbance dans l'UV du sel disodique de quercétine est très faible (< 0,5) en comparaison d'un filtre solaire classique type PMC (3,2). Cependant ce dernier présente un inconvénient majeur : il passe à travers l'épiderme et se trouve facilement dans le torrent circulatoire.

II.3. Stabilité du sel disodique de quercétine

Avant d'envisager la formulation d'une crème à base du sel disodique de quercétine, sa stabilité en fonction du temps devra être étudiée dans différentes conditions (solvant, pH) :

II.3.a Préparation des solutions

Solution A : solution aqueuse ajustée à pH 2,5 contenant 20 µg/mL de sel disodique de quercétine.

Solution B : solution aqueuse ajustée à pH 7,4 contenant 20 µg/mL de sel disodique de quercétine.

Solution C : solution méthanolique contenant 20 µg/mL de sel disodique de quercétine.

Solution D : solution à 99% aqueuse et 1% méthanolique ajusté à pH 7,4 contenant 20 µg/mL de sel disodique de quercétine.

II.3.b Méthode analytique

La méthode d'analyse est la chromatographie liquide réalisée sur le même appareil que précédemment mais dans des conditions différentes.

Les conditions chromatographiques sont :

Phase mobile : 20% acétonitrile / 80% eau acidifiée à pH 2,3

Débit : 1 mL/min

Détection UV/VIS à 353 nm

Dans ces conditions, le temps de rétention du pic du sel disodique de quercétine est 7 minutes environ ce qui est tout à fait exploitable pour un temps d'analyse de 20 minutes.

II.3.c Résultats

Après analyse de la solution A sur 6 jours, on observe un dédoublement des pics (annexe 51). Ce dédoublement serait dû à une dégradation de la molécule.

L'analyse chromatographique de la solution B sur 6 semaines révèle un seul pic. Cependant l'aire du pic fluctue en fonction du jour d'injection (Figure 40). Les résultats sont donnés dans l'annexe 52. Ceci nous conduit à émettre différentes hypothèses.

1) Premièrement, nous avons pensé qu'il est possible que la molécule s'adsorbe sur le verre. Nous avons donc réalisé les mêmes analyses, mais en plaçant la solution non plus dans des fioles en verre, mais dans des flacons en plastique. Ces flacons en plastique sont composés de polyéthylène et empêchent l'adsorption de molécules sur les parois du récipient. L'étude de la stabilité du contenant sur six semaines démontre que cette hypothèse n'est pas la bonne : en effet on retrouve le même problème de fluctuations aléatoires de l'aire du pic de sel disodique de quercétine.

2) Ensuite nous avons pensé que la concentration de 20µg/mL est trop faible pour être reproductible.

Nous avons donc préparé une solution B de concentration de 50 µg/mL. Après injection de la solution, nous avons remarqué que le problème persiste.

3) Nous avons aussi pensé que le solvant de dissolution était mal adapté. Nous avons dissous la molécule dans du méthanol où elle montre une meilleure stabilité mais insuffisante (Figure 40). Les résultats sont donnés dans l'annexe 52.

4) Enfin, nous avons dissous la molécule dans un mélange contenant 99% d'eau et 1% de méthanol et nous avons trouvé que les résultats sont beaucoup moins variables en fonction du temps. Nous avons conclu que le sel disodique de quercétine est donc plus soluble dans l'eau que dans le méthanol mais sa présence dans un solvant polaire le rend plus réactif et en conséquence dégradable, d'où la recommandation d'ajouter une légère quantité de méthanol (1%) pour limiter cette dégradation (Figure 40). Les résultats sont donnés dans l'annexe 52. Cette diminution des surfaces de pics serait due à une lente précipitation.

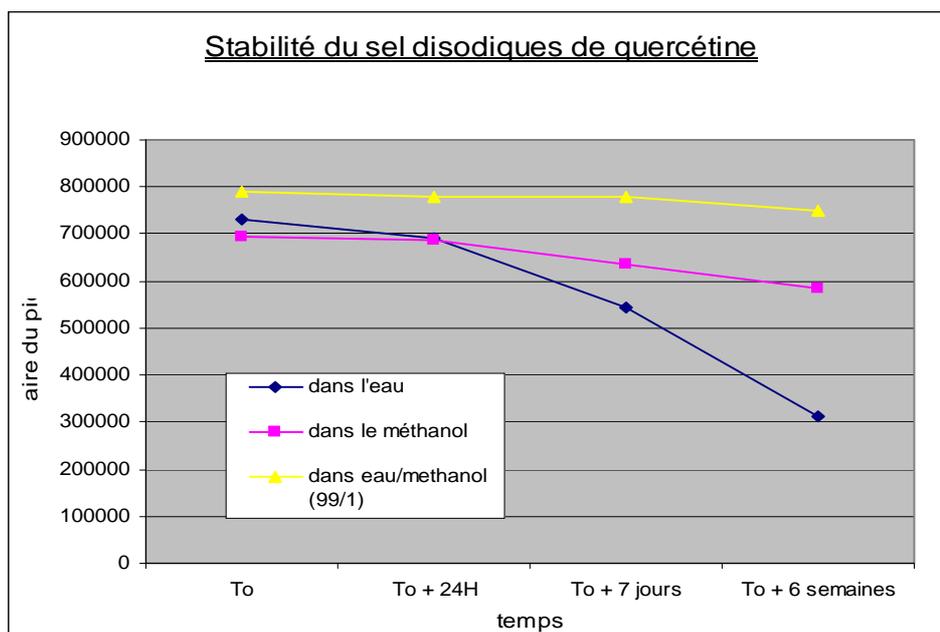


Figure 40 : Stabilité du sel disodique dans différents solvants

II.4. Validation de la méthode de dosage selon la SFSTP [Caporal-Gautier et al.]

II.4.a But de la validation

Nous avons donc réalisé la validation de la méthode de dosage du sel disodique de quercétine afin de démontrer que celle-ci est appropriée pour l'usage que l'on voudra en faire par la suite. En effet, lors de l'étude de la pénétration cutanée du sel disodique de quercétine, nous aurons besoin de doser les quantités de ce sel présentes dans les différentes couches de l'épiderme.

II.4.b Critères et étude de validation

Une méthode de contrôle est validée par le biais de critères de validation ou caractéristiques de performance. Les critères rencontrés le plus généralement dans la validation sont la fidélité, l'exactitude, la spécificité, le seuil de détection, le seuil de quantification, l'intervalle de validité et la robustesse.

La spécificité

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer quantitativement ou de détecter spécifiquement un paramètre physicochimique ou groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances présentes dans l'échantillon. C'est la mesure du degré d'interférences dues à la présence de substances autres que celles recherchées dans le produit étudié.

On vérifie donc l'absence d'influence des excipients sur le pic principal de sel disodique de quercétine en utilisant une crème qui ne renferme que les excipients. Sur le chromatogramme résultant de l'injection de la solution obtenue après solubilisation de cette crème et filtration, aucun autre pic à l'exception de celui du sel disodique de quercétine ne doit être observé durant le temps d'analyse.

Une procédure analytique sera dite spécifique lorsqu'on aura la garantie que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser.

Le chromatogramme résultant de l'injection d'une solution de la crème ne contenant pas le sel disodique de quercétine (voir annexe 53), correspondant à la concentration 50 µg/mL pour la quantité des excipients, ne présente aucun pic. Nous pouvons donc en déduire que les excipients de la crème n'ont aucune interférence avec le pic de sel de quercétine.

Le signal enregistré provient exclusivement de la substance à analyser, on peut donc dire que la méthode est spécifique.

La fidélité

La fidélité exprime le degré de variabilité d'une technique d'analyse. On étudie la dispersion des résultats obtenus au cours d'une analyse. Elle s'évalue à l'aide de :

- la répétabilité
- la reproductibilité

• *Répétabilité*

La répétabilité exprime le degré de dispersion sur plusieurs prises provenant d'un même échantillon analysées dans des conditions identiques (mêmes échantillon, analyste, jour, réactifs, appareillage, conditions expérimentales) ce qui correspond au cas de variabilité minimale, soit le cas le plus favorable.

Nous avons effectué, en accord avec les recommandations de l'ICH, six essais à la concentration spécifique (soit 50 µg/mL) afin de pouvoir étudier ce critère.

Afin d'estimer la variabilité correspondant à la répétabilité, on calcule le coefficient de variation de l'aire du pic de sel disodique de quercétine.

Norme : Le coefficient de variation ne doit pas dépasser 1%.

• *Reproductibilité*

Pour la reproductibilité par contre, on fait varier les paramètres afin de simuler ce qui est susceptible de se produire au sein du laboratoire en routine.

On exploite trois séries d'au minimum six essais, chaque série correspondant à une étude de répétabilité. De la même manière, la reproductibilité s'apprécie à l'aide du coefficient de variation. Etant donné que les facteurs de variation sont plus importants, la spécification est plus élevée :

Norme : Le coefficient de variation ne doit pas dépasser 5%.

Les injections réalisées pour démontrer la fidélité sont effectuées sur le point 100% de la gamme de linéarité soit la solution de concentration à 50 µg/mL. Trois solutions de 50 µg/mL sont donc préparées sur trois jours. Chaque échantillon est injecté six fois de manière consécutives.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Tableau 11 : Etude de la fidélité sur trois jours

Groupe	Essai	Concentration théorique (µg/mL)	Surface	Concentrée retrouvée (µg/mL)	Recouvrement (%)
1 ^{er} groupe	1/1	50,00	2151455	53,53	107,1
	2/1	50,00	2162583	53,80	107,6
	3/1	50,00	2157782	53,69	107,4
	4/1	50,00	2170913	54,01	108,0
	5/1	50,00	2159294	53,72	107,4
	6/1	50,00	2160301	53,75	107,5
2 ^e groupe	1/2	50,00	2151455	53,84	107,7
	2/2	50,00	2162293	54,11	108,2
	3/2	50,00	2158228	54,01	108,0
	4/2	50,00	2170913	54,33	108,7

	5/2	50,00	2159294	54,04	108,1
	6/2	50,00	2157241	53,98	108,0
3 ^e groupe	1/3	50,00	2053487	50,38	100,8
	2/3	50,00	2049093	50,28	100,6
	3/3	50,00	2040860	50,07	100,1
	4/3	50,00	2050675	50,31	100,6
	5/3	50,00	2045157	50,18	100,4
	6/3	50,00	2055003	50,42	100,8

D'après le tableau 11 le coefficient de variation calculé de la répétabilité est égal à 0,29%. Ces résultats aussi permettent de vérifier la reproductibilité dont le coefficient

de variation est égal à 3,99%.

L'ensemble des variances peut être considéré comme homogène. La méthode est donc fidèle (répétable et reproductible).

La linéarité

• Définition

C'est la capacité d'une procédure d'analyse à fournir, à l'intérieur d'un certain intervalle, des résultats proportionnels à la concentration en substances à examiner dans l'échantillon (définition de l'ICH). Dans notre cas, c'est l'aire du pic correspondant au sel disodique de quercétine qui doit être proportionnelle à sa concentration dans l'échantillon.

• Solutions à préparer

L'ICH [ICH, 1995] demande au minimum trois séries de cinq échantillons (une série par jour) de concentrations différentes s'étalant sur un domaine de validité allant de 80 à 120% de la valeur spécifiée pour pouvoir apprécier la linéarité. Le protocole est à réaliser à la fois sur la forme pharmaceutique reconstituée et sur la substance de référence.

Dans notre cas, il est probable que les concentrations à doser dans les couches de l'épiderme lors de l'étude de la pénétration cutanée seront faibles alors que les dosages de la crème révéleront des teneurs assez élevées. Aussi nous avons choisi d'élargir la gamme, soit 7 points.

La gamme à réaliser est la suivante : (exprimée en quantité de sel disodique de quercétine par unité de volume dans un mélange eau/méthanol à 99/1) ; cette proportion est justifiée par la meilleure solubilité trouvée ultérieurement.

1 µg/mL - 10 µg/mL - 20 µg/mL - 50 µg/mL - 80 µg/mL - 100 µg/mL - 200 µg/mL

NB : Le sel extrait de la crème dans du méthanol est repris, après évaporation sous vide (speedvac, de Savant Technologies), dans le mélange 99/1 (eau/méthanol).

• Etude statistique

La linéarité s'évalue à l'aide de plusieurs calculs et tests statistiques :

① Calcul de la pente et de l'ordonnée à l'origine moyenne

On effectue une analyse des couples (x,y) où x sont les concentrations et y les surfaces des pics observées en CLHP, l'hypothèse étant qu'il existe une droite de régression

linéaire inconnue :

$$y = Ax + B$$

On recherche les estimations **a** et **b** de **A** et **B** correspondant à une droite d'équation $y = ax + b$, qui est une estimation de la droite réelle inconnue.

② Calcul du coefficient de corrélation

Ce calcul permet d'apprécier le degré de liaison entre les différents couples (x,y).

③ Test de comparaison des origines avec zéro

Grâce à un test de Student, on démontre que les ordonnées à l'origine pour la droite correspondant à la substance de référence ainsi que celle correspondant au produit fini ne sont pas significativement différentes de zéro et que lorsque la concentration est nulle, la surface du pic est également nulle.

④ Test de comparaison des pentes

A nouveau, c'est un test de Student qui permet de démontrer que les deux pentes sont assimilables l'une à l'autre.

⑤ Test de comparaison des ordonnées à l'origine.

Idem que pour la comparaison des pentes.

⑥ Test d'homogénéité des variances.

Réalisé à l'aide du test de Cochran. Ce test est basé sur le rapport de deux variances : la variance résiduelle et la variance de la droite. Ce test nous permet ainsi de vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale.

Si le test est vérifié ; il n'y a pas de valeur aberrante, on peut comparer les 3 séries.

⑦ Test de l'existence des pentes.

Un test de Fisher nous permet de comparer les variations dues à la régression et aux erreurs (expérimentales et d'ajustement). Si le test est significatif, on conclut à l'existence d'une pente.

La linéarité a été étudiée sur trois jours, à raison d'une série de produit fini (crème) et de référence par jour (annexe 54).

Tableau 12: Comparaison des paramètres obtenus avec ceux de la théorie.

Paramètres de linéarité	Produit de référence	Produit fini	Valeur théorique à 5% Pour 7 points
(1) Pente des droites d'ajustement (moyenne)	40297	40719	
(2) Ordonnée à l'origine des droites d'ajustement	2481	-35812	
(3) Coeff. Corrélation	1	1	
(4) Tests de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 (test t)	0,23 NS	1,55 NS	2,086
(5) Test d'homogénéité des variances (Cochran)	0,41 NS	0,55 NS	0,561
(6) Test de l'existence des pentes (Fisher)	125114 HS	27636 HS	4,35
(7) Validité des ajustements (Fisher)	0,81 NS	2,40 NS	4,35
(8) Test de comparaison des ordonnées à l'origine (test t)		1,51 NS	2,086
(9) Test de comparaison des pentes des droites d'ajustement (test t)		1,56 S	2,086

NS: non significatif; HS: hautement significatif; S: significative

Tous les paramètres doivent être inférieurs aux valeurs théoriques, sauf pour le test de Fisher. D'après le tableau 12 nous constatons que les valeurs des paramètres satisfont à cette théorie. Donc, cette étude de linéarité pour la gamme de référence et de la crème montre qu'il y a une relation linéaire entre les concentrations et les surfaces de pic.

L'exactitude

Selon les normes ICH, l'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée :

- soit comme une valeur conventionnellement vraie (étalon de référence au sein d'une firme)
- soit comme une valeur de référence (étalon international) et la valeur moyenne trouvée obtenue sur les trois séries (définition de l'ICH).

L'exactitude d'une méthode analytique est l'absence d'effet de la concentration sur les résultats obtenus.

L'exactitude s'évalue grâce aux trois séries de valeurs de la linéarité. L'étude statistique consiste à utiliser la méthode des taux de recouvrement. L'exploitation des résultats de l'exactitude se fait en vérifiant l'homogénéité des variances (avec un test de Cochran) et la validité des moyennes (avec un test de Fisher).

D'après les résultats obtenus en annexe 54 nous calculons les paramètres d'exactitude suivants.

Tableau 13 : Paramètres d'exactitude

Paramètres d'exactitude	Référence: étalon 100 %	Référence: droite de régression du PA seul	Valeur théorique à 5%
Test d'homogénéité des variances intragroupe (test de Cochran)	0,47 NS	0,55 NS	0,56
Test de validité des moyennes (test Fisher)	1,68 NS	0,187 NS	4,35
Moyenne des recouvrements	100,22	99,09	
Intervalle de confiance	2,71	3,24	

Tous les paramètres d'exactitude doivent être inférieurs à la valeur théorique. Ceci est vérifié dans le tableau 13.

Le seuils de détection et de quantification

Le seuil de détection est la plus petite quantité pouvant être détectée mais pas quantifiée comme valeur exacte.

La limite de quantification d'une procédure analytique donnée est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être quantifiée dans un échantillon, avec une exactitude et une fidélité appropriées. Le seuil de détection est donc toujours plus faible que le seuil de quantification.

Parmi les multiples approches possibles, c'est la méthode du rapport signal sur bruit qui a été choisie. On effectue une mesure du bruit de fond (amplitude maximale de la ligne de base). On estime que le signal correspond au produit recherché s'il est au moins supérieur à trois fois le bruit de fond.

D'après la Pharmacopée Européenne 4^e édition (2.2.46), cela signifie que

$$S/N = 3$$

$$\text{or } S/N = 2 \cdot H/h_n$$

$H = 3/2 \cdot h_n$

Donc le seuil de détection correspond à une hauteur :

La méthodologie qui permet de calculer le seuil de détection est la même. Toutefois, le signal obtenu doit être supérieur à dix fois le bruit de fond.

Donc le seuil de quantification correspond à une hauteur :

$$H = 5 \cdot h_n$$

Ces valeurs sont calculées à partir des formules données par la Commission de la SFSTP [Caporal-Gautier et al., 1992]:

$$\begin{aligned}SD &= 3 \times S/N \\SQ &= 10 \times S/N\end{aligned}$$

Le seuil de détection est à 0,147 µg/mL et le seuil de quantification est à 0,490 µg/mL. Le chromatogramme et le calcul du bruit de fond sont présentés en annexe 55.

Alors les différents tests statistiques sont jugés satisfaisants.

II.5. Etude de la pénétration cutanée

II.5.a L'absorption percutanée

Définition

Il s'agit du passage d'une molécule depuis son point d'application jusqu'à la circulation générale.

Le processus consiste en 3 étapes :

- la **libération** du principe actif de la forme galénique pour migrer dans la peau,
- la pénétration dans les différentes couches de l'épiderme, en particulier l'infiltration dans les glandes annexes de la peau et la traversée de la couche cornée, on l'appelle **phase de pénétration**,
- le transfert de la substance à travers le derme et l'hypoderme afin d'atteindre la circulation sanguine et lymphatique. C'est la **phase de résorption**. Le composé sera ensuite distribué dans tout le corps [Marty J.-P., 2001].

On souhaite soit que ces deux phases aient lieu afin d'obtenir une concentration sanguine qui entraîne une réponse pharmacologique générale soit que la phase de pénétration. Dans ce dernier cas le principe actif ne doit pas atteindre la circulation générale afin de conserver une action locale.

Les différentes voies de pénétration [Sellier M. et Martini M.C.; 1996]

Les glandes sudorales, les follicules pilo-sébacés et la barrière cellulaire cutanée offrent trois voies de pénétration différentes :

- *Pénétration à travers les glandes sudorales*

Elle est peu courante et indépendante du nombre de glandes par unité de surface. Lorsque la personne est en activité, l'activité des glandes sudoripares empêche ce type de pénétration par le flux de sueur.

- *Pénétration par voie transépidermique*

Ce type de pénétration se fait soit au niveau de l'espace intercellulaire soit à travers l'épaisseur des cellules (voir figure 39). Dans tous les cas, la molécule devra traverser le film hydrolipidique qui est à la surface de toute peau. La molécule active ne doit être ni trop hydrophile ni trop hydrophobe. La taille de la molécule a également une importance puisqu'elle conditionne la pénétration intercellulaire.

- *Pénétration par voie transfolliculaire*

L'appareil pilo-sébacé est, le plus souvent, le siège de la pénétration du médicament. Le canal pilo-sébacé contient une émulsion de sueur et de sébum qui favorise la dissolution de beaucoup de principes actifs et favorise leur absorption. L'utilisation d'excipients tels que des mouillants peut favoriser cette voie de pénétration.

Les différents facteurs influençant l'absorption percutanée [Sellier M. et Martini M.C.; 1996]

Ils peuvent être liés à la molécule, aux excipients ou à la peau elle-même :

- *Facteurs liés au principe actif*

Le coefficient de partage peau/excipient joue un rôle important. S'il est élevé, le principe actif aura plus d'affinité pour la peau que pour l'excipient et se libérera ainsi facilement de la préparation pour migrer vers la peau. Toutefois la molécule doit quand même avoir suffisamment d'affinité pour les excipients de sorte que la forme pharmaceutique reste stable. La solubilité : le principe actif doit être soluble dans l'excipient comme nous l'avons mentionné précédemment. Il faut donc un compromis entre cette solubilité et le coefficient de partage car si la solubilité (et donc l'affinité pour l'excipient) est trop grande, le principe actif quittera difficilement l'excipient.

On peut donc avoir plusieurs cas lors de l'étude de la pénétration cutanée d'un produit :

1^{er} cas : la substance est lipophile et diffuse bien dans la couche cornée mais s'y accumule.

2^{ème} cas : la substance est hydrophile et passe mal à travers l'épiderme mais se résorbe sans problème lorsqu'elle a passé cette barrière.

3^{ème} cas : la substance amphiphile passe très bien toutes les couches de la peau.

Dans le cas du sel disodique de quercétine, on est en présence d'une molécule présentant des groupements chimiques hydrophiles mais également lipophiles. En première approximation la molécule devrait pénétrer dans les couches superficielles de l'épiderme et s'y fixer. L'étude réalisée ci-après, *in vivo* et *in vitro*, devrait confirmer cette hypothèse.

La taille de la molécule : les grosses molécules ne pénètrent pas les membranes : la constante de diffusion doit être élevée et la masse moléculaire ne dépassant pas une valeur de l'ordre de 400.

- *Facteurs liés aux excipients*

La viscosité est importante :

- ☞ Si elle est trop faible, il risque d'y avoir des pertes lors de l'application cutanée,
- ☞ Si elle est trop élevée, la diffusion du principe actif sera trop difficile.

L'excipient doit être amphiphile afin de faciliter la pénétration. Certains excipients sont utilisés comme promoteurs d'absorption.

- *Facteurs liés à la peau*

L'intégrité de la peau : une altération de la couche cornée favorise la pénétration, cette dernière est variable en fonction de l'âge : les enfants ont une peau assez perméable ; la pénétration est très rapide. [De Belilovsky Clarence; 2001]

Le site d'application : le principe actif sera mieux absorbé aux endroits où la peau est fine. La présence d'un pansement et/ou la chaleur vont améliorer la pénétration.

II.5.b Choix de la méthode [Schmitt, 1995 ; Maibach et Wester, 1989]

Le phénomène de pénétration cutanée s'avère difficile à suivre et à quantifier. C'est ainsi que s'est développée une multitude de méthodes d'évaluations dont nous allons étudier les principes, les domaines d'application, les avantages et les inconvénients.

Méthodes in vivo

Ces méthodes sont, en théorie, les plus intéressantes car elles permettent la reproduction des conditions réelles d'utilisation du produit testé. Cependant, les protocoles expérimentaux sont souvent très lourds à mettre en oeuvre, en particulier lorsqu'ils entrent dans le cadre de la loi Huriet. Quelques unes de ces techniques sont des méthodes de base qui ont servi à établir les grands principes de l'absorption cutanée telles que la détermination de niveaux de perméabilité selon les molécules étudiées, l'influence des excipients dans les formulations. Il est donc intéressant de les connaître car elles sont souvent citées comme techniques de référence même si elles sont d'utilisation moins courante actuellement.

- *Méthode de Feldmann et Maibach* [Feldmann et Matbach, 1970]

Cette technique détermine l'absorption percutanée par mesure de la radioactivité retrouvée dans les excréta sur 5 à 7 jours consécutifs, après application d'une substance radio marquée sur une zone bien définie.

Cette technique a l'avantage d'être très sensible mais elle est très astreignante tant par la durée des études et contraignante par l'emploi de substances radioactives. Cependant, cette méthode est devenue une référence de l'absorption cutanée.

- *Méthode de Schaefer* [Schaefer et Lamaud, 1987]

Après application d'une molécule marquée sur une peau durant un temps donné, l'excès de substance est éliminé et la peau est excisée.

Sont ensuite étudiés: la couche cornée par strippings successifs dans différentes assises cellulaires, l'épiderme et le derme par des coupes successives (coupes parallèles à la surface

de la peau) de 10 à 40 micromètres d'épaisseur. La radioactivité est dosée séparément dans chaque partie, ce qui permet d'obtenir un véritable gradient de distribution de la substance dans les différentes couches de la peau.

Cette méthode a l'inconvénient d'être très invasive et d'utiliser des substances radioactives.

- *Méthode de la concentration plasmatique*

Elle fait partie des études pharmacocinétiques classiques et consiste à doser le principe actif dans le plasma après une application cutanée. Elle s'applique surtout en thérapeutique où elle reste décisive dans un dossier pharmaceutique pour prouver l'efficacité d'un médicament.

- *Méthode de Rougier et Dupuis: méthode des strippings* [Rougier et al., 1990]

Rougier et ses collaborateurs ont mis en évidence une relation linéaire entre la quantité d'une substance présente dans le stratum corneum (après une application de 30 min) et l'absorption complète de cette substance pendant 96 heures.

Cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide, peu invasive et peu astreignante pour les volontaires.

Méthodes utilisées in vitro

Suite aux difficultés rencontrées lors des études *in vivo*, les méthodes *in vitro* se sont développées. Ce sont des études préliminaires indispensables à l'évaluation de toute forme destinée à l'application sur la peau.

L'absorption percutanée est évaluée grâce à des cellules de diffusion du type cellule de Franz. Les cellules sont constituées de deux compartiments séparés par une membrane cutanée [Frantz, 1975]:

- un compartiment donneur dans lequel est déposée la substance à tester (incluse ou non dans une formulation) et appliquée sur la partie superficielle de la peau
- un compartiment receveur rempli d'un liquide où l'on dosera la substance qui aura traversé la membrane cutanée au cours du temps

D'autres modèles de type animal (peau du rat ou du cochon) peuvent être utilisés, mais les résultats risquent de ne pas être extrapolables chez l'homme.

A côté de ces modèles d'expérimentations *in vitro*, il existe également le travail sur des modèles de peaux humaines reconstituées obtenues par culture cellulaire.

Parmi tous les modèles et méthodes, nous avons choisi deux modèles de peau et une technique unique. La technique de bande de « stripping » est réalisée après application de la crème d'une part sur le bras d'un volontaire sain et d'autre part sur des modèles de peaux humaines reconstituées après culture et différenciation pendant 14 jours, produit par le laboratoire **SkinEthic** (Nice, France).

II.5.c Etude de la pénétration percutanée du sel disodique de quercétine

Objectifs

Après avoir formulé la crème contenant le sel disodique de quercétine, la pénétration de ce dernier à travers la peau humaine a été étudiée. En effet, étant donné que nous recherchons une application topique, il est nécessaire de vérifier que le principe actif de notre préparation

ne pénètre pas dans les couches profondes de la peau et, a fortiori, n'atteint pas la circulation sanguine : il s'agit d'un produit cosmétique et non pas d'un produit pharmaceutique à AMM.

Cette étude a été effectuée en utilisant la méthode des bandes de « stripping », après application avec un temps de contact fixe de 60 minutes, *in vivo*, sur une peau humaine et également, *in vitro*, sur une peau humaine reconstituée. Le suivi de la pénétration du composé actif de la crème s'est fait en dosant le sel disodique de quercétine récupéré sur chaque strip. Le dosage est réalisé par chromatographie liquide qui permet la quantification du sel disodique de quercétine ; cette méthodologie permet également le dosage éventuel du sel monosodique de quercétine et de la quercétine elle-même, ces deux composés pourraient être considérés comme des « métabolites » du sel disodique de quercétine.

Mise au point de la méthode d'extraction

Pour étudier la pénétration cutanée, nous avons choisi une méthode non invasive préconisée par la FDA [*FDA's Guidance for Industry*] : la méthode des « strippings ». Cette méthode est fréquemment utilisée pour prévoir le comportement de la molécule lors de l'application d'une crème [*Leena A et Nylander-French; 2001*].

- *Matériel*

- Bandes de « stripping » : bandes adhésives prédécoupées de 5 x 2 cm de la société 3M.
- Crème à base de sel disodique de quercétine formulée selon la formule donnée au paragraphe (II.1.c). Quantité déposée :
 - environ 150 mg exactement pesé pour 10 cm² de peau – étude *in vivo*,
 - environ 40 mg exactement pesé pour 4 cm² de peau reconstituée – étude *in vitro*.

- *Conditions d'application et de prélèvement*

- Etude *in vivo* :

La crème est appliquée sur le bras du sujet sur une surface correspondant à la surface de la bande de « stripping », délimitée au feutre (il a été vérifié que l'encre de ce feutre n'avait pas d'interférences avec les composés de la crème lors du dosage).

La crème est déposée sans masser la peau afin de ne pas favoriser la pénétration.

Après un temps de contact de 60 minutes, on prélève les 12 à 16 premières couches de cellules de l'épiderme par l'application d'une bande que l'on enlève ensuite (il faut appuyer assez fort puis tirer la bande d'un coup sec pour recueillir le plus de cellules possible de la couche épidermique)

- Etude *in vitro* :

Dans cette étude l'épiderme de la peau humaine est remplacé par l'épiderme de la peau reconstituée.

Le sel disodique de quercétine est ensuite extrait de la colle du « strip ».

- *Conditions d'extraction*

Une méthode d'extraction a été mise au point dont nous vérifions l'efficacité.

La méthode retenue est la suivante :

Solvant d'extraction : méthanol (volume 10 mL)

Récipient : tube à vis en verre d'une contenance de 15 mL

La procédure à suivre est décrite dans la figure 41 :

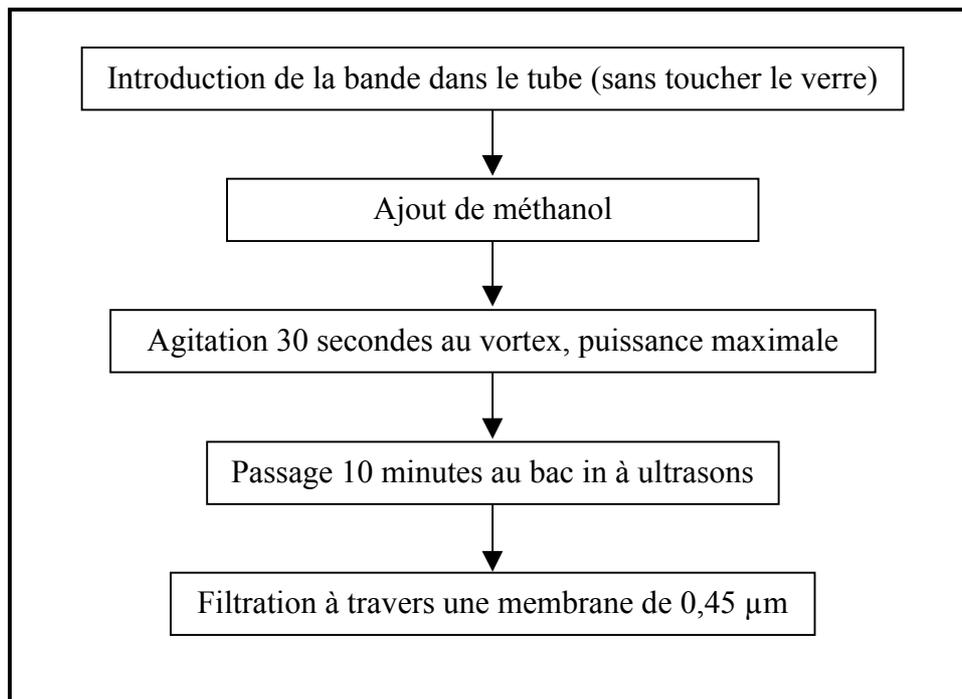


Figure 41 : Schéma représentatif du mode opératoire pour l'extraction des bandes de « stripping »

On obtient ainsi une solution limpide débarrassée :

- des **résidus des cellules épidermiques** : après le passage aux ultrasons, il ne doit rester que des débris cellulaires qui sont éliminés par la filtration.
- de **certain excipients de la crème** comme la cire blanche par exemple (qui pourrait boucher la colonne chromatographique) qui sont également éliminés par filtration.
- de **certaines constituants de la colle** de la bande « strip » éliminés encore une fois par filtration.

Les étapes de mélange et d'action des ultrasons servent essentiellement à séparer les différents composants du mélange.

Précautions : Le sel extrait des bandes dans du méthanol est repris, après évaporation sous vide (speedvac, de Savant Technologies), dans le mélange eau/méthanol (99/1, V/V).

La solution est ensuite analysée par chromatographie liquide. Les conditions de l'analyse chromatographique sont données à la page 103.

Avant d'utiliser cette méthode d'extraction pour la réalisation de l'étude de pénétration cutanée, il faut vérifier sa validité.

- *Vérification de l'efficacité de la méthode d'extraction*

Il s'agit de vérifier que la méthode d'extraction permet bien de récupérer tout le sel qui a été déposé sur la bande.

Il faut toutefois vérifier au préalable que les composants présents dans la colle de la bande de stripping n'interfèrent pas lors du dosage. Il en est de même pour les constituants du milieu de culture pour les essais réalisés sur la peau reconstituée.

Réalisation d'un blanc

On réalise l'extraction sur une bande de stripping qui n'a été en contact ni avec la peau, ni avec la crème.

L'analyse chromatographique donne un chromatogramme sur lequel on n'observe aucun pic entre 0 et 20 minutes à une longueur d'onde de 353 nm.

Les constituants de la colle de la bande de stripping n'ont donc aucune influence sur le dosage du sel disodique de quercétine.

De même on réalise l'extraction de 5 mL de milieu de culture. L'analyse chromatographique donne un chromatogramme sur lequel on n'observe aucun pic entre 0 et 20 minutes à une longueur d'onde de 353 nm.

Les constituants du milieu de culture n'ont donc aucune influence sur le dosage du sel disodique de quercétine.

On peut donc vérifier la validité de la méthode.

Test de validité de la méthode d'extraction

On réalise en parallèle deux échantillons :

1^{er} échantillon : 0,15 g de crème dans 10 mL de méthanol (2 solutions différentes)

2^{ème} échantillon : 0,15 g de crème étalée sur une bande de stripping, dans 10 mL de méthanol (2 solutions différentes)

Ces deux échantillons sont traités avec la même méthode d'extraction décrite dans la figure 41, page 117. Les solutions récupérées après filtration sont diluées dans un mélange eau/méthanol (99/1, V/V) puis analysées par CLHP.

Résultats

Tableau 14 : Pourcentage de perte

	Echantillon n°1	Echantillon n°2
Aire moyenne du pic	4491770	4381048
Pourcentage de différence	2,4%	

La méthode d'extraction permet de retrouver 97,6% de ce qui a été déposé sur la bande. 2,4 % de perte lors de l'extraction est un très bon résultat, dont il faudrait éventuellement tenir compte lors des calculs de teneur pour l'analyse des « strips ».

La méthode est donc satisfaisante et ne nécessite pas d'être optimisée : ce protocole d'extraction sera utilisé lors du dosage du sel disodique de quercétine dans l'étude de la pénétration cutanée après application de la crème.

Dans un contexte de bonne pratique de laboratoire, un protocole opératoire est rédigé (annexe 56).

Etude de la pénétration cutanée in vivo

• *Méthode*

Après l'application de 0,15 g de crème sur le bras d'un volontaire sain et après une heure de contact, 6 séries de 8 à 16 prélèvements (16 couches correspondant à plus de 50% de l'épiderme) sont réalisées. Les bandes de « stripping » récupérées sont traitées par la méthode d'extraction décrite et validée précédemment. Les dosages sont réalisés dans les mêmes conditions chromatographiques décrites et validées dans ce chapitre.

• *Résultats*

Les résultats sont exprimés en quantité de sel par unité de surface pour chaque bande de stripping et sont présentés en annexe 57. Le diagramme suivant montre la distribution de notre molécule dans les différentes couches de l'épiderme.

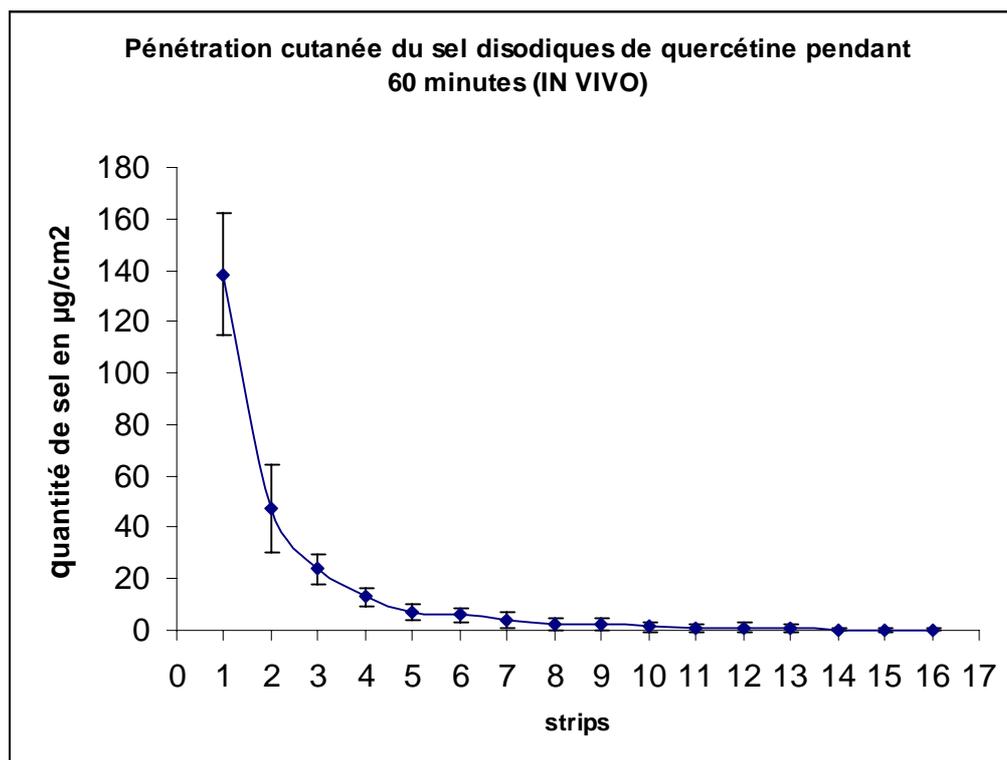


Figure 42: Profil de distribution dans les couches supérieures de la peau du sel disodique de quercétine (moyenne ± écart type de 6 séries différentes)

• *Discussion*

Nous observons une cinétique exponentielle avec des écarts-types assez faibles ce qui dénote d'une bonne répétabilité des résultats (la variabilité intra-individuelle est faible).

La première bande ne correspond pas à la première couche de cellules mais aussi à la fine couche de crème qui reste à la surface et sèche pendant les 60 minutes de l'exposition. Cependant une partie de la couche la plus externe de l'épiderme se trouve sur ce premier strip. C'est pour cette raison que l'écart-type est beaucoup plus important que pour les autres bandes (Figure 42).

On en déduit que le sel disodique de quercétine présente une pénétration rapide mais que la majeure partie du sel reste dans les couches superficielles de l'épiderme.

D'après les calculs, (annexe 57), $84 \pm 3\%$ de la quantité totale déposée a été récupérée. La différence est peut être due à une diffusion latérale du produit [Reddy M.B. *et al.*, 2002].

La cinétique ainsi observée répond à nos attentes : une forte pénétration dans les couches superficielles de l'épiderme de la peau et une quasi biodisponibilité nulle (passage dans le sang) ; cette situation est celle de la définition d'un produit cosmétique. Ce résultat est extrêmement intéressant puisqu'il démontre qu'il est **possible d'utiliser cette crème pour un usage topique**.

Etude de la pénétration cutanée in vitro

• Méthode

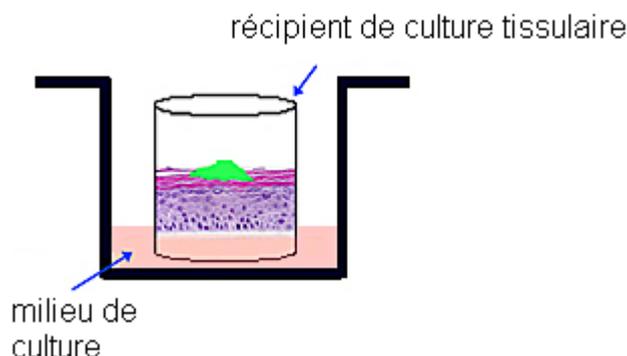


Figure 43 : Culture du tissu de la peau humaine reconstituée

La culture de la peau humaine s'effectue dans des puits, comme le montre la figure 43. Au quatorzième jour, l'épiderme de la peau est complètement constitué et mesure 4 cm^2 de surface. L'application de 40 mg de crème contenant 2% du sel disodique de quercétine est réalisée sur ce tissu d'une manière homogène. Après un contact de 60 minutes à 37°C , des « strippings » successifs ont permis le prélèvement des 13 couches de l'épiderme de la peau reconstituée. Ces bandes ont ensuite été analysées par extraction du sel et analyse en CLHP.

Le même protocole utilisé pour réaliser l'étude *in vivo* (annexe 56), a donc servi pour l'étude de la pénétration cutanée du sel disodique de quercétine à travers la peau reconstituée.

Par contre, quelques précautions sont prises durant cette étude. En fait, en appliquant la bande de « stripping », il faut éviter de déchirer le tissu. Ensuite, la quantité de la crème appliquée étant faible (40 mg au lieu de 150 mg utilisées *in vivo*) les extraits obtenus (10 mL de

méthanol) sont évaporés et repris par 5 mL eau/méthanol (99/1, V/V) pour les trois premiers strips et par 2 mL du même mélange pour les strips suivants.

• *Résultats et Discussion*

Dans ce cas, six séries de 13 couches sont analysées. Les résultats obtenus sont résumés dans l'annexe 58 et sont présentés dans la figure 44:

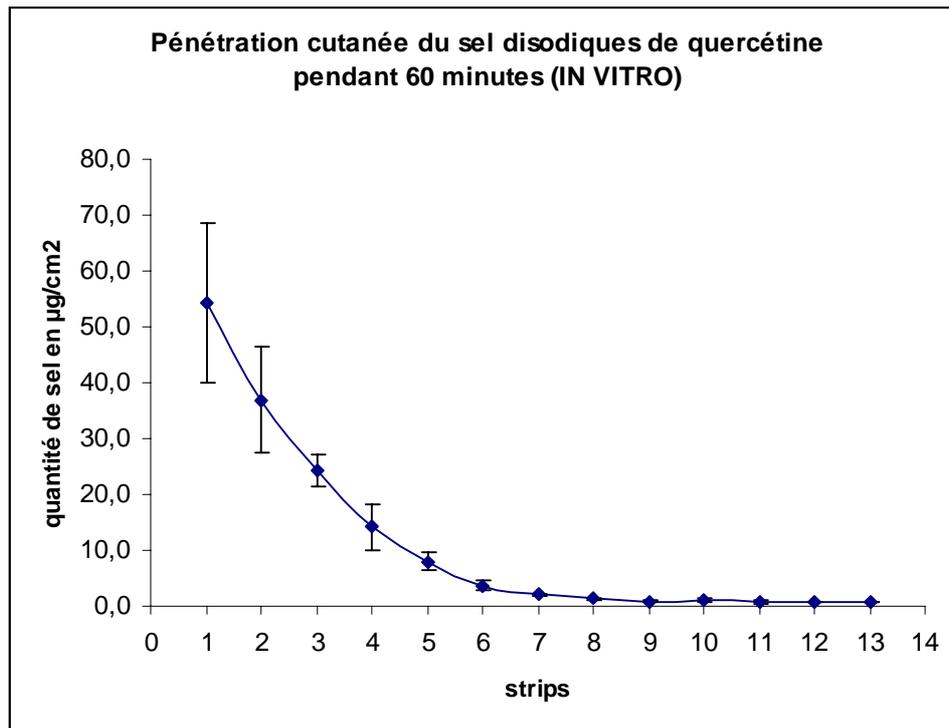


Figure 44: Profil de distribution dans les couches de la peau synthétique du sel disodique de quercétine (moyenne ± écart type)

Les résultats obtenus montrent que le sel disodique de quercétine diffuse rapidement dans les couches superficielles de l'épiderme. En associant le pouvoir de capture des radicaux libres du sel disodique de quercétine, on peut concevoir le potentiel protection de ce sel vis-à-vis des agressions de la peau par différents facteurs externes. D'autre part, il a été démontré que la quercétine à pH alcalin s'accroche au sein des bicouches lipidiques membranaires avec ses sites ionisés [Movileanu et al.; 2000]. Ceci peut expliquer le fait que le sel disodique n'atteint pas le derme et par conséquent reste au niveau de l'épiderme.

D'après les calculs présentés à l'annexes 58, nous retrouvons une récupération moyenne de $78,1 \pm 10$ % de la quantité déposée. Ceci peut être dû à la faible quantité appliquée initialement.

Ces résultats nous permettent non seulement de vérifier *in vitro* ce qui a été observé *in vivo*, mais aussi nous permet de mettre au point une nouvelle méthodologie utilisant la peau reconstituée en comparant les deux résultats qui sont cohérents. Dans les deux cas le sel

pénètre jusqu'à la sixième couche où la pénétration devient difficile. En plus, dans le cas de la deuxième couche, les quantités retrouvées sont pratiquement égales *in vitro* et *in vivo*. La pénétration *in vitro* est plus homogène qu'*in vivo*. Ceci semble cohérent puisque les couches épidermiques chez un homme sont plus complexes et moins organisées (agressions extérieures en permanence) que celles d'un morceau de peau mis en culture dans un laboratoire.

III. Conclusion

Un intérêt grandissant se porte sur les molécules à activité antioxydante et particulièrement sur les flavonoïdes parce que ce sont des substances naturelles d'origine végétale faisant partie de notre alimentation quotidienne.

Les flavonoïdes ont fait la preuve de nombreux effets biologiques qui semblent provenir de leurs propriétés antioxydantes. Parmi eux, la quercétine fait l'objet, depuis plusieurs années, d'études qui ont prouvé son pouvoir de capture des radicaux libres.

L'objectif de cette étude a été de formuler une crème à base de sel disodique de quercétine à visée anti-vieillesse pour la peau, tout en vérifiant sa biodisponibilité par l'intermédiaire d'une étude de stabilité et d'une étude de pénétration cutanée. Les résultats de ces études nous permettent de dire que le sel disodique de quercétine est stable, et que la molécule observe une cinétique qui correspond à l'utilisation d'une crème pour usage topique, c'est-à-dire qu'elle diffuse rapidement dans l'épiderme sans passer ni dans le derme ni dans la circulation générale.

II- ABSORPTION INTESTINALE

Le tube digestif est l'organe spécialisé dans l'absorption. Les aliments y sont digérés et réduits à l'état de nutriments plus facilement absorbables. Le tube digestif est également une des barrières de défense vis à vis des composés étrangers ou «xénobiotiques », dont font partie les médicaments. Les xénobiotiques subissent, en plus de l'action des enzymes de la flore intestinale et des sucs digestifs, l'action d'enzymes présentes dans les entérocytes de la muqueuse tapissant l'intérieur du tube digestif. Ces enzymes appartiennent au métabolisme de phase I (oxydation, réduction et hydrolyse) et de phase II (conjugaisons) et vont rendre les xénobiotiques plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminables par les reins, le foie ou le tube digestif lui-même.

La muqueuse intestinale est donc un lieu privilégié de passage transmembranaire et de métabolisme des xénobiotiques.

Les mécanismes d'absorption se font selon quatre voies: Transport actif, Filtration, Pinocytose, mais surtout Diffusion Passive.

I. Généralités

I.1. Rappels sur le tractus intestinal

Le tractus digestif s'étend de la bouche à l'anus (Figure 45).

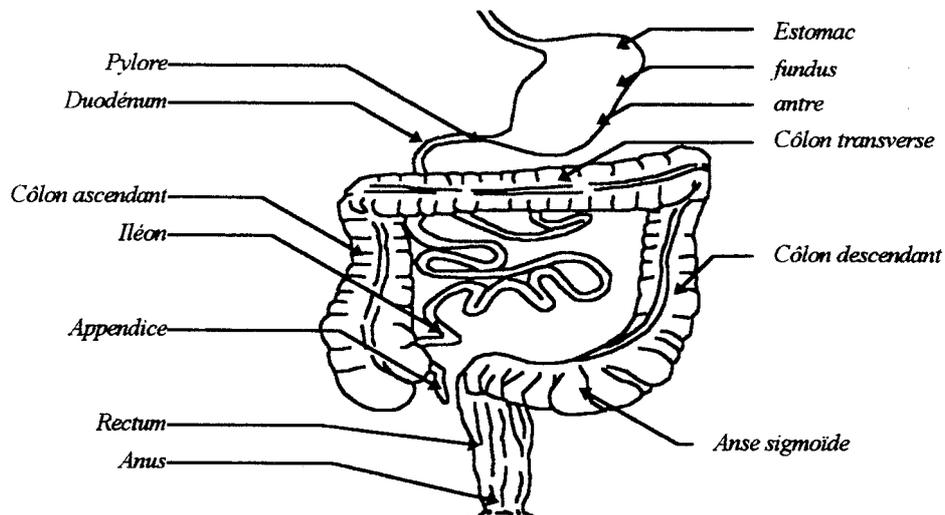


Figure 45. Anatomie du tractus digestif

I.2. Mécanismes de passage intestinal d'une substance pharmacologique [Nellans H.N., 1991 ; Labaune J.P., 1984]

L'absorption d'une substance pharmacologique à travers les muqueuses du tractus gastro-intestinal ne suit pas la route la plus courte mais le chemin présentant le moins de résistance. Le chemin est déterminé d'une part par les propriétés physico-chimiques de la substance diffusante (pK_a , lipophilie) et d'autre part par la composition et l'organisation des différentes phases rencontrées durant l'absorption.

L'absorption s'effectue par deux voies possibles (Figure 46):

- La voie paracellulaire, qui emprunte les jonctions serrées des cellules de l'épithélium. (2)
- La voie transcellulaire, qui utilise:
 - la diffusion passive avec solubilisation dans la membrane (1),
 - la diffusion passive à travers des pores, (filtration),
 - la diffusion facilitée (3),
 - le transport actif (5),
 - l'endocytose (4),

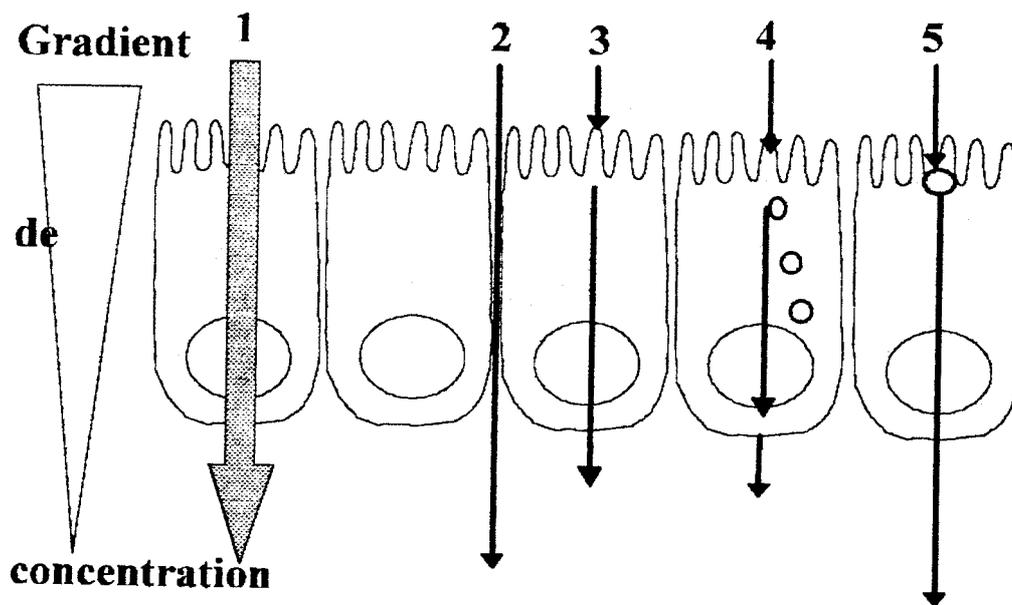


Figure 46. Les voies de passage à travers l'épithélium intestinal

Schématiquement, l'épithélium intestinal peut être assimilé à un circuit électrique constitué de résistances en parallèle et en série (Figure 47).

Les deux voies de passage peuvent être représentées par une résistance transcellulaire (R_t) en parallèle avec la résistance de la voie paracellulaire (R_p). R_t et R_p sont constituées de deux résistances en série. R_t est la somme des résistances des membranes apicale (R_a) et basolatérale (R_b) ; R_p est la somme des résistances de la jonction serrée (R_j) et du milieu extracellulaire (R_e).

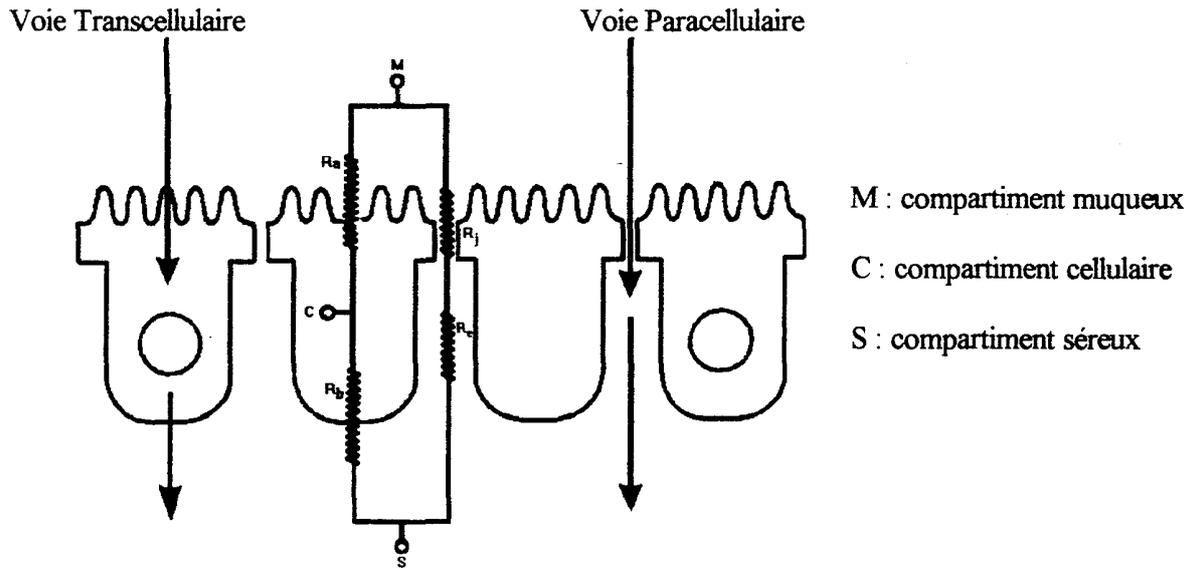


Figure 47 : Considérations électrophysiologiques du passage à travers l'épithélium intestinal [Powell D.W., 1981].

Selon Powell, la résistance totale d'un épithélium est égale à :

$$R_{tot} = \frac{R_t \cdot R_p}{R_t + R_p} \quad \text{Equation n° 5}$$

La résistance, et donc la perméabilité, varie d'un épithélium à l'autre. Ces variations reflètent plus la différence dans le nombre de canaux paracellulaires disponibles que dans la variation de la taille des canaux. On distingue trois catégories d'épithéliums au niveau du tractus digestif selon la partie considérée épithélium « lâche », « modérément lâche » et serré (leaky membrane, tight membrane).

Les épithéliums « lâches », les plus perméables, sont ceux trouvés dans l'intestin grêle et la vésicule biliaire qui ont une R_{tot} inférieure à $1000 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ et une R_t nettement inférieure à R_p . Le côlon et l'antre gastrique ont des épithéliums « modérément lâches ou serrés » avec une R_{tot} inférieure à $1000 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ et une R_c légèrement supérieure à R_p . L'oesophage et le fundus gastrique ont des épithéliums « serrés » avec une R_{tot} supérieure à $1000 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ et une R_t supérieure à la R_p . La perméabilité serait plus importante au niveau de l'intestin grêle (< leaky membrane ») qu'au niveau de l'estomac ou du côlon (< tight membrane »).

I.2.a Mécanismes de passage transcellulaire [Elisa T. et al., 2003]

La voie transcellulaire possède deux barrières physiques : la membrane apicale et la membrane basolatérale. Le passage d'une molécule médicamenteuse à travers les membranes du tractus gastro-intestinal peut s'effectuer suivant différents mécanismes. Le mécanisme de passage peut être passif ou actif.

Absorption passive

- La diffusion

C'est le mode de passage le plus emprunté par les médicaments. Elle se fait toujours selon le sens du gradient de concentration existant de part et d'autre de la membrane : de la région la plus concentrée vers la région la moins concentrée. Mais, pour que les molécules traversent la membrane biologique, cela suppose qu'elles puissent se dissoudre dans les constituants membranaires et possèdent donc une certaine lipophilie. Le rôle de la membrane est passif même si la structure interne peut moduler le temps de passage transmembranaire. En théorie, ce passage s'effectue suivant le gradient de concentration jusqu'à l'atteinte d'un équilibre entre les deux côtés de la membrane. La vitesse de diffusion (et donc le temps nécessaire pour atteindre cet équilibre) obéit à la loi de Fick (Eq.6):

$$V = \frac{dQ}{dt} = \frac{D.S.K.(C_{ext} - C_{int})}{E} \quad \text{Equation n° 6}$$

V = Vitesse de passage de la substance à travers la membrane (mg.cm⁻².h⁻¹)

C_{ext} - C_{int} est le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane (g/cm³) et si l'on pose P = Constante de perméabilité (cm.h⁻¹) où:

$$P = \frac{D.S.K}{E} \quad \text{Equation n° 7}$$

E = Épaisseur de la membrane (cm)

K = Coefficient de partage du soluté entre solvant et membrane

D = Coefficient de diffusion du principe actif (cm².h⁻¹)

S = Surface de la membrane (cm²)

alors:

$$V = P(C_{ext} - C_{int}) \quad \text{Equation n° 8}$$

La diffusion passive dépend donc essentiellement des propriétés physicochimiques de la molécule considérée, notamment de sa solubilité, de sa taille et de son *pKa*.

En pratique l'équilibre n'est jamais atteint dans l'absorption des médicaments car ceux-ci sont entraînés par le flux sanguin. Le gradient de concentration est donc toujours maintenu en faveur du transfert du lumen vers la circulation sanguine (C_{int} toujours négligeable devant C_{ext}). La vitesse sera donc toujours proportionnelle à K exception faite pour les petites molécules (diffusion par les pores en plus) et les molécules très grosses et très lipophiles (trop d'affinité pour les membranes).

La diffusion passive ne nécessite aucun apport d'énergie extérieure, elle n'est pas saturable et ne peut être inhibée ou induite par d'autres molécules [Houin G., 1990].

Étant donné que seule la fraction non ionisée et liposoluble du médicament peut traverser la membrane, le pH du milieu digestif joue un rôle très important, car il détermine le degré d'ionisation des molécules et donc la fraction directement à même de traverser les membranes. (La forme ionisée et non ionisée étant en équilibre et la fraction non ionisée disparaissant progressivement, l'équilibre se déplacera néanmoins).

Une base faible sera mieux absorbée à pH alcalin tandis qu'un acide faible sera mieux absorbé à pH acide. Toutefois, l'absorption est un phénomène dynamique dans lequel interviennent des facteurs physiologiques qui peuvent contrebalancer l'effet du pH, par exemple la vidange gastrique, la motilité intestinale et le débit sanguin.

- La filtration

Bon nombre de petites molécules hydrophiles ne respectent pas les règles classiques de partage entre une phase aqueuse et une phase lipidique. Elles traversent les membranes plasmiques plus rapidement que ne le laisse prévoir leur coefficient de partage. Pour expliquer ce phénomène, les biologistes ont souvent évoqué la présence de pores au niveau de la membrane. Les pores seraient constitués par des protéines traversantes présentant un canal central.

Ces pores étant relativement petits, seule l'eau et les substances hydrosolubles de poids moléculaires inférieurs à 150 pour les molécules sphériques ou inférieurs à 400 pour les composés à chaîne linéaire pourraient emprunter ces canaux.

- La diffusion facilitée

Il s'agit d'une diffusion nécessitant un transporteur. Celle-ci continue à obéir aux lois des gradients électrochimiques et ne nécessite aucune dépense d'énergie. C'est donc une diffusion passive. Le fructose (transporteur Glut-5), l'arginine (transporteur Y+) et les amines primaires (sérotonine, tyramine, ...) seraient concernés par cette voie de passage.

Absorption active [Ubeaud G., 2001]

La caractéristique de l'absorption active est qu'elle peut se faire contre un gradient électrochimique. Elle nécessite un transporteur et de l'énergie fournie par hydrolyse de l'ATP (ATPase membranaire). Le transporteur est un constituant membranaire capable de former avec la molécule un complexe sur un des pôles de l'entérocyte. Le complexe traverse la membrane et la molécule est libérée à l'autre pôle tandis que le transporteur retourne vers son pôle d'origine.

Il existe des transporteurs d'influx impliqués dans l'absorption des médicaments. Les plus marquants sont : i) Le PepT₁ qui assure le transport des β lactamines, des oligopeptides et dipeptides ; ii) les transporteurs d'anions organiques dépendant du sodium (Ntcp = Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide) et indépendant de sodium (Oatp = organic anion transporting polypeptide et Oat = organic anion transporting) ; iii) les transporteurs de cations organiques (Oct) ; iv) les transporteurs d'acides aminés ; v) les transporteurs d'acide carboxylique et vi) les transporteurs du glucose (SGLT-1).

Il existe également des transporteurs d'efflux qui font ressortir les molécules substrats du côté apical vers la lumière intestinale. Ces transporteurs appartiennent à la famille des ABC (ATP Binding Cassette). On distingue : i) les P-glycoprotéine (P-gp). La P-gp est une glycoprotéine membranaire de 170 KDa qui est impliquée dans le transport de la cyclosporine A, de la vinblastine, du taxol, du tamoxifène, de la progestérone, des phénothiazines, etc. Une modification de cette protéine serait à l'origine de la résistance pléiotrope des cellules cancéreuses aux anticancéreux. Cette P-gp rejette systématiquement tous les médicaments cytotoxiques et confère ainsi le phénotype cellulaire de résistance à de nombreux médicaments (MDR = Multi Drug Resistance) ; ii) les protéines d'efflux des sels biliaires, BSEP ou SPgp ; iii) les protéines de la sous-famille des MRP (Multi Drug Resistance Protein). Le MRP est une glycoprotéine membranaire de 190 KDa qui est exprimée du côté apical des entérocytes au niveau des microvillosités de la bordure en brosse. Elle permet la sécrétion de dérivés conjugués anioniques hors des cellules.

La Pinocytose et la phagocytose

La pinocytose est un processus propre à l'absorption des lipides. La membrane cellulaire s'invagine pour enfermer la gouttelette de liquide extracellulaire dans une vacuole intracellulaire qui traverse la cellule et vient s'accoler à la membrane au pôle basolatéral de l'entérocyte.

On parle de phagocytose lorsque la paroi s'invagine pour absorber des particules solides.

I.2.b Mécanismes de passage paracellulaire

La voie paracellulaire emprunte les espaces intercellulaires qui forment des sortes de canaux entre les cellules. Elle possède deux barrières physiques : la jonction serrée et le milieu extracellulaire.

Cette voie est utilisée pour le passage de certaines molécules ionisées. Le rôle possible de cette voie dans le passage de molécules non chargées et en particulier des formes non ionisées des électrolytes faibles, n'a pas été complètement exploré mais les résultats disponibles tendraient à montrer que la contribution paracellulaire pour ces espèces est habituellement faible et peut être considérée comme négligeable par rapport au passage transcellulaire.

La perméabilité des ions vis à vis du passage paracellulaire dépendrait, d'une part des forces d'interaction entre l'ion et les charges fixées sur le canal ou les sites polaires du canal. De fortes interactions favoriseraient l'entrée dans le canal et augmenteraient la perméabilité. D'autre part, la perméabilité dépendrait du diamètre du canal. Si l'ion est trop gros, il ne pourra pas passer par cette voie.

II. Choix de la méthode d'étude de l'absorption intestinale du sel disodique de quercétine

Dans l'industrie pharmaceutique, il est très important de connaître le plus tôt possible dans le développement des molécules candidates au rang de médicament leurs propriétés pharmacocinétiques, et plus particulièrement, leurs mécanisme d'absorption après administration orale.

Les études d'absorption nécessitent différentes approches expérimentales mettant en place des modèles *in vitro* et *in vivo*.

II.1. Description des modèles expérimentaux d'absorption intestinale

Des modèles sont utilisés comme outils de recherche pharmacologique et pharmacocinétique permettant :

- d'estimer et d'optimiser la biodisponibilité orale de nouvelles molécules,
- d'étudier les mécanismes de transport et de métabolisme intestinal,
- de mettre en évidence un site préférentiel d'absorption,
- d'optimiser les conditions de transport.

II.1.a Modèles *in vivo* / *ex vivo*

Modèle *in vivo*

Il consiste à doser le principe actif et/ou ses métabolites dans le plasma après administration du médicament par voie orale et par voie intraveineuse à différents intervalles de temps.

Modèles *ex-vivo*

Différents modèles animaux sont utilisés :

- Intestins isolés perfusés.
- Tranches intestinales « intestinal slices » en chambre bicompartimentale d'incubation.
- Sacs inversés d'intestin de rats « everted gut ».
- Anneaux intestinaux « intestinal rings » ou Boucles intestinales « intestinal loops ».

II.1.b Modèles *in vitro*

Nous distinguons les modèles suivants :

- Vésicules de membrane de bordure en brosse « brush border fraction ».
- Cultures cellulaires:
 - Les entérocytes
 - Lignées cancéreuses d'adénocarcinomes humain de côlon comme les Caco-2.

II.2. Conclusion

Afin de bien mener nos études d'absorption intestinale, nous avons privilégié le modèle de culture de cellules intestinales humaines type Caco-2.

Trois critères importants ont conditionné ce choix:

- Critère technique: notre objectif étant d'étudier le mécanisme de passage du sel disodique de quercétine à travers l'épithélium de la membrane intestinale et la biodisponibilité en terme de quantité absorbée et de vitesse, le modèle des Caco-2 est adapté. En effet, ce modèle est simple à mettre en œuvre. Il a été montré que les Caco-2 permettaient de prédire les valeurs de biodisponibilité et les mécanismes de transports de molécules nouvelles. Les modèles *ex vivo* comme les sacs intestinaux inversés de rats pourraient être utilisés car l'intégrité membranaire est préservée et qu'il est plus proche de la situation *in vivo*. Cependant ce modèle n'est applicable que pour des animaux.

Les résultats obtenus sur les modèles *in vitro* devront être complétés par des études *in vivo* chez l'homme afin de valider nos résultats.

- Critère économique : le laboratoire dispose d'un département de culture cellulaire adapté à cette méthode.
- Critère éthique.

D'après les données de la littérature, ce modèle semble un moyen technique adapté et efficace pour connaître précocement les propriétés pharmacocinétiques d'absorption des médicaments en développement.

Une fois la méthode d'étude de l'absorption des médicaments choisie (culture d'une lignée de cellules intestinales humaines Caco-2), il faut choisir un certain nombre de paramètres:

La sélection de la lignée cellulaire dans le but de mimer avec succès la barrière intestinale en culture *in vitro* est fondamentale.

Les propriétés de transport et de métabolisme des lignées dépendent du fait qu'il s'agisse de cultures primaires ou de lignées transformées du nombre de passage des cellules, de leur stabilité phénotypique, de l'hétérogénéité de la lignée et de la capacité de ces lignées à se différencier.

Une fois la lignée choisie, ces propriétés dépendront de la densité d'ensemencement du fait qu'elles atteignent ou non la confluence, de l'état de différenciation cellulaire et de la présence ou de l'absence de certains nutriments essentiels

Durant les expériences de transport, les propriétés de la lignée peuvent varier selon la composition du milieu (concentration du soluté, de la température, du pH, de la présence ou de l'absence d'une source énergétique indispensable au métabolisme (glucose, pyruvate) ou d'ions, de la présence ou de l'absence de protéines avec lesquelles pourraient se lier les molécules étudiées, de la présence ou de l'absence de molécules compétitrices).

Les propriétés varient également selon qu'on ajoute le soluté dans le compartiment supérieur des nacelles (compartiment muqueux ou apical) ou dans le compartiment inférieur (séreux ou basolatéral).

Tous ces facteurs doivent être particulièrement optimisés afin d'obtenir le meilleur modèle.

Le succès du modèle repose également sur le choix de la membrane microporeuse sur laquelle vont s'attacher et se développer les cellules. Idéalement, cette membrane doit être suffisamment translucide pour que puisse être vérifié au microscope le bon développement de la membrane cellulaire et doit être directement perméable aux solutés hydrophiles et lipophiles, de bas et haut poids moléculaires.

De nombreuses membranes microporeuses sont actuellement disponibles, de nature différente (polycarbonate, polyester, ...), de différentes surfaces, de différentes tailles de pores et avec ou sans matrice. Le choix de ces critères doit être réfléchi pour éviter des artefacts ; il faut que la diffusion à travers la membrane microporeuse ne soit pas le facteur majoritaire dans la diffusion globale à travers le système de muqueuse modélisée.

Parmi différentes souches, la souche Caco-2 est de loin la plus documentée.

Ses caractéristiques histologiques font d'elle la lignée la plus adaptée aux besoins de ce modèle d'absorption. Elle forme spontanément une monocouche en quelques jours, présente une différenciation semblable à celle des cellules épithéliales intestinales (dômes, polarisation, bordure en brosse, jonctions serrées), possède un métabolisme proche de ces cellules et se cultive sans difficulté particulière (pas de nutriments spécifiques). Selon *Audus (1990)*, le modèle d'absorption intestinale est donc plus pertinent s'il emploie des Caco-2.

III. Etude expérimentale

III.1. Matériels et Méthodes

III.1.a Modèle Caco-2

Culture Caco-2

La lignée Caco-2 provenant de la Collection Européenne de Cultures Cellulaires est cultivée dans le milieu de culture DMEM GIBCO supplémenté de 1% d'acides aminés non essentiels (NEAA) 100X GIBCO, de 1% de pénicilline/streptomycine GIBCO et de 10% de sérum de veau fœtal GIBCO. L'ensemble est placé à 37°C dans un incubateur (FORM SCIENTIFIC CO₂ Water jacketed incubator) sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Le milieu de culture est remplacé trois fois par semaine durant 3 semaines. L'étude de transport peut à ce moment être réalisée.

Méthode de transport

Les cellules à la densité de 1.10^5 cellules/cm² sont mises en culture sur une membrane semi-perméable en polycarbonate placée dans des puits (boîte de 12 puits SNAPWELL^R), de 1 cm² de surfaces et dont les pores font 0,4 µm de diamètre (*Figures 48 et 49*).

Les compartiments basolatéraux (côté séreux) et apicaux (côté muqueux) contiennent respectivement 1,5 mL et 0,5 mL de milieu de culture qui est aussi remplacé trois fois par semaine.

Une fois les cellules à confluence, elles sont pré-incubées dans du milieu HBSS GIBCO ajusté à pH 7,4 contenant du tampon Hépès SIGMA et du D-glucose anhydre (AVOCADO) dans un incubateur TITRAMAX 1000.

Après 1 heure de pré-incubation, ce milieu est remplacé par du tampon HBSS contenant la ou les molécules à tester aux concentrations souhaitées dans le compartiment donneur (apical dans le cas d'une étude de A vers B, ou basolatéral dans le cas d'une étude de B vers A) et par du tampon HBSS seul dans le compartiment receveur.

Aux différents temps (30, 60, 90 et 120 minutes), des échantillons de 200 µL sont prélevés dans chaque compartiment puis le même volume de milieu frais est rajouté.

L'effet de dilution est pris en compte pour déterminer la quantité absorbée.

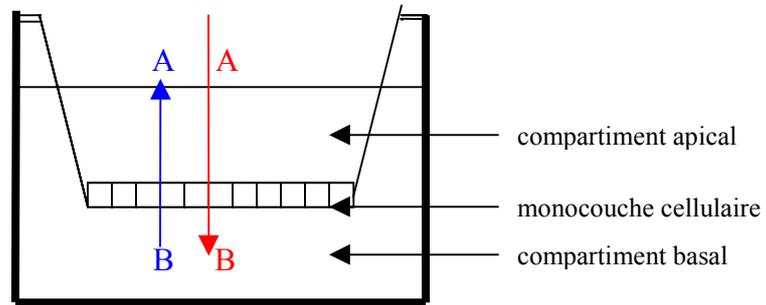


Figure 48. Représentation d'un puits employé pour l'étude de transport



Figure 49. Puits employés pour l'étude de transport

Intégrité des couches cellulaires

Afin de vérifier la cohésion de la monocouche cellulaire, le $[H]^3$ -mannitol, molécule hydrosoluble de faible poids moléculaire, est utilisé comme marqueur de passage paracellulaire.

Le mannitol est quantifié par un compteur à scintillation PACKARD Tri-Carb 2100 TR après addition de liquide de scintillation PACKARD.

Le passage transcellulaire est déterminé à partir de la perméabilité apparente (P_{app}) (cm /sec) qui est calculée à l'aide de l'équation d'ARTURSSON :

$$P_{app} = \Delta Q / \Delta t * (V/A.C_0)$$

Avec $\Delta Q/\Delta t$: taux de perméabilité (mol/sec)
V : volume du compartiment receveur (mL)
A : surface de la membrane (cm²)
Co : concentration initiale dans le compartiment donneur (mol/mL)

L'intégrité de la monocouche cellulaire est vérifiée pour une perméabilité apparente inférieure à 1.10^{-6} cm/sec.

Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford [Bradford M., 1976].

- Extraction

Les protéines totales sont extraites à 4°C à l'aide d'un volume de 1 mL de méthanol. La membrane de polycarbonate est finement ciselée de son support à l'aide d'un scalpel, l'ensemble membrane et méthanol est récupéré dans un tube eppendorf. La membrane subit un broyage à l'aide d'un cône stérile, suivie d'une homogénéisation dans un bain à ultrasons. L'ensemble est ensuite centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes.

- Dosage

En résumé, à 500 µL de surnageant est ajouté 4500 µL de Bleu de Coomassie Brillant G-250. L'absorbance est mesurée à 595 nm. La détermination de la teneur en protéines totales se fait face à une gamme d'étalonnage de BSA (sérum albumine bovine) allant de 0 à 500 µg/mL (annexe 59). En moyenne, nous avons trouvé $0,114 \pm 0,025$ mg de protéines par insert (annexe 59).

III.1.b Méthodes analytiques

Le sel disodique de quercétine est analysé par chromatographie liquide selon les conditions chromatographiques précédemment décrites à la page 103.

Validation de la méthode d'extraction

Afin de récupérer le sel disodique de quercétine à partir des différentes solutions prélevées (compartiment A ou B), un protocole d'extraction est mis au point et validé. 2 séries de 3 solutions de 100 µM de sel disodique de quercétine sont préparées. Une des deux séries subit le traitement suivant : 200 µL de chaque solution sont évaporés sous vide (speed vac) à température ambiante. Le précipité obtenu est repris avec du méthanol puis filtré, et après une deuxième évaporation le contenu du tube est dissous dans 200 µL d'un mélange eau/méthanol (99/1, V/V). La deuxième série servira de témoin.

Les six solutions ainsi préparées sont analysées dans CLHP.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Taux de recouvrement de la méthode d'extraction

	Echantillon témoin	Echantillon traité
Aire moyenne du pic	1461934	1449547
Pourcentage de différence	0,85 %	

La méthode d'extraction permet de retrouver 99,15% après évaporation. 0,85 % de perte lors de l'extraction nous permet de considérer que cette méthode d'extraction est valide.

Validation de la méthode analytique pour de faible concentration de sel disodique de quercétine

Les conditions chromatographiques étant identique que précédemment (page 103), le seuil de détection et de quantification restent les mêmes. Cependant la gamme de concentration étant plus faible (0,25 µg/mL à 10 µg/mL) les critères de fidélité, de linéarité et d'exactitude doivent être validés.

Les paramètres de fidélité sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Paramètre de la fidélité

Groupe	Essai	Concentration théorique (µg/mL)	Surface	Concentrée retrouvée (µg/mL)	Recouvrement %
1 ^{er} groupe	1/1	5	202570	5,06	101,2
	2/1	5	200115	5,00	100,0
	3/1	5	202910	5,07	101,4
	4/1	5	199545	4,99	99,8
	5/1	5	202960	5,07	101,4
	6/1	5	206505	5,16	103,2
2 ^e groupe	1/2	5	208575	5,00	100,0
	2/2	5	210145	5,04	100,8
	3/2	5	207710	4,98	99,6
	4/2	5	210850	5,05	101,0
	5/2	5	210195	5,04	100,8
	6/2	5	209915	5,03	100,6
3 ^e groupe	1/3	5	208825	5,11	102,2
	2/3	5	205470	5,03	100,6
	3/3	5	206615	5,06	101,2
	4/3	5	202665	4,96	99,2
	5/3	5	203385	4,98	99,6
	6/3	5	205115	5,02	100,4

Les résultats obtenus sont dans les normes tolérées décrites précédemment. 0,99% pour le coefficient de variation de répétabilité et 0,98% pour le coefficient de variation de reproductibilité.

Concernant la linéarité, nous avons choisi une gamme de concentrations plus faible allant de 0,25 µg/mL à 10 µg/mL (soit 14×10^{-5} µmoles à 556×10^{-5} µmoles pour 200 µL). Cette droite a été réalisée dans le but d'avoir une meilleure précision car les quantités de sel disodique de quercétine absorbées ne dépassent pas les 280×10^{-5} µmoles/200 µL. Deux séries de cette gamme de concentrations sont préparées et analysées chaque jour durant trois jours. La première sert de référence et la deuxième comme produit fini après extraction. Les résultats obtenus dans l'annexe 60 permettent d'obtenir les paramètres présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Paramètres de linéarité

Paramètres de linéarité	Produit de référence	Produit fini	Valeur théorique à 5% Pour 7 points
(1) Pente des droites d'ajustement (moyenne)	40831	40544	
(2) Ordonnée à l'origine des droites d'ajustement	-373	504	
(3) Coeff. Corrélation	1,000	1,000	
(4) Tests de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 (test t)	0,39 NS	0,71 NS	2,086
(5) Test d'homogénéité des variances (Cochran)	0,44 NS	0,66 S	0,561
(6) Test de l'existence des pentes (Fisher)	36076 HS	64681 HS	4,35
(7) Validité des ajustements (Fisher)	0,19 NS	0,05 NS	4,35
(8) Test de comparaison des ordonnées à l'origine (test t)		0,74 NS	2,086
(9) Test de comparaison des pentes des droites d'ajustement (test t)		1,09 NS	2,086

Les paramètres d'exactitude sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Paramètres d'exactitude

Paramètres d'exactitude	Référence: étalon 100 %	Référence: droite de régression du PA seul	Valeur théorique à 5%
Test d'homogénéité des variances intragroupe (test de Cochran)	0,47 NS	0,55 NS	0,56
Test de validité des moyennes (test Fisher)	1,59 NS	4,064 NS	4,35
Moyenne des recouvrements	101,51	102,30	
Intervalle de confiance	2,74	2,84	

La méthode est exacte (Tableau 18). L'ensemble de nos résultats montre que la méthode d'analyse pour les faibles concentrations du sel disodique de quercétine est validée.

III.2. Résultats et Discussions

III.2.a Transport du sel disodique de quercétine

Transport A vers B et B vers A

Le transport est étudié du côté apical vers le côté basal (A→B) et du côté basal vers le côté apical (B→A). Cette étude s'étend sur une durée de 120 minutes et est réalisée pour une concentration en sel disodique de quercétine de 100 μM . Des études préalables d'absorption de différentes concentrations de sel disodique de quercétine en fonction du temps ont permis de déterminer la concentration à utiliser. Notre choix s'est porté sur une concentration de 100 μM correspondant à la meilleure absorption.

La monocouche cellulaire est considérée intègre puisque la P_{app} est $\leq 1.10^{-6}$ cm/s.

Les résultats sont détaillés dans l'annexe 61 et sont représentés dans la figure 50 et sont exprimés en nombre de moles absorbées (μmoles) par mg de protéines.

Une augmentation linéaire du transport A→B est constatée pour le sel en fonction du temps jusqu'à 120 minutes.

Dans le sens de B→A, la quantité absorbée du sel augmente de manière linéaire jusqu'à 90 minutes.

Cependant, le transport du sel disodique de quercétine du côté apical vers le côté basal est significativement supérieur au transport se réalisant dans l'autre sens.

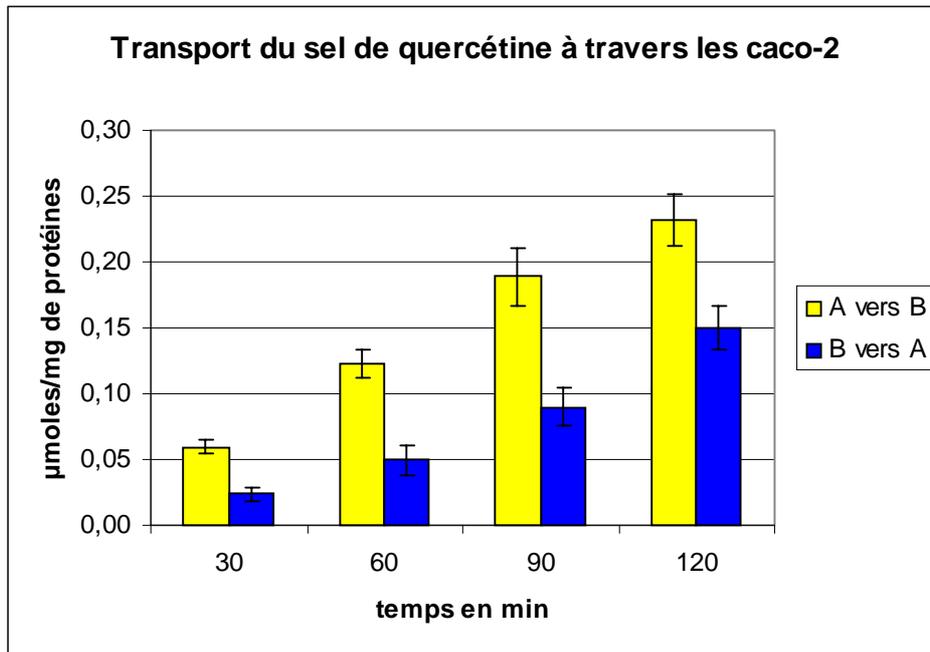


Figure 50 : transport du sel disodique de quercétine sur Caco-2.

Cette différence nous conduit à penser que l'absorption intestinale de ce sel fait intervenir un transport de type actif. Le transporteur impliqué pourrait être le SGLT-1, le transporteur sodium glucose-1. Afin de mettre en évidence l'influence du transporteur SGLT-1, nous avons utilisé une molécule inhibitrice spécifique de ce transporteur, la phlorizine.

Inhibition du transporteur du sel disodique de quercétine par la phlorizine

La phlorizine (116 μM) est ajoutée dans le milieu d'incubation HBSS une demi-heure avant l'expérimentation afin d'inhiber le transporteur SGLT-1.

Les résultats sont reportés dans la figure 51 et détaillés dans l'annexe 61.

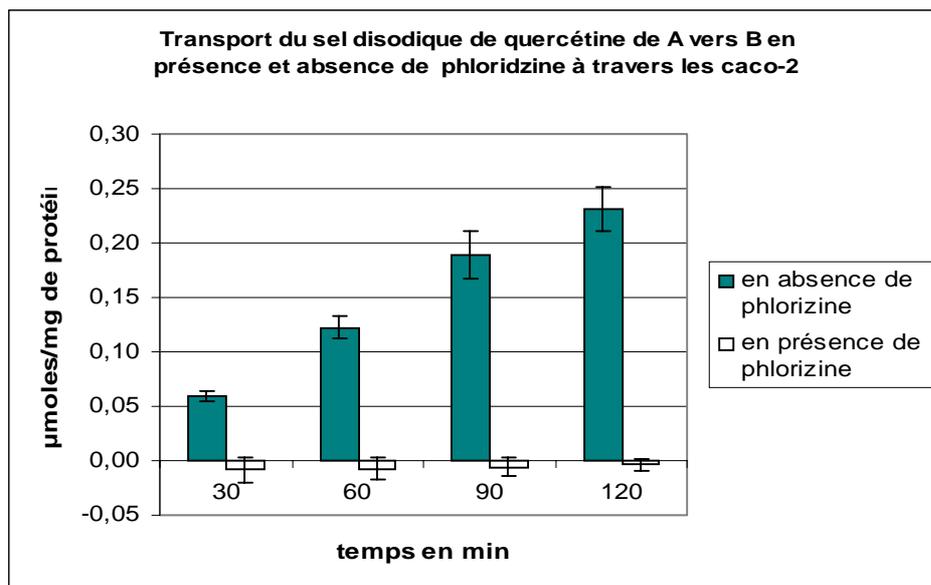


Figure 51 : Comparaison du transport du sel disodique de quercétine avec et sans phlorizine

Lors de cette étude, d'une durée de 120 minutes, le sel disodique de quercétine à la concentration de 100 μM est placé, en présence de la phlorizine à 116 μM , dans le compartiment apical (A). La phlorizine (116 μM) est également placée dans le compartiment basale afin de ne pas privilégier l'absorption dans un sens donné.

L'intégrité de la monocouche cellulaire est vérifiée puisque la perméabilité apparente est inférieure à 1.10^{-6} cm/sec.

En présence de cet inhibiteur la quantité de sel absorbée est totalement inhibée.

Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle l'absorption intestinale de ce sel fait intervenir un transporteur actif qui est le SGLT-1.

Effet du pH sur le transport du sel disodique de quercétine

Dans les conditions physiologiques, le pH intestinal varie de 5,5 à 6,5 du duodénum au jéjunum et le pH sanguin est de 7,4.

Le transport du sel de quercétine à travers la monocouche de caco-2 peut présenter des variations en fonction du pH, car un sel est polaire et une modification du pH de milieu peut modifier les propriétés physicochimiques d'une molécule. Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude d'absorption du sel disodique de quercétine dans les mêmes conditions mais en faisant varier le pH du milieu. Nous avons alors choisi les pHs 7,4, 6,5 et 5,5.

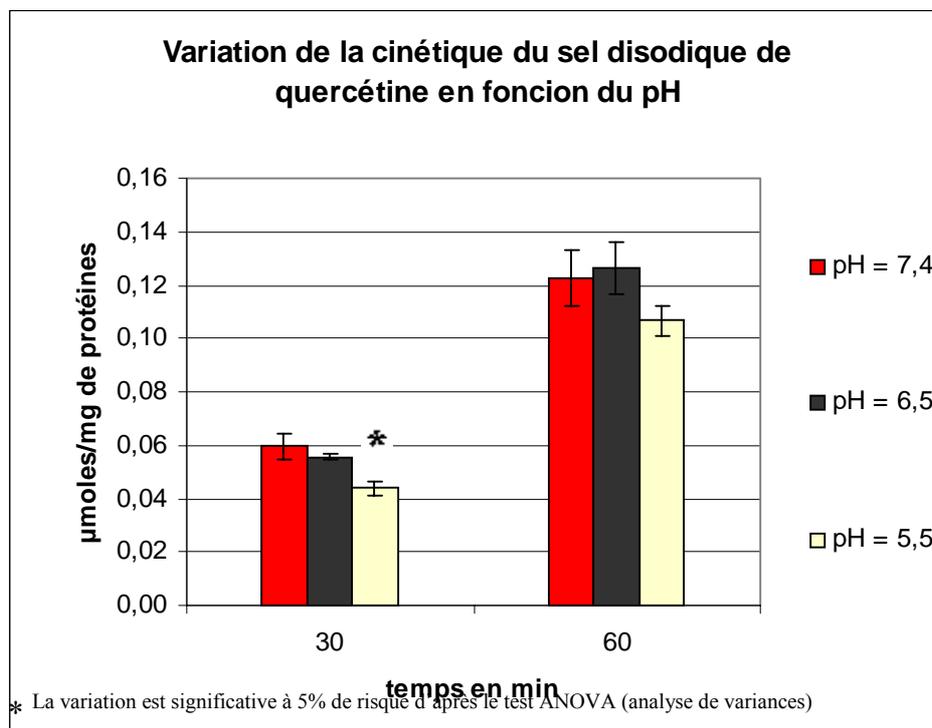


Figure 52 : Variation de l'absorption du sel disodique de quercétine en fonction du pH et du temps

Nous n'observons pas une différence significative d'absorption entre les pH 7,4 et 6,5 à 30 et à 60 minutes. Par contre, nous remarquons une différence significative d'absorption entre le pH 7,4 et 5,5 avec une diminution de 26,5% de la quantité absorbée à 30 minutes (différences au risque de 5%).

Cette variation peut être expliquée par le fait que les fonctions sels deviennent de moins en moins polaires pour pouvoir réagir avec le transporteur SGLT-1.

Par contre à pH 6,5 nous ne remarquons pas de variation dans la quantité absorbée. Par conséquent, à ce pH, le sel garde les mêmes interactions avec le transporteur en question.

III.2.b Comparaison de l'absorption de la quercétine et du sel disodique de quercétine.

Comparaison des absorptions

La quercétine est la molécule de base de notre sel. Elle est peu soluble et son absorption est faible. Une des manières d'optimiser son absorption est de faire un sel disodique de quercétine afin de le rendre plus hydrosoluble.

L'absorption intestinale de la quercétine sur les Caco-2 a été étudiée (annexe 63) afin de pouvoir la comparer à l'absorption du sel disodique de quercétine. Les méthodes d'analyse et d'extraction ont également été validées pour la quercétine [Al Ahmad et al., 2004].

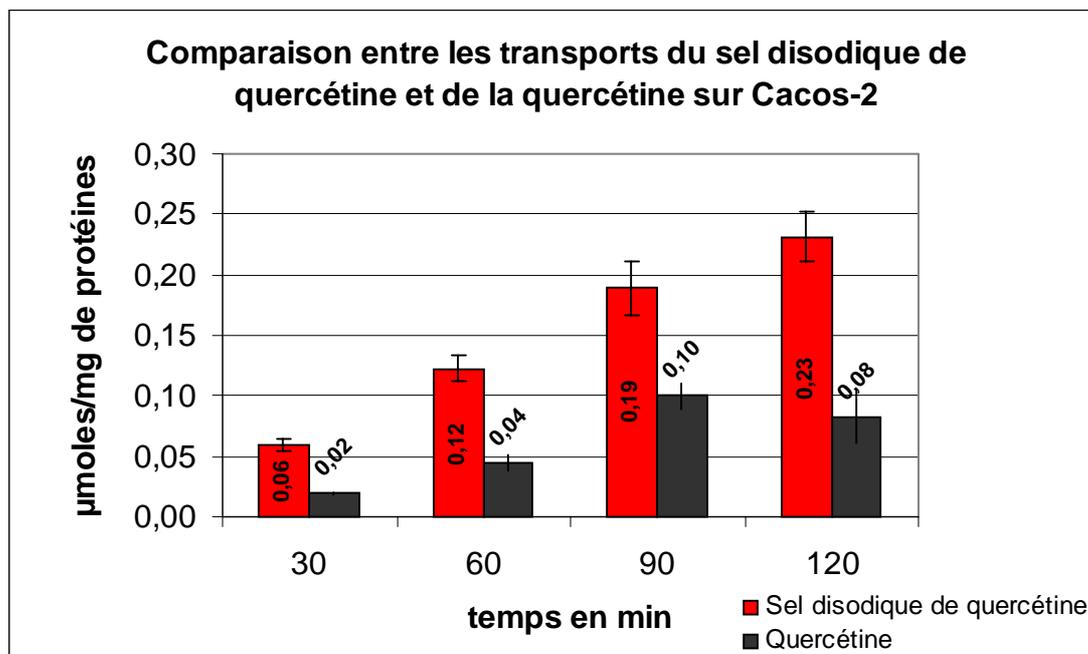


Figure 53 : Comparaison du transport du sel disodique de quercétine et de celui de la quercétine.

Les résultats de cette comparaison d'absorption entre la quercétine et le sel disodique de quercétine sont reportés dans la figure 53 et sont détaillés dans l'annexe 63.

Nous remarquons que les quantités du sel disodique de quercétine absorbées à 30, 60, 90 et 120 minutes sont beaucoup plus importantes que celles de la quercétine.

En effet, 0,23 µmoles/mg de protéines sont absorbées en 120 minutes pour le sel disodique de quercétine et seulement 0,1 µmoles/mg de protéines sont absorbées en 120 minutes pour la quercétine.

Ces différences d'absorption pourraient être attribuées à deux causes principales :

- 1- Le sel disodique de quercétine possède des sites polaires et semble être un substrat de la SGLT-1.
- 2- Le sel disodique de quercétine est plus soluble dans un milieu aqueux que la forme initiale la quercétine.

Etude du maximum de solubilité de la quercétine et son sel disodique dans différents milieux.

La solubilité du sel disodique de quercétine et de la quercétine est étudiée dans différents milieux : HBSS, Méthanol, HBSS/Méthanol (99/1, v/v) et HBSS/Méthanol (99/1, v/v). La méthode consiste à préparer des solutions saturées de ces deux molécules dans les différents solvants. Ensuite, une filtration sur des filtres millipores de 0,45 μm est réalisée suivie d'une dilution au $10^{\text{ème}}$ pour le sel disodique de quercétine. Les solutions récupérées sont analysées par chromatographie liquide avec les mêmes conditions décrites précédemment (page 103) à l'exception de la phase mobile et la longueur d'onde du détecteur pour la quercétine qui correspondent respectivement à 35% acétonitrile/65% eau à pH 2,3 et 370 nm.

Les maximums de solubilité que nous avons pu déterminer durant la préparation des solutions saturées dans les différents solvants cités ci-dessus, sont constatés par l'apparition d'une petite suspension. Ces maximums sont les suivants :

Pour le sel disodique de quercétine

- 1- 280,33 $\mu\text{g/mL}$ dans 100% HBSS
- 2- 280,12 $\mu\text{g/mL}$ dans HBSS/Méthanol à 1%
- 3- 290,93 $\mu\text{g/mL}$ dans 100% Méthanol

Pour la quercétine

- 1- 130,47 $\mu\text{g/mL}$ dans 100% Méthanol
- 2- 80,9 $\mu\text{g/mL}$ dans HBSS/Méthanol à 1%
- 3- trace dans HBSS/Méthanol à 0,1%
- 4- trace dans 100% HBSS

Les résultats obtenus par CLHP sont représentés sur la figure 54.

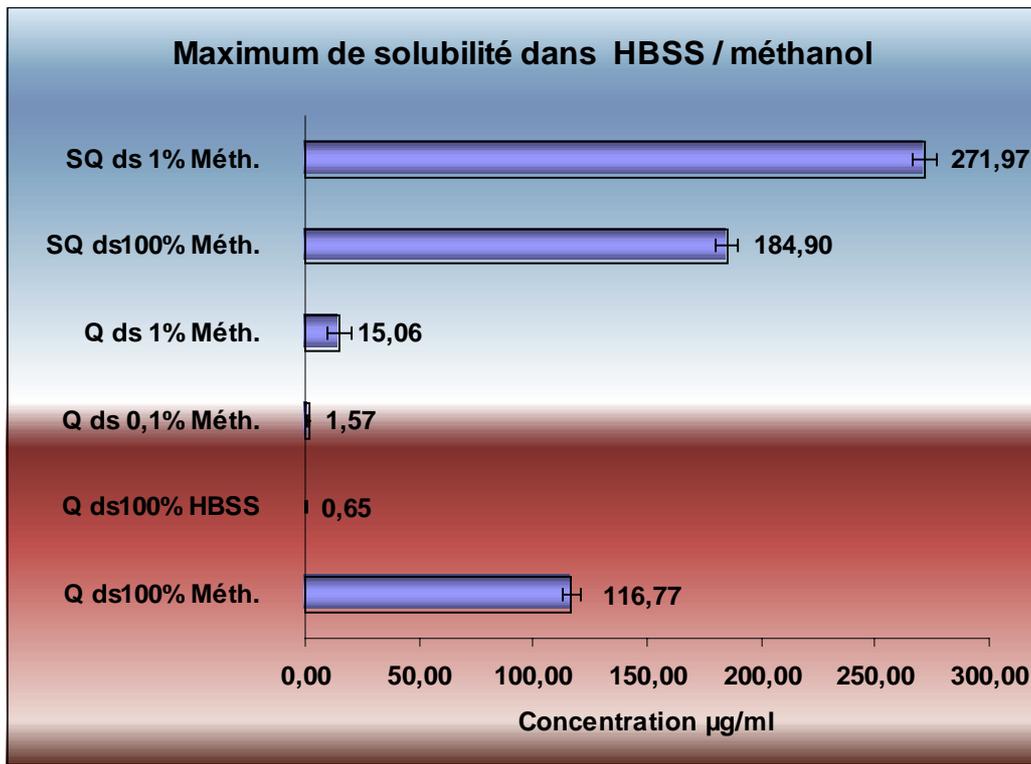


Figure 54 : Solubilité de la quercétine et de son sel disodique dans HBSS/Méthanol

Nous remarquons que le sel disodique de quercétine est beaucoup plus soluble que la quercétine dans le milieu aqueux HBSS/méthanol (99/1, v/v) ou dans le méthanol 100%.

La solubilité maximale de la quercétine est observée dans 100% de méthanol (116,77 µg/mL). Cette solubilité est deux fois plus faible que le sel disodique de quercétine qui présente une solubilité maximale dans un mélange méthanol/HBSS (99/1, v/v) avec 271,97 µg/mL (Figure 54).

De plus, avec pratiquement une même concentration de départ en sel disodique de quercétine (280 µg/mL), nous obtenons une solubilité meilleure dans le milieu HBSS/Méthanol (271,97 µg/mL) que dans le milieu constitué de 100% de Méthanol (184,9 µg/mL). Ceci nous confirme les propriétés hydrosolubles du sel disodique de quercétine.

Les deux effets résultant de la meilleure hydrosolubilité et de l'activation du transporteur SGLT-1 peuvent expliquer cette meilleure absorption intestinale du sel disodique de quercétine par rapport à la quercétine sachant que la quercétine n'est pas un substrat du transporteur SGLT-1 [Al Ahmad A., 2004].

III.3. Conclusion

D'après nos résultats, le mécanisme d'absorption du sel disodique de quercétine fait intervenir le transporteur SGLT-1. Cette absorption bien supérieure à celle de la quercétine seule est due

à la meilleure solubilité du sel dans le milieu utilisé à savoir, un milieu HBSS/méthanol (99/1, v/v). Ceci est confirmé en comparant les solubilités de la quercétine et de son sel disodique.

Par la suite, nous avons étudié l'effet du pH sur cette absorption. Nous constatons qu'à pH 5,5 le sel présente une diminution de son absorption de 26,5% les première 30 minutes. Ceci peut se traduire par le fait que la force ionique du sel diminue et par conséquent ses interactions avec le transporteur SGLT-1 diminuent également.

Au vu des résultats, l'application au niveau intestinal du sel disodique de quercétine est possible à condition qu'il soit protégé du suc gastrique par un enrobage gastro-résistant afin d'être libéré dans le jéjunum, le site d'absorption privilégié.

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Le pouvoir antioxydant et les propriétés de capture des radicaux libres de la quercétine avaient déjà fait l'objet de différentes études. Les résultats obtenus étaient difficilement interprétables du fait de l'insolubilité de la quercétine en milieu aqueux constitutifs des modèles retenus.

La quercétine, insoluble en milieu aqueux, a été, dans un premier temps, salifiée par adjonction de soude ; du fait de plusieurs acidités de la molécule, les tests ont été réalisés, dans un premier temps, après solubilisation de la quercétine par une solution aqueuse de soude. Plusieurs niveaux de solubilisation ont été réalisés à des pH croissants, soit respectivement à pH 8,0, à pH 8,4, à pH 8,6, à pH 8,8, à pH 9,0, à pH 9,2, à pH 9,4, à pH 9,6, à pH 9,8, à pH 10 et à pH 10,2. Chaque solution de la quercétine obtenue a été diluée dans un tampon de pH 7,4 en vue de différentes études.

Les solutions de sels de quercétine à pH 10 ont fait l'objet de l'étude de capture de radicaux libres (Première Partie Chapitre 2, paragraphe III). Nous pensions obtenir des résultats de capture de radicaux libres identiques pour les différentes solubilisations à différents pH. Certains résultats n'étant pas superposables, ceci pourrait être dû à une formation des entités stables à pH 7,4. Parmi les résultats obtenus, la solubilisation à pH 9,6 a conduit à des résultats de capture les plus constants. Dans un troisième temps, nous avons isolé le produit de salification de la quercétine obtenu dans un milieu méthanolique après addition de soude méthanolique jusqu'à obtention du pH 9,9. Ce composé isolé correspond selon les propriétés décrites à une entité disodique parfaitement soluble dans l'eau. De la même manière, une entité monosodique et une entité trisodique ont été préparées à pH respectivement de 8,7 et de 10,4. (Chromatogrammes annexes 26 à 28)

I. Identification de la quercétine et des trois sels de quercétine par chromatographie liquide utilisant un couplage à barrette de diodes comme détecteur (colonne C18, 250 mm/4,6 mm)

I.1. Etude chromatographique avec la phase mobile eau/acétonitrile à pH 2,3

Les temps de rétention respectifs sont,

- pour la quercétine : 7,8 min,
- pour le sel monosodique : 7,8 min,
- pour le sel disodique : 3,6 min.
- Les résultats pour le sel trisodique ne sont pas retenus du fait de l'existence d'un mélange.

La quercétine et le sel monosodique ont le même temps de rétention ; les spectres d'absorption sont identiques. Par contre le sel disodique présente un temps de rétention différent et une absorbance différente vers 320-400 nm (annexe 64).

I.2. Etude chromatographique avec la phase mobile à pH 7,4

Les temps de rétention respectifs sont,

- Pour la quercétine : 7,9 min
- Pour le sel monosodique : 6,9 min

- Pour le sel disodique : 3,6 min
- Les résultats pour le sel trisodique ne sont pas retenus du fait de la présence d'un mélange

La quercétine, le sel monosodique et le sel disodique présentent des temps de rétention différents. Les spectres d'absorption sont identiques pour la quercétine et le sel monosodique ; le spectre d'absorption du sel disodique est différent des deux autres et identique à celui obtenu à pH 2,3 (annexe 64).

Conclusion

Avec une phase mobile de pH 2,3 le sel monosodique et la quercétine ont les mêmes caractères physicochimiques en chromatographie liquide ; le sel disodique présente un temps de rétention et un spectre d'absorption différents et caractéristiques. A pH 2,3 le sel monosodique présente les mêmes propriétés que la quercétine de départ.

Avec une phase mobile de pH 7,4 le sel disodique, le sel monosodique et la quercétine présentent des temps de rétention différents. Le spectre d'absorption du sel disodique est différent de ceux de la quercétine et du sel monosodique. A ce pH, chaque entité garde ses propriétés physicochimiques en chromatographie liquide.

II. Identification de la quercétine et des sels correspondants par chromatographie liquide (colonne C18, 250 mm/4 mm) après transformation par acidification, des trois sels en quercétine de départ.

Quatre solutions méthanoliques à environ 0,1 $\mu\text{mole/mL}$ ont été préparées :

- solution de quercétine (0,1 $\mu\text{mole/mL}$),
- solution de sel monosodique de quercétine (0,089 $\mu\text{mole/mL}$),
- solution de sel disodique de quercétine (0,095 $\mu\text{mole/mL}$),
- solution de sel trisodique de quercétine (0,089 $\mu\text{mole/mL}$).

L'addition d'acide chlorhydrique 0,1% en excès doit conduire à la quercétine elle-même. Les solutions ainsi préparées sont analysées par chromatographie liquide en utilisant une colonne C18 (250 mm/4mm) et une phase mobile sous forme d'un mélange acétonitrile/eau à pH 2,3 (35/65, v/v) (annexe 65).

Les résultats obtenus montrent que dans le cas du sel monosodique et du sel disodique, la quercétine se reforme respectivement à 95,71% et 97,66% alors que dans le cas du sel trisodique la quercétine se retrouve elle-même seulement à 43,80%.

Cette étude nous permet de démontrer que le sel monosodique et le sel disodique sont des composés purs et ne contiennent pas des dérivés d'oxydation.

Le sel trisodique est un mélange de différents sels de quercétine pouvant contenir éventuellement des produits d'oxydation de la quercétine.

III. Etude de l'influence des constituants phosphates de milieu tampon sur la salification de la quercétine et dérivés.

III.1. Cas de la quercétine

20 mg de quercétine mélangés

- soit avec 100 mL d'eau, dépourvu de dioxyde de carbone, (pH voisin de 7)
- soit avec 100 mL d'un tampon phosphate à pH 2,3,
- soit avec 100 mL d'un tampon phosphate à pH 7,4,

ne donnent pas de solution limpide. Il en est de même après agitation continue durant 24 heures et 48 heures.

Cette insolubilité de la quercétine semble être due à un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires qui ne peuvent être dissociées lors de la dissolution ; d'autres liaisons doivent également intervenir pouvant conduire par exemple à un « staking », empilement de plusieurs molécules de quercétine.

L'analyse par chromatographie liquide (colonne C18, 250 mm/4,6mm, détecteur à barrette de diodes, phase mobile à pH 7,4 : conditions permettant de visualiser respectivement la quercétine, le sel monosodique et le sel disodique) des 3 suspensions après 48 heures d'agitation montrent que

- la suspension aqueuse correspond à la quercétine de départ (temps de rétention : 7,9 min environ avec une surface correspondant à une concentration de l'ordre de 100%),
- la suspension à pH 2,3 correspond à la quercétine de départ (temps de rétention : 7,9 min environ avec une surface correspondant à une concentration de l'ordre de 100%),
- la suspension à pH 7,4 correspond au sel monosodique de quercétine (temps de rétention : 7,0 min environ avec une surface correspondant à une concentration de l'ordre de 95%) ; on observe encore environ 2% de quercétine de départ au temps de rétention 7,9 min. A la concentration de 20 mg de quercétine dans 100 mL de milieu aqueux, « l'insolubilité » de la quercétine à pH 7,4 correspond à une solution saturée du sel monosodique de quercétine. La solubilisation de la quercétine en milieux aqueux est très difficile ; cependant en présence des phosphates du tampon à pH 7,4 cette quercétine se transforme lentement en sel monosodique lui-même peu soluble.

III.2. Cas du sel disodique de la quercétine

20 mg de sel disodique de quercétine mélangés

- soit avec 100 mL d'un tampon phosphate à pH 2,3,
- soit avec 100 mL d'un tampon phosphate à pH 7,4,

conduisent à des solutions limpides durant au moins 1 heure à pH 2,3 et au moins 2,5 heures à pH 7,4. Ces solutions limpides après agitations durant 24 heures et 48 heures conduisent à une précipitation.

L'analyse des échantillons prélevés après 1 heure pour les deux solutions montre que à pH 2,3 et à pH 7,4, le sel disodique existe ; la détermination quantitative par chromatographie liquide montre que seul le sel disodique existe dans le milieu aqueux. Les analyses des échantillons après 24 heures de conservation puis après 48 heures, montrent la présence du sel monosodique de quercétine (temps de rétention : 6,9 min environ, avec un spectre d'absorption identique à celui de monosodique (paragraphe III.1)).

Conclusions :

Tous les essais décrits dans les chapitres précédents, avec le sel disodique, donnent des résultats attribuables à la quercétine entité dianionique.

IV. Etude comparative du spectre d'absorption de la quercétine et des sels sodiques de la quercétine isolés.

Le spectre d'absorption de la quercétine et celui de chaque sel isolé ont été enregistrés. Les maximums d'absorption caractéristiques obtenus sont identiques à ceux déterminés lors des analyses par chromatographie liquide.

Les spectres d'absorption de la quercétine et du sel monosodique sont superposables avec des maximums vers 256 nm et 371 nm. Celui du sel disodique présente des maximums vers 252 nm et 353 nm. Au dessus de 400 nm on n'observe pas d'autre pic ou d'épaulement, ce qui exclut les composés d'oxydation décrits dans la littérature [Dangles et al. 1999]. En passant du monosel au disel on constate un déplacement du maximum de 370 nm à 353 nm. La superposition des maximums du monosel et ceux de la quercétine est logique. Les hypothèses du déplacement du maximum du disel par rapport au monosel peuvent être

- soit une conséquence de la double ionisation. En effet l'acide salicylique présente pour la forme acide deux maximums à 236 nm et 303 ; sous forme salifiée on n'observe qu'un maximum à 298 nm (Clarke's Isolation and identification of drugs, second edition, 1986), l'état de l'ionisation a une influence sur la répartition des nuages électroniques.
- soit une conséquence de la modification de la résonance due à un empêchement stérique, l'existence de deux fragments phénates entraînant un plus grand encombrement.

V. Confirmation des structures du sel monosodique et du sel disodique de la quercétine par spectrométrie de masse

Une analyse par couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse des sels de quercétine a été envisagée. Des difficultés de maîtrise de l'interface du couplage dues principalement à la nature des différentes phases mobiles nous ont amené à réaliser des spectres de masse de chaque sel isolé. Les différentes solutions sont préparées dans un mélange acétonitrile/eau (90/10, v/v) à 10^{-5} M

V.1. Sans acidification (annexe 66)

Les rapports m/z obtenus permettent de caractériser chaque entité :

- quercétine : m/z = 301,
- sel monosodique : m/z = 301,
- sel disodique : m/z = 150,
- sel trisodique : mélange avec des m/z = 303, 181, 153.

V.2. Après acidification (0,1% d'acide chlorhydrique) (annexe 67)

Les rapports m/z sont respectivement :

- quercétine : m/z = 301,
- sel monosodique : m/z = 301,

- sel disodique : $m/z = 301$,
- sel trisodique : mélange avec des $m/z = 303, 181, 153$ et 301 .

Conclusion :

Le sel monosodique $m/z = 301$ et le disodique $m/z = 150$ sont des entités chimiques dérivant de la quercétine. Le spectre du sel trisodique n'est pas interprétable, ce qui confirme pour ce composé l'état de mélange de quercétine, de sels de quercétine et d'autres composés présents avant et après acidification.

VI. Acidité de la quercétine

La quercétine présente trois sites d'acidité. Les valeurs mentionnées pages 55-56 sont celles déterminées par potentiométrie en milieu méthanol-eau et sont attribuées par H^1NMR en milieu MeOD ; elles sont très voisines de celle publiées en 1993 par Kadykova. D'autres valeurs ont été publiées par Escandar et Sala en 1991, Rolando et al. en 2002 et Agrawal et al. en 1983 ; les déterminations ont été réalisées en milieu DMSO/ D_2O . Le pK_a correspond à l'état de protonation de la molécule. Pour la quercétine plusieurs sites peuvent intervenir simultanément avec une répartition statistique favorisant l'un des sites. Du fait de l'existence d'un pic spécifique obtenu en chromatographie liquide à pH 7,4 respectivement pour le sel monosodique et pour le sel disodique, on peut admettre en première approximation que le sel monosodique correspondrait à la salification en position 3 et le sel disodique correspondrait à la salification des protons 3 et 7.

VII. Etude comparative des entités sodiques de la quercétine et des entités potassiques de la quercétine.

Une expérimentation identique à celle décrite au chapitre II de la Deuxième Partie (page 69 et suivantes) a été réalisée en remplaçant l'hydroxyde de sodium par de l'hydroxyde de potassium ; de même le phosphate monosodique et le phosphate disodique ont été remplacés respectivement par le phosphate monopotassique et le phosphate dipotassique. La quercétine donne à pH 10 une dissolution totale lors de l'addition de la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (préparation décrite page 56).

L'analyse par chromatographie liquide selon les conditions décrites page 70, le phosphate monopotassique et le phosphate dipotassique remplaçant respectivement le phosphate monosodique et le phosphate disodique pour la préparation du tampon à pH 7,4, montre la présence d'un seul pic à un temps de rétention de 7,5 min. Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet de ce pic est superposable à celui de la quercétine.

La différence de comportement entre l'entité sodique de la quercétine et l'entité potassique de la quercétine peut s'expliquer par la différence de taille entre l'ion sodium et l'ion potassium, et celle de la charge massique des deux ions.

L'existence de l'entité disodique de la quercétine pourrait s'expliquer par une association de deux molécules de quercétine au moyen de quatre ions de sodium ; cette structuration pourrait faire intervenir différentes liaisons et interactions de nature π intermoléculaires. Lorsque les ions sodium sont remplacés par des ions potassium, cette structuration n'est pas stable, ou impossible.

Conclusion

Le sel disodique de la quercétine capteur de radicaux libres oxygénés, a été retenu pour les études pharmacochimiques :

- d'une part une étude de la biodisponibilité au niveau du tissu intestinal
- d'autre part une étude de fixation au niveau de l'épiderme humain.

En fonction des pH des tampons utilisés et des temps d'enregistrement des résultats ces derniers correspondent à une entité de la quercétine soluble en milieu aqueux, du fait de la présence de deux fragments phénates soit une entité dianionique.

L'analyse des différents strips de l'épiderme montre, lors des déterminations quantitatives par chromatographie liquide, que seul le sel disodique est présent dans les différentes couches de l'épiderme. Le temps de rétention de 7 minutes pour une phase mobile acétonitrile/eau à pH 2,3 (20/80, v/v) et sur une colonne C18 (250 mm/4 mm), dans les nouvelles conditions chromatographiques mises au point spécifiquement pour l'analyse du sel disodique en présence des excipients de la crème, correspond spécifiquement au sel disodique de quercétine ; la quercétine elle-même dans ces conditions opératoires donne un pic vers 15 minutes.

Il en est de même pour l'analyse durant l'étude de l'absorption intestinale du sel disodique de quercétine.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus ont permis de préciser les modifications susceptibles de rendre une molécule plus active vis-à-vis de la capture des radicaux libres et surtout le radical hydroxyle. La substitution des groupements hydroxyles en position 3 et 7 de la quercétine a permis d'évaluer sa capacité de capter le radical hydroxyle par le modèle de Fenton. Une telle modification a été étendue pour des structures de flavonoïdes du type rutine. Elle a permis de tripler cette même activité.

Dans la première partie de ce travail, nos résultats montrent clairement que les formes salifiées sont de meilleurs capteurs des radicaux hydroxyles. La constante de vitesse de capture est 3 fois supérieure à celle des hydroxyflavones elles-mêmes.

Concernant la capture du radical superoxyde, les sels sont aussi actifs que les molécules de départ.

Une forme salifiée d'une hydroxyflavone est donc un produit intéressant pour la capture des radicaux libres surtout si le groupement hydroxyle en position 3, responsable du caractère pro-oxydant, est salifié. Les autres groupements hydroxyles salifiés contribuent à l'augmentation de la solubilité aqueuse des molécules. Ce produit peut être envisagé pour des applications thérapeutiques, le caractère hydrophile permettant des formulations galéniques plus adaptées.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés plus précisément à étudier les sels de quercétine. Les résultats obtenus ont montré que le sel monosodique de quercétine correspond à une salification en position 3, le sel disodique de quercétine à une salification en positions 3 et 7 et le sel trisodique de quercétine à une salification en positions 3, 7 et 4'.

En plus, nous avons démontré que le sel disodique de quercétine possède la meilleure activité de capture des radicaux libres parmi les trois sels dans un tampon à pH 7,4 qui est proche de celui des milieux physiologiques.

Les paramètres physicochimiques liés à cette activité de capture du radical hydroxyle n'étaient pas encore clairement identifiés au début de nos recherches. Des études de relation entre les structures et leur activité de capture du radical hydroxyle ont été réalisées par d'autres auteurs mais ces études se limitent à une détermination des structures favorables à une meilleure capture. Ces travaux ont donc été approfondis afin de déterminer les paramètres physicochimiques accentuant cette activité.

Nos résultats montrent que l'activité de capture du radical hydroxyle augmente avec une diminution de la constante d'acidité de l'hydroxyle phénolique jusqu'à un pK_a égale à 7,6. A partir de cette valeur de pK_a , la constante de vitesse de capture commence à diminuer. En ce qui concerne l'effet de la salification, le 5-chlorosalicylaldehyde montre l'exemple typique. Son activité de capture du radical hydroxyle sous forme salifiée est deux fois plus importante que celle sous forme non salifiée. D'autres conclusions ont été obtenues durant cette étude. Premièrement, la présence d'un deuxième hydroxyle phénolique en position ortho augmente considérablement l'activité de capture alors que sa présence en position méta ou para donne un effet inverse. Deuxièmement, la présence d'une fonction acide carboxylique diminue cette activité. Finalement, l'effet de la variation du pK_a est beaucoup plus important dans les cas d'un groupement catéchol.

Dans la dernière partie de notre travail, deux études de biodisponibilité du sel disodique de quercétine ont été réalisées au niveau cutané et intestinal dans l'optique d'une utilisation thérapeutique par voie orale et par voie topique.

Le sel disodique de quercétine peut être envisagé comme capteur de radicaux libres à la surface de la peau, suite à des agressions de l'environnement (soleil et polluant). De ce fait, ce composé actif devrait se fixer dans les couches superficielles de l'épiderme. Il avait déjà été démontré pour les tétracyclines que le chlorhydrate de tétracycline se fixait dans les couches superficielles de l'épiderme, alors que la forme basique pénétrait assez rapidement dans le derme et passait dans la microcirculation sanguine.

Les résultats concernant la pénétration cutanée, *in vivo* et *in vitro*, montrent que le sel en question pénètre rapidement dans les couches superficielles de l'épiderme et que la concentration du sel dans les couches profondes de l'épiderme devient négligeable. La pénétration et la rétention du sel, capteur de radicaux libres, dans les couches superficielles de l'épiderme, sont ainsi démontrées. Ces résultats sont avantageux car, le risque le plus répandu d'une pommade, est la pénétration du principe actif dans le derme et en conséquence dans la circulation sanguine. Cette situation est quasiment exclue dans le cas du sel disodique de quercétine.

Par voie orale, le sel peut être protégé par un enrobage gastro-résistant pour éviter la transformation en composé non salifié par l'acidité du suc gastrique. Ceci permet d'assurer le transport de la molécule intacte afin d'être libérée dans l'intestin au niveau duquel l'absorption est réalisée.

Nos résultats montrent que l'absorption intestinale de cette molécule fait intervenir un mécanisme de transport actif qui serait lié à la présence des ions Na^+ et des sites polaires qui peuvent d'une manière ou d'une autre activer le transporteur (SLGT1). De plus, par comparaison avec la quercétine, le sel disodique de quercétine est mieux absorbé avec des quantités supérieures et une vitesse plus rapide. Ces différences sont justifiées respectivement par la meilleure solubilité du sel dans ce milieu et l'activation du transporteur avec lequel la quercétine non salifiée ne manifeste aucune interaction.

La quercétine, sous forme de sel disodique est capteur de radicaux libres présentant une constante de vitesse de capture élevée tout en masquant le caractère pro-oxydant. Ce type de molécule présente des potentialités aussi bien au niveau cutané qu'intestinal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agrawal P.K., Schneider H.J. Deprotonation-induced ^{13}C NMR shifts in phenols and flavonoids. *Tetrahedron Lett.*, **24** : 177-180, 1983.

Aiache J.M., Devissaguet J.Ph., Guyot-Hermann A.M. *Galenica, tome 2 Biopharmacie Ed. Technique et Documentation*, Paris **2ème édition**, 1982.

Al Ahmad A., Andriantsitohaina R., Ubeaud G. Transport of flavonoids across human intestinal epithelial and vascular endothelial cells.. *Fundam.Clin.Pharm.* **18** : **229**, 2004.

Albert A., Serjeant E.D. The determination of ionization constants. *Dissociation-ionization constants*. Ed. Chapman and Hall, London, **3ème édition**, 1984.

Auclair C., Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In "*Handbook of methods for oxygen Radical research*" Ed. Greenwald R.A. CR0 Press, Boca Raton, New York 1986.

Avissar N. , Whitin J.C. , Allen P.Z. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* , **2** : **15850-15855**, 1989.

Ballou D., Palmer G. et Massey V. Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of the reduced flavin and its catalytic decomposition by erythrocyte cytochrome b₅. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **36:898**, 1969

Bartgel J. Chemical analysis (Volume 45). Thermometric titrations. J. D. Winefordner editor, *Wiley Interscience*, 1976.

Beauchamp C. et Fridovich I. A mechanism for the production of ethylene from methional. *J. Biol. Chem.* **245 (18)** : **4641-4646**, 1970.

Benet L., Goyan J.E. Potentiometric determination of dissociation constants. *J. Pharm. Sci.*, **56** : **665-680**, 1967.

Bielski B.M.J. et Richter H.W. A study of the superoxide Radical chemistry by stopped-flow Radiolysis and Radiation induced oxygen consumption. *J. Am. Chem. Soc.* **9** : **3019-3022** 1977.

Bielski B.H.J. Preparation of aqueous superoxide solutions at alkaline pH by high-energy ionizing Radiation. In “*Handbook of methods for oxygen radical research*” Ed. by Greenwald R.A. *CRO Press, Boca Raton, 77-80* Florida 1986.

BONIN Michel. Dosage diacide faible - base forte - <http://sciences-physiques.ac-dijon.fr>
CE.RE.S.P. DIJON 2000

Bors W., Michel C., Saran M. et Lengfelder E. The involvement of oxygen Radical during the autoxidation of adrenaline. *B.B.A.* **4** : **162-172**, 1978a.

Bors W., Saran M., Lengfelder E., Miche C., Fuchs C. et Frenzel C Detection of oxygen Radical in biological reactions. *Photochem. Photobiol.* **629-638**, 1978b.

Bourdillat, B.; Delautier, D.; Labat, C.; Benveniste, J.; Potier, P.; Brink, C. Lab. Yves Rocher, Paris, Fr. Mechanism of action of hispidulin, a natural flavone, on human platelets. *Prog. Clin. Biolo. Res.* **280** : **211-14**, 1988.

Boynton, A.L.; Kleine, L.P.; Durkin, J. P.; Whitfield, J.F.; Jones, A. Mediation by calcicmodulin and cyclic AMP of tumor promoter-induced DNA synthesis in calcium-deprived rat liver cells. *Biol. Sci. Div.*, **417-31**, 1982.

BRadford M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72:248-54**, 1976.

Bu-Abbas A; Clifford M N; Ioannides C; Walker R Stimulation of rat hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food chem. Toxicol.*, **33(1): 27-30**,1995.

Buettner G.R., Oberley L.W. et Chan Leuthauser S.W.H. The effect of iron on the distribution of superoxide and hydroxyl Radicals as seen by spin trapping and on the superoxide dismutase assay. *Photochem. Photobiol.* **693-695**, 1978.

Burton G.W., Ingold K.U. 13-carotene an unusual type of lipid antioxydant. *Sciences*, **224: 569-573**, 1984.

Butter J., Keppenol W.H. Margaliash E. Kinetics and mechanisms of the reduction of ferricytochrome C by the superoxide anion. *J. Biol. Chem.*, **10747-1 0750**, 1982.

Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., Guyen-Huu J.J., Russotto R. Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP. *S.T.P. Pharma Pratiques, I. Méthodologie*, **205-226**, 1992.

Cren-Olivé C., Wieruszkeski J.M., Maes E., Rolando C. Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C NMR. *Tetrahedron Lett.*, **43** : 4545-4549, 2002.

Caselle R.H. Fridovich I. The role of superoxide Radical in the autoxidation of cytochrome C. *Biochem. J.* **14** : **1866-1 869**, 1975.

Christman M.F., Morgan R.W., Ames B.N. Positive control for defenses against oxidative stress and some heat shocks proteins in Salmonella typhimurium. *Cell*, **4** : **753-762**, 1985.

Cheeseman K.H., Beavis A. Esterbauer H. Hydroxyl-Radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. *J. Biochem.* **252** : **649-653**, 1988.

Clement J.R. Armstrong D.A. Pulse Radiolysis of aqueous papain. *Can. J. Chem.* **Q**, **2833-2840**, 1972.

Commenges, D.; Scotet, V.; Renaud, S.; Jacquemin-Gadda, H.; Barberger-Gateau, P.; Dartigues, J. -F. Intake of flavonoids and risk of dementia. Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U330, Bordeaux, Fr. *Eur. J. Epidemiol.* **16(4)** : **357-363**, 2000.

Cohen G. The Fenton reaction. "*Handbook of methods for oxygen radicals research*", Ed., Greenwad R.A. CEC press, Boca raton, New York, 1986.

Cohen G. et Cederbeau A.I. Microsomal metabolism of hydroxyl Radical scavenger agents *Arch. Biochem. Biophys.* **438-447**, 1980.

Dangles O., Fargeix G., Dufour C. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1387-1395, 1999.

Da Silva E.J.A.; Oliveira, A. B.; Lapa, A.J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **46(2)** : **118-22**, 1994.

De Belilovsky C. La protection solaire spécifique de l'enfant *Mustela, Conseil d'experts*, Oct 2001 www.mustela.com.

De Whalley, C. V.; Rankin, S. M.; Hoult, J. R. S.; Jessup, W.; Leake, D. S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **39(11)** : 1743-50, (1990).

Donovan, M.G., Cogburn, J.N., and Schasteen, C.S. - A Model of Human Small Intestinal Absorptive Cells. 1. Transport Barrier. *Pharm. Res.* **8**: 210-216, 1991.

Elisa T., Veli-Pekka R., Kati-Sisko V., Joni P., Anu T., Mirka L., Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model, *Euro. J. Pharm.* **20 (1)** : 99-106, 2003.

Erben-Russ, M.; Bors, W.; Saran, M.. Reactions of linoleic acid peroxy Radicals with phenolic antioxidants: a pulse Radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.*, **52(3)**: 393-412, 1987.

Escandar G.M., Sala L;F. Complexing behavior of rutin and quercetin. *Can. J. Chem.*, **69** : 1991.

FDA's Guidance for Industry – Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs – In vivo Bioavailability, In vitro Release and Associated Studies. www.fda.com.

Feldmann R.J., Maibach H.I. Absorption of organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.* **54** : 399-404, 1970.

Fesen M R; Pommier Y; Leteurtre F; Hiroguchi S; Yung J; Kohn K W. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **48(3)** : 595-608, 1994.

Franceschini P. La peau et son vieillissement. Dominos Flammarion, 1994. www.arte-tv.com/hebdo/archimed

Frantz T.J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* **64** : 190-195, 1975.

Fridovich I. The biology of oxygen Radicals. *Sciences*, **8(201)**: 875-880, 1978.

Frenkel, K.; Chrzan, K.. Hydrogen peroxide formation and DNA base modification by tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes. *Carcinogenesis* **8(3)** : 455-60, 1987.

Fridovich I. Cytochrome C. In “*Handbook of methods for oxygen radical research*” Ed. Greenwald R.A. CRO Press, Florida **121-122**, 1986.

Fuhrman B; Lavy A; Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61(3)** : **549-54**, 1995.

Fulbert J.C. , Cals M.-J.. -Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, **49(1)**, **66-77**, 1992.

Galati E M; Monforte M T; Kirjavainen S; Forestieri A M; Trovato A; Tripodo M M Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* **40(11)** : **709-12**, 1994.

Galvez, J.; de la Cruz, J. P.; Zarzuelo, A.; Sanchez de la Cuesta, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology* **51(2)** : **127-33**, 1995.

Georgievskii, V.P. ; Acid properties of flavonoid compounds and choice of a solvent for carrying out potentiometric analysis. *Himia Prirodnih Soedinenij.* **2**: **180-186**, 1980.

Goldstein S., Czapski G. Mannitol as an hydroxyl Radical scavenger in aqueous solution and biological systems. *Int. J. Radiat. Biol.*, **46**, **726-729**, 1984.

Gotoh T. et Shikama K. Generation of the superoxide Radical during the autoxidation of oxymyoglobin. *J. Biochem.* **397-399**, 1976.

Gutteridge J.M.C., Maitt L. et Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton reaction. *J. Biochem.* **29** : **169-174**, 1990.

Gutteridge J.M.C. Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. *FEBS Lett.* **19-23**, 1985.

Halliweri B.,Gutteridge J.M.C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl Radicals. *FEBS Lett.*, **347-352**, 1981.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Aruoma O. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constant for reaction of hydroxyl Radicals. *Anal. Biochem.* **1215-219**, 1987.

Halliwell B., Richmond R., Wong S.R., Guteridge J.M.C. Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin. *FEBS Lett.* **112(2): 269-72**, 1980.

Halliwell, Barry; Cross, Carroll E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Persp.* **102 (Suppl. 10): 5-12**, 1994.

Hanocq, M.; Van Damme, M.; Molle, L. Determination of ionization constants of N-substituted benzamides. Benzotriazolecarboxamide case. *Analysis* **10(3) : 140-4**, 1982.

Hanocq, M.; Van Damme, M.; Fuks, R.. Determination of acidity constants for N,N'-substituted amidines. *J. Pharm. Belg.* **38(1) : 27-32**, 1983.

Harborne JB In : The Flavonoids, Advances in research since 1980, Chapman and Hall Ed, **292-296**, 1988.

Haslam E.T., bitterness and astringency. In: *Practical polyphenolics* (from structure to molecular recognition and physiological action) Cambridge University Press, **178-225** 1998.

Henderson L.M., Chappell J.B., Jones O.T.G. Superoxide generation is inhibited by phospholipase A. *Biochem. J.*, **2: 249-255**, 1989.

Hicks M. et Gebicki J.M. Rate constants for reaction of hydroxyl Radicals with tris, tricine and hepes buffers. *FEBS Lett.* **92-94**, 1986.

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* **342(8878): 1007-11**, 1993.

Hill K.E., White J.G., Rao G.H.R. Role of glutathione and glutathione peroxydase in human platelet arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins*, **3: 21-32**, 1989.

Hollman P.C.H., Gaag M.V.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic.Biol. Med.* **21:703-707**, 1996.

Hollman P.C.H., Katan M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol. suppl.* **25:237-239**, 1998.

Hollman P.C.H., Van Trijp J.M.P., Gaag M.V.D., Mengelers M.J.B., Katan M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, **418:152-156**, 1997.

Houin, G. *Pharmacocinétique.*, Editions Ellipses, Paris **7-19**, 1990.

Imai K; Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ* **310(6981): 693-6**, 1995.

International conference on Harmonisation. *www.arlenda.com*, 1995.

Jovanovic S.V. ; Steenken S. ; Simic M.G. ; Hara Y. ; Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids Radicals. Antioxidants in health and disease. *AHDIEQ Journal* ,**7: 137-161**, 1998.

Jurd Leonard, "Spectral properties of flavonoid compounds" in: The chemistry of flavonoid compounds, Geissman TA Ed, Pergamon Press, **107-155**, 1962

Kadykova E.L. ; Gubina S.M. ; Pron'kin A.M. ; Studies on the acidic properties of quercetin as a model of natural dyes for cotton. *Himia drevesiny.* **1-3: 107-111**, 1993.

Kanazawa, K.; Kawasaki, H.; Samejima, K.; Ashida, H.; Danno, G.-i.. Specific Desmutagens (Antimutagens) in Oregano against a Dietary Carcinogen, Trp-P-2, Are Galangin and Quercetin. *J. Agr. Food Chem.* **43(2): 404-9**, 1995.

Kato, R.; Nakadate, T.; Yamamoto, S.; Sugimura, T. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis* **4(10): 1301-5**, 1983.

Kessler M., Ubeau G., Jung L.. Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, **55 : 1-11**, 2002.

Kessler M. Flavonoïdes et dérivés : capteurs de Radicaux libres. Application thérapeutique. *Thèse de Doctorat de Sciences, Nov.2000, Université Louis Pasteur, Strasbourg.*

Kimberly M. M., Goldstein, J. H. Determination of pKa values and total proton distribution pattern of spermidine by carbon-13 nuclear magnetic resonance titrations. *Anal. Chem.* **53(6) : 789-93**, 1981.

Knecht K.T., Mason R.P. In vivo Radical trapping and biliary secretion of Radical adducts of carbon tetrachloride-derived free Radical metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **813-817**, 1988.

Kraljic I. et Yrumbore C.N. p-Nitrosodimethylaniline as an OH Radical scavenger in Radiation chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **Z 2547-2550**, 1965.

Labauve, J.P. Principes fondamentaux. *Pharmacocinétique*, Ed. Masson, Paris **1-426**, 1984.

Lademann Jürgen. Tape stripping in combination with spectroscopic measurements: qualitative analysis of the penetration behavior of sunscreens and drugs into the skin www.skincareforum.com.

Lasker J M., Huang M T., Conney A H In vitro and in vivo activation of oxidative drug metabolism by flavonoids. *J.pharmacol. exp. ther.* **229(1): 162-70**, 1984.

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

Leena A. Nylander-French A tape-stripping method for measuring dermal exposure to multifonctional acrylates *Ann.Occup.Hyg.* **44(8) : 645-651**, 2001.

Le Hir A. Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments *Abrégé de Pharmacie Galénique*, 7e édition, Ed. Masson 1997.

Levy R H; Rowland M Dissociation constants of sparingly soluble substances: nonlogarithmic linear titration curves. *J. Pharm. sciences* **60(8) : 1155-9** 1971.

Liebler D.C., Kling D.S., Reed D.J. Antioxidant protection of phospholipids bilayers by a-tocopherol. *J. Biol. Chem.* **2(51):12114-12119**, 1986.

Lii S., Graig E.A. The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, **63: 1-677**, 1988.

Limasset, B.; le Doucen, C.; Dore, J. Ch.; Ojasoo, T.; Damon, M.; de Paulet, A. C.. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **46(7): 1257-71**, 1993.

Mahmood N; Pizza C; Aquino R; De Tommasi N; Piacente S; Colman S; Burke A; Hay A J. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* **46(7): 1257-71**, 1993.

Mahoney J.R. et Graf E. Raie of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric EDTA as oxidants in the model systems. *J. Food Sci.* **J : 1293-1296**,1986.

Maibach H.I., Wester R.C. Percutaneous absorption: in vivo methods in human and animals. *J. Am. Toxicol.*, **8** : **803-813**, 1989.

MAJ Octobre 2003. Soleil et système immunitaire : il faut renforcer les défenses antioxydantes. www.nutranews.org.

MAJ Septembre 2003. Comment fonctionne un filtre solaire. <http://info.web.cern.ch/info/scitech>

Manach C., Texier O., Morand C., Crespy V., Régéat F., Demigné C., Rémésy C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: **1259-1266** 1999.

Marieb E.N., Anatomie de la peau, *Human anatomy and physiology*. Ed 2.1993

Marty, J.-P.; Payan, J.-P.; Fabry, J.-P.; Beydon, D.; Boudry, I.; Ferrari, E.; Canel, F.; Grandclaude, M.-Ch.; Vincent, C. M.. In vivo and in vitro percutaneous absorption of [¹⁴C]di-N-butyl phthalate in rat. *Drug Met. Disp.* **29(6)** : **843-854**, 2001.

Mc CORD J.M. et Fridovich I. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **24(4)**: **6049-6055**, 1969.

McCord J.M. et Day E.D. Superoxide-dependent production of hydroxyl Radical catalysed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* **139-142**, 1978.

Michelson A.U. Photochemical production of oxygen Radicals. In “*Handbook of methods for oxygen radical research*”, Ed.2, 1986.

Middleton, E. J.; Drzewiecki G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* **33(21)**: **3333-8**, 1984.

Middleton, E. J. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* **34(5)**: **344-348**, 1996.

Mila I.; Scalbert, A. Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, **381(2)** : **749-755**, 1994.

Misra H.P. Adrenochrome essay. *Handbook of methods for oxygen radical research* Ed. 2, , 1986.

Misra H.P. et Fridovich I. The generation of superoxide Radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **241** : 6960-6962, 1972a.

Misra H.P. et Fridovich I. The rote of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple essay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **241** : 3170-3175, 1972b.

Miura Y.H., Tomita I., Watanabe T., Hirayama T., Fukui S. Active oxygens generation by flavonoïds. *Biol. Pharm. Bull.* **21 (2)** : 93-96, 1998.

Mookerjee B K; Lee T P; Logue G P; Lippes H A; Middleton E. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* **213** : 511-20, 1986.

Morand C., Crespy V., Manach C., Besson C., Demigné C., Rémésy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am.J.Physiol.* **275** : R212-R219 1998.

Movileanu, L.; Neagoe, I.; Flonta, M.L.; Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *In. J. Pharm.* **205**: 135-146; 2000

Mucsi I; Pragai B M Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* **41(7)** : 930-1, 1985.

Nellans, H.N. Paracellular intestinal transport : modulation of absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **7** : 339-364, 1991.

Nakadate T; Yamamoto S; Ishii M; Kato R Inhibition of 12-O-tetRadecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity by lipoxygenase inhibitors: possible role of product(s) of lipoxygenase pathway. *Carcinogenesis* **3(12)** : 1411-4, 1982.

Namgoong, S. Y.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Kim, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* **54(5)** : 313-20, 1994.

Naqui A., Chance B. et Cadenas E. Reactive oxygen intermedates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **137-1 66**, 1986.

Negre-Salvayre, Anne; Salvayre, Robert. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Rad. Biol. & Med.* **12(2)** : 101-6, 1992.

Nijhoff W A; Bosboom M A; Smidt M H; Peters W H Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelicalactone and flavone. *The Netherlands Carcinogenesis* **16(3)** : 607-12, 1995.

Nishikimi M. The generation of superoxide anion in the reaction of tetrahydropteridines with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* **166** : 273-279, 1975.

Nishino, Hoyoku; Naito, Eiji; Iwashima, Akio; Tanaka, Kenichi; Matsuura, Takao; Fujiki, Hirota; Sugimura, Takashi. Interaction between quercetin and calcium-calmodulin complex: possible mechanism for anti-tumor-promoting action of the flavonoid. *Gann* **75(4)** : 311-16, 1984.

Obermeier M T; White R E; Yang C S. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res.* **25(6)** : 575-84, 1995.

Ohemeng, K. A.; Schwender, C. F.; Fu, K. P.; Barrett, J. F. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3(2)** : 225-30, 1993.

Ono, K.; Nakane, H.; Fukushima, M.; Chermann, J. C.; Barre-Sinoussi, F.. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* **190(3)** : 469-76, 1990.

Ono, K.; Nakane, H.. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.* **108(4)** : 609-13, 1990.

Péchiné J.-M.. Etude de l'absorption en U.V. des crèmes solaires.
<http://www.unice.fr/cdiac/congres/>

Pharmacopée Européenne 4e édition. Prescriptions générales – Préparations semi-solides pour application cutanée.

Powell, D.W. Barrier fonction of epithelia. *Am. J. Physiol.* **241** : G275-G288, 1981.

Rao P.S., Luber J.M.Jr., Milinowicy J., Lalezar P. et Mueller H.S. Specificity of oxygen Radical scavengers and assesment of free Radical scavenger efficiency using luminol enhanced chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39-44**, 1988.

Read, M. A. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *Am.. J. Pathol.* **147(2)** : 235-7, 1995.

Read G.; Randat R. Structure and properties of thiobarbituric acid malonaldehyde chromogen. *J. Chem. Soc.* **1103-1105**, 1988.

Reddy Micaela B; Stinchcomb Audra L; Guy Richard H; Bunge Annette L Determining dermal absorption parameters in vivo from tape strip data. *Pharmaceutical research* **19(3) : 292-8**, 2002.

Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* **32 (1) :17-27**, 1996.

Richmond R., Halliweli B., Chauhan J. et Darbre A. Superoxide-dependent formation of hydroxyl Radical: detection of hydroxyl Radical by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal. Biochem.* **328-335**, 1981.

Roengsumran, S.; Petsom, A.; Ngamrojanavanich, N.; Rugsilp, T.; Sittiwicheanwong, P.; Khorphueng, P.; Cherdshewasart, W.; Chaichantipyuth, C.. Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. *J. Scient.c Research of Chulalongkorn University* **25(1) : 169-176**, 2000.

Rosset R., Baller D., Desbarres J. *Chimie analytique des solutions et microinformatique Ed. Masson et Cie*, 1979.

Rougier A., Lotte C., Dupuis D. In vivo percutaneous absorption: a key role for SC / vehicle partitioning. *Arch. Dermatol. Res.* **282 : 498-505**, 1990.

Ruddock G.W., Raleigh J.A. et Greenstock C.L. Reactivity of chemically generated superoxide Radical anion with peroxides as determined by competition kinetics. *Biochem. Biophys. Commun.* **102 : 554-560**, 1981.

Rybachenko, A.I. ; Titov, E.B. ; georgievskii, V.P. ; Gordienko, V.G. ; Rybachenko, V.I. Acid–base properties and structure of natural flavonoid compounds. *Ukrainskij Himia Eskij.Zurnal* **47 (9) : 944-948**, 1981.

Sagone A.L., Decker M.A., Wells R.M. et DeMocko C. A new method for the detection of hydroxyl Radical production by phagocytic celis. *Biochim. Biophys. Acta.* **90-102**, 1980.*

Salter, D.; Custead-Jones, S.; Cook, J.; Quercetin inhibits Hexose transport in a human Diploid Fibroblast. *J. Membrane Biol.*, **40: 67-76**, 1978.

Sato, M.; Tsuchiya, H.; Takase, I.; Kureshiro, H.; Tanigaki, S.; Iinuma, M. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.* **9(7)** : 509-12, 1995.

Sawyer D., Yamaguchi K. Calderwod T.S. Electrochemical generation of superoxide ion and other oxygen Radicals. In "*Handbook of methods for oxygen radical research*" **65-69**, 1986.

Sawyer, D. T.; Gibian, M. J. The chemistry of superoxide ion. *Tetrahedron* **35(12)** : 1471-81, 1979.

Shaefer H., Lamajid E. Standardization of experimental models. *Pharmacol. Skin*, **1** : 77-80, 1987.

Schisler N.J., Singh S.M. Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med.* **7** : 117-123, 1989.

Schmitt D. *Biologie de la peau humaine*. Editions Inserm, 1995.

Scrapa M., Stevanato R., Viglino P. et Rigo A. Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecule oxygen. *J. Biol. Chem.* **6695-6697**, 1983.

Schmitt, A.; Salvayre, R.; Delchambre, J.; Negre-Salvayre, A.. Prevention by a-tocopherol and rutin of glutathione and ATP depletion induced by oxidized LDL in cultured endothelial cells. *Brit. J. Pharmacol.* **116(3)** : 1985-90, 1995.

Seller M., Martini M.C. Formes pharmaceutiques pour application locale, *Galenica Technique et doc* 1996.

Singal P.K., Petkau A. Gerrard J.M. Free Radicals in health and disease. *Mol. Cell. Biochem.* **121-122**, 1988.

Sinha B.K., Mimnaugh E.G., Myers C.E. Adryamicin activation and oxygen free Radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res.* **49** : 3844-3848, 1989.

Slivka A. et Cohen G. Hydroxyl Radical attack on dopamine. *J. Biol. Chem.* **15466-15472**, 1985.

Speakman, J. C. The determination of the thermodynamic dissociation constants of dibasic acids. *J. Chem. Soc.* **855-9**, 1940.

Spedding G., Ratty A., Middleton E. J. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.* **12(2) : 99-110**, 1989.

Stadtman, Earl R. Protein oxidation and aging. *Science* **257(5074) : 1220-4**, 1992.

Stavric, B.; Klassen, R. Dietary effects on the uptake of benzopyrene. *Food chem. toxicol.* **32(8) : 727-34**, 1994.

SubiRade I; Fernandez Y; Periquet A; Mitjavila S. Catechin protection of 3T3 Swiss fibroblasts in culture under oxidative stress. *Biol. trace elem. Res.* **47(1-3) : 313-9**, 1995.

Szent-Gyorgy, Albert. Therapeutic properties of vitamins. *Presse Medicale* **46 (995) : 1893-1971**, 1938.

Thornalley P.J. et Bannister J.V. The spin trapping of superoxide Radicals. In "*Handbook of methods for oxygen radical research*" **133-1 36**, 1986.

Ubeaud G., Habilitation à Diriger des Recherches (*HDR*), 2001, Université Louis Pasteur, Strasbourg..

Van Acker, S; A. B. E.; Tromp, M; N. J. L.; Haenen, G; R. M. M.; van der Vijgh, W; J. F.; Bast, A;. Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **214(3) : 755-9**, 1995.

Verma, A. K.; Johnson, J. A.; Gould, M. N.; Tanner, M. A. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* **48(20) : 5754-8**, 1988.

Verma, A. K.; Boutwell, R. K.. Intracellular calcium and skin tumor promotion: calcium regulation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **101(2): 375-83**, 1981.

Vrijssen R; E. L; Van Hoof L M; Vlietinck A J; Vanden Berghe D A; Boeye A The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antivir. Res.* **7(1)** : 35-42, 1987.

Ward J. Free Radicals, antioxidants and preventive geriatrics. *Austr. J. Physic.* **23(7)** : 1297-301, 1994.

Wattenberg, Lee W. Anticarcinogenic effects of several minor dietary components. *Foods, Proc. Int. Conf.* **157-66**, 1983.

Wilson. M., Coscia C. Improved Synthesis of 3,4-Dihydroxyphénylpyruvique acid. *J. Org. Chem.* **44(2)**, 1979.

Winterbourn C.C. The ability of scavengers to distinguish OH production in the iron-catalysed Haber-Weiss reaction: comparison of four assays for OH. *Free Radical Bio. Med.* **33-39**, 1987.

Whitehead, T;P.; Robinson, D;; Allaway, S;; Syms, J;; Hale, A;. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin. Chem.* **41(1)** : 32-5, 1995.

Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J.Agr. Food Chem.* **45** : 30-34, 1997.

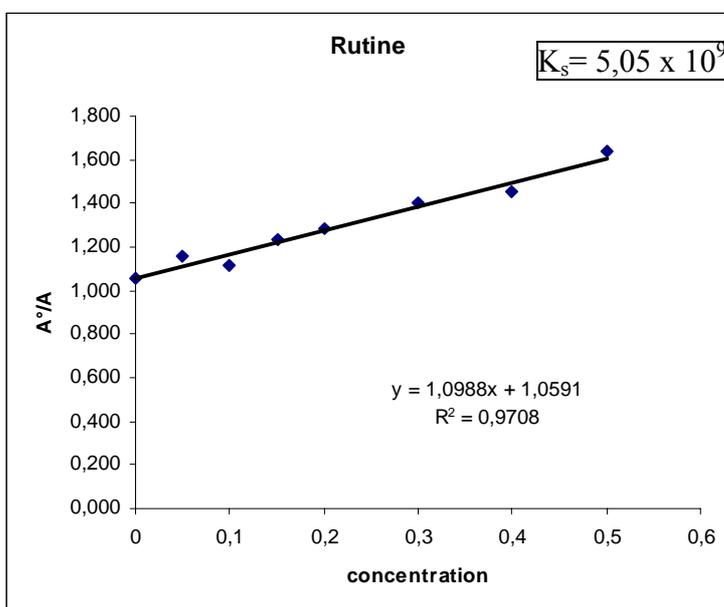
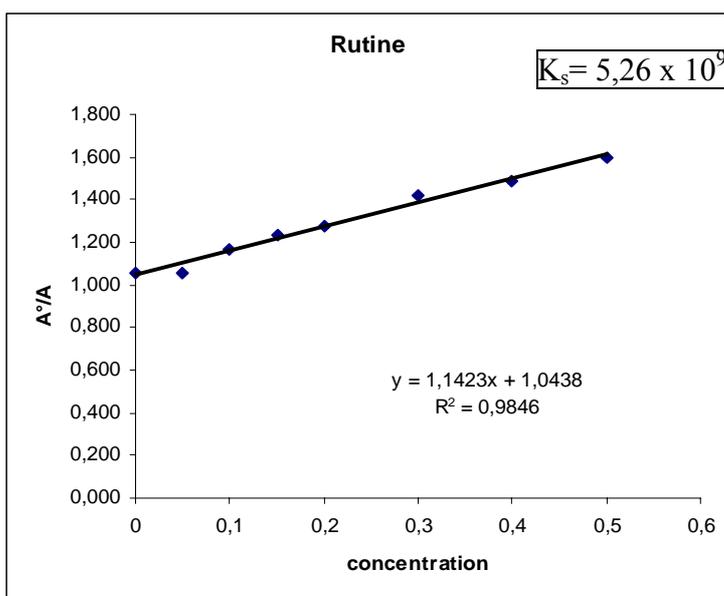
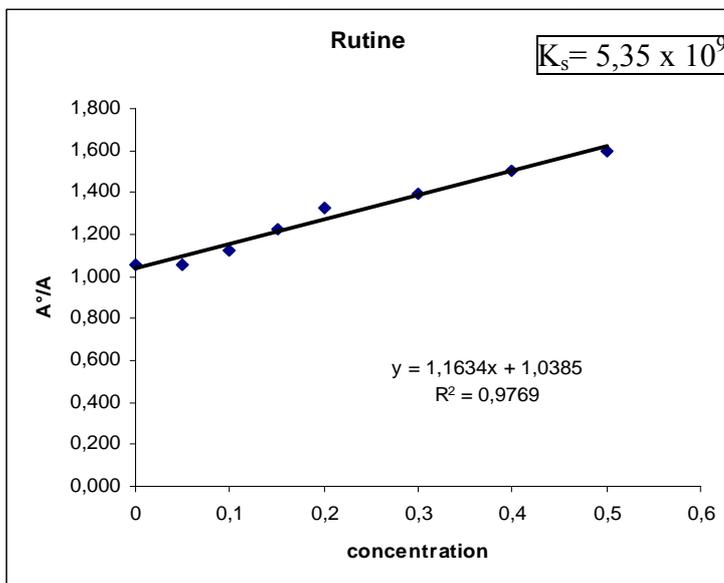
Yoshino, K.; Tomita, I.; Sano, M.; Oguni, I.; Hara, Y.; Nakano, M. Effects of long-term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Media, Pennsylvania* **17(3)** : 79-85, 1994.

Zhao M.J. Dérivés acides amines de chromophores photoprotecteurs : étude de leurs interactions avec des espèces oxygénées Radicalaires et l'oxygène singulet. *Thèse de Doctorat Sciences, Université Louis Pasteur Strasbourg*, 1991.

Zhao M.J., Jung L. Kinetics of the competitive degradation of desoxyribose and other molecules by hydroxyl Radicals produced by the Fenton reaction in the presence of ascorbique acid. *Free radical Res.* **23(3)** : 229-243, 1995.

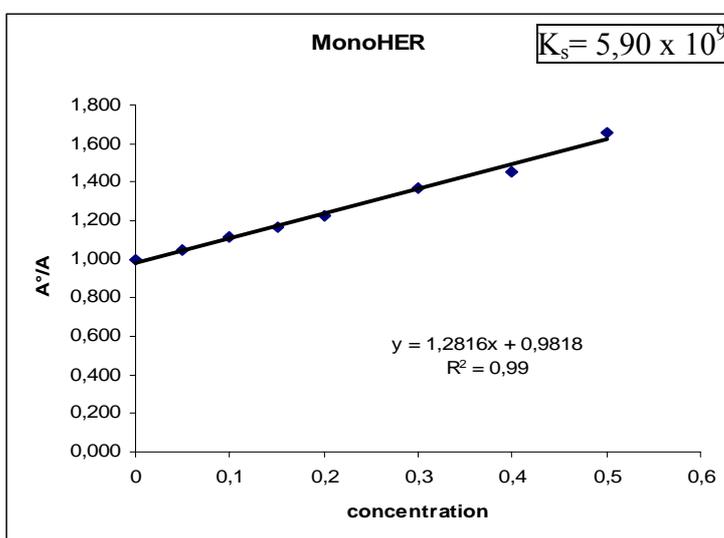
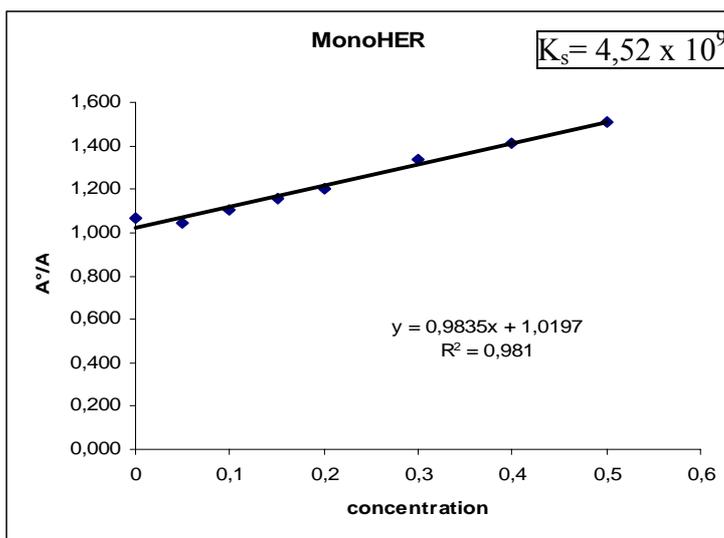
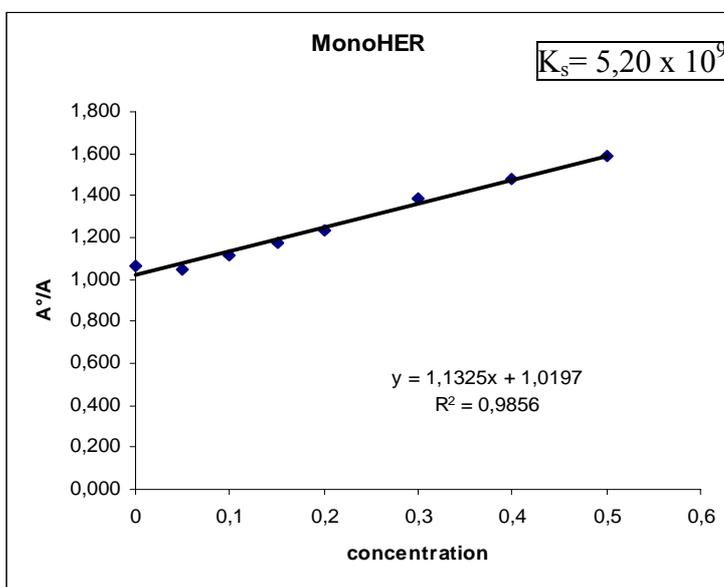
ANNEXE 1

Résultats de capture des radicaux hydroxyles



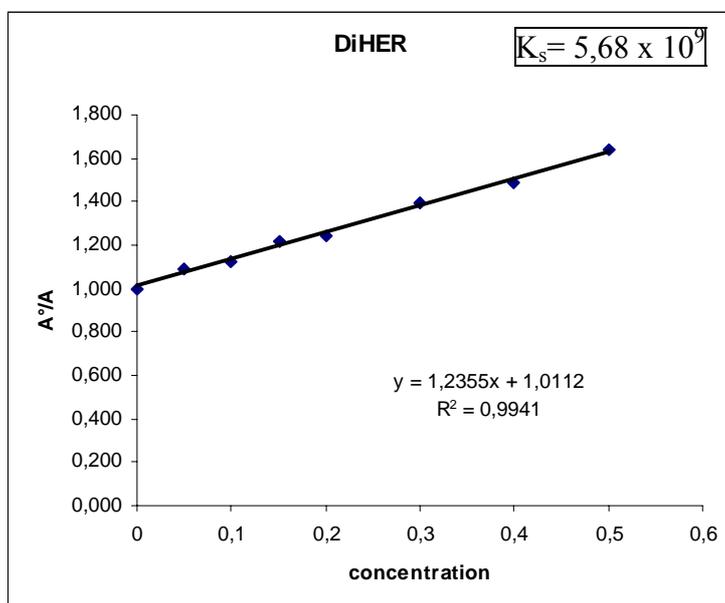
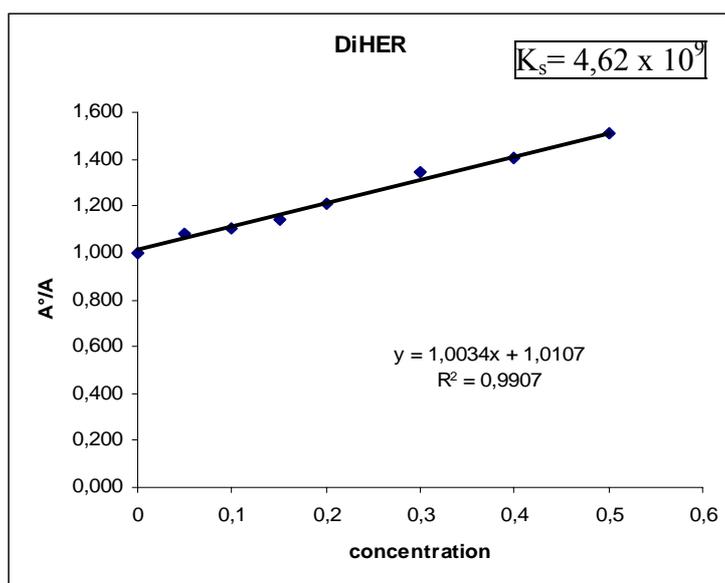
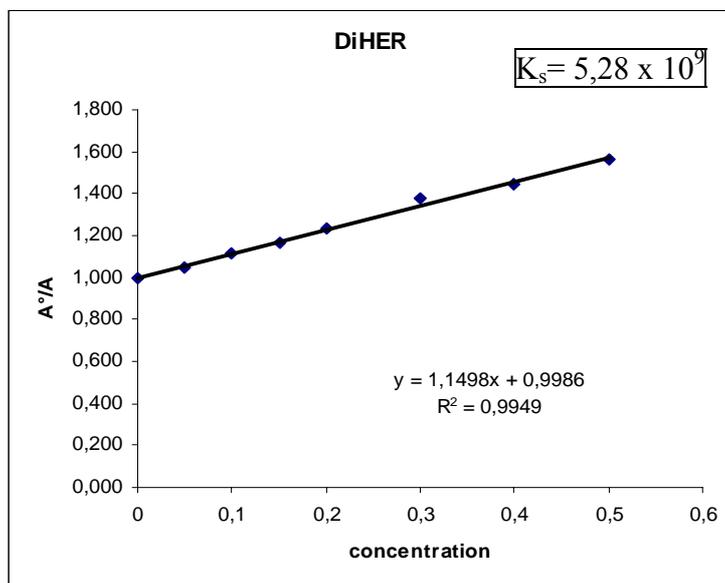
ANNEXE 2

Résultats de capture des radicaux hydroxyles



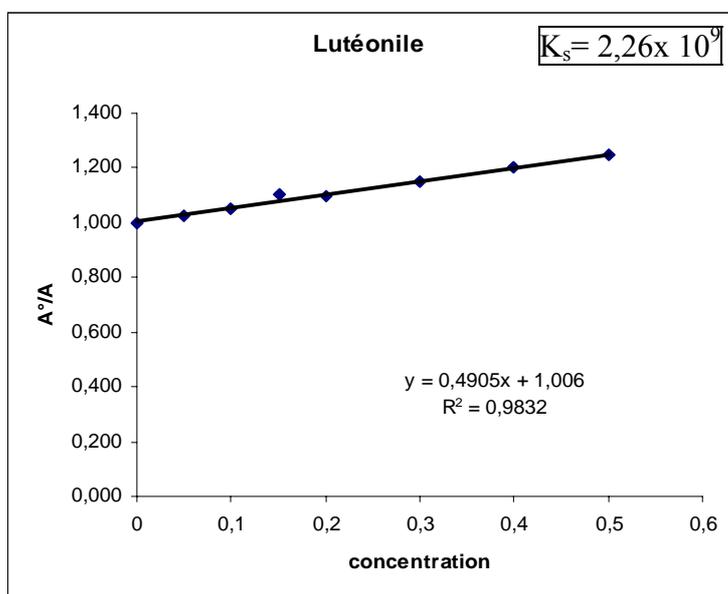
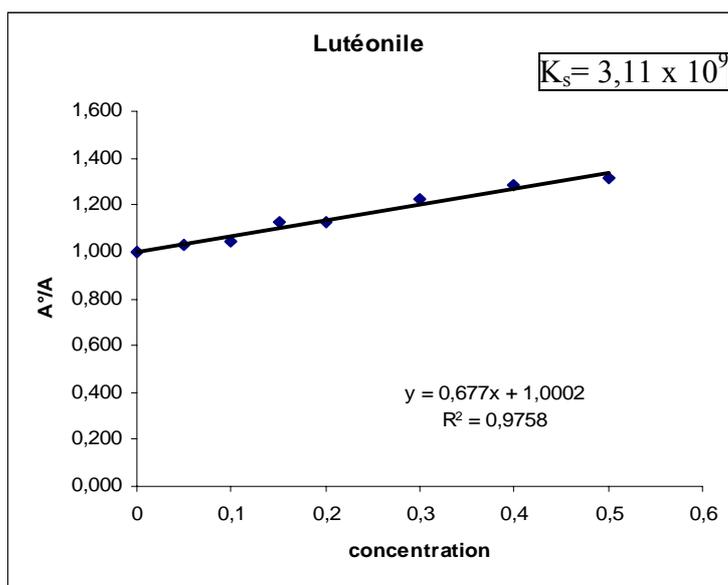
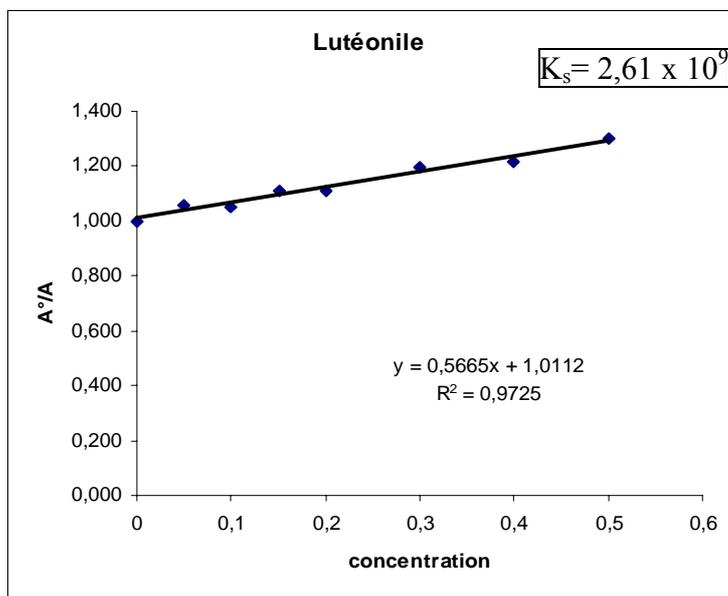
ANNEXE 3

Résultats de capture des radicaux hydroxyles



ANNEXE 4

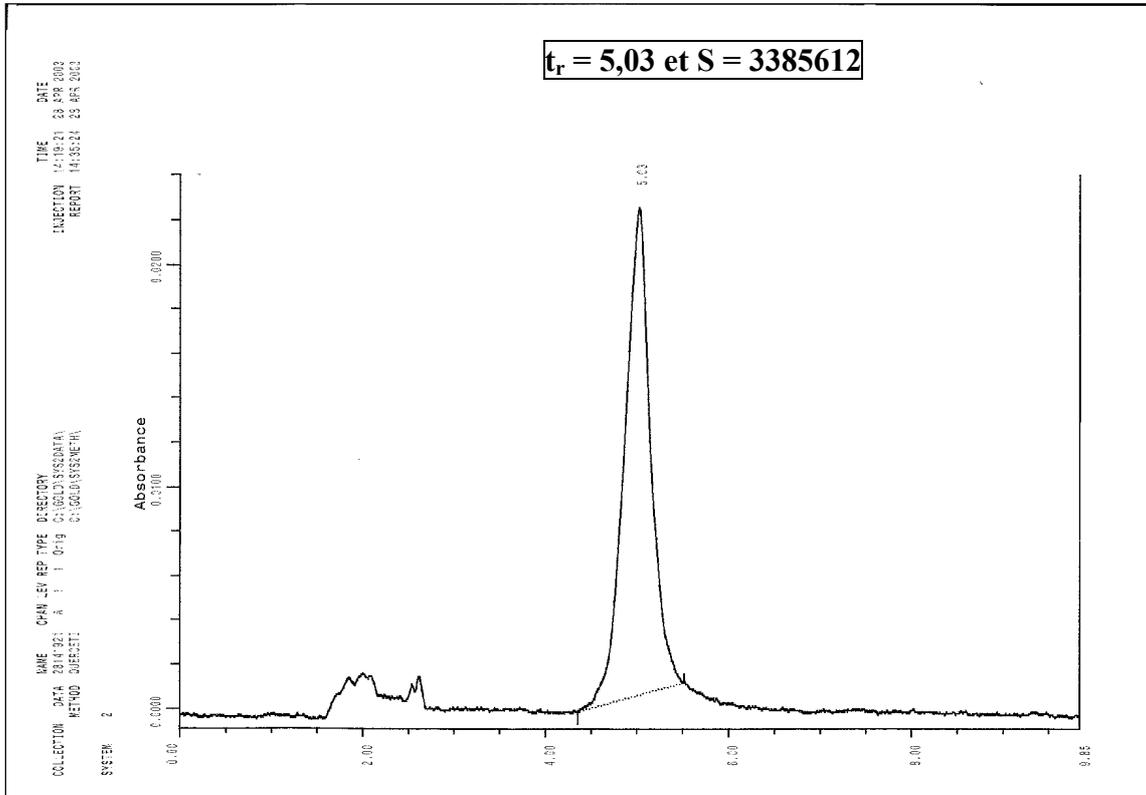
Résultats de capture des radicaux hydroxyles



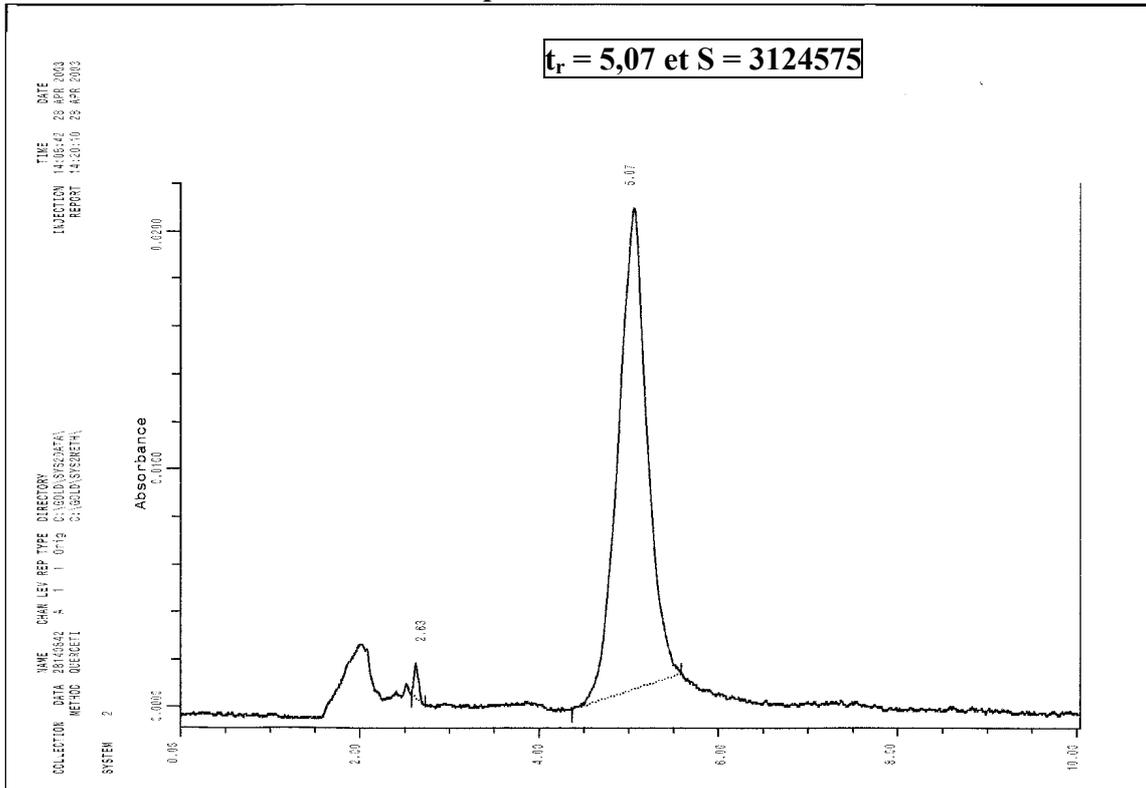
ANNEXE 5

Chromatogramme de la Quercétine avant et après incubation à pH 10

Avant incubation



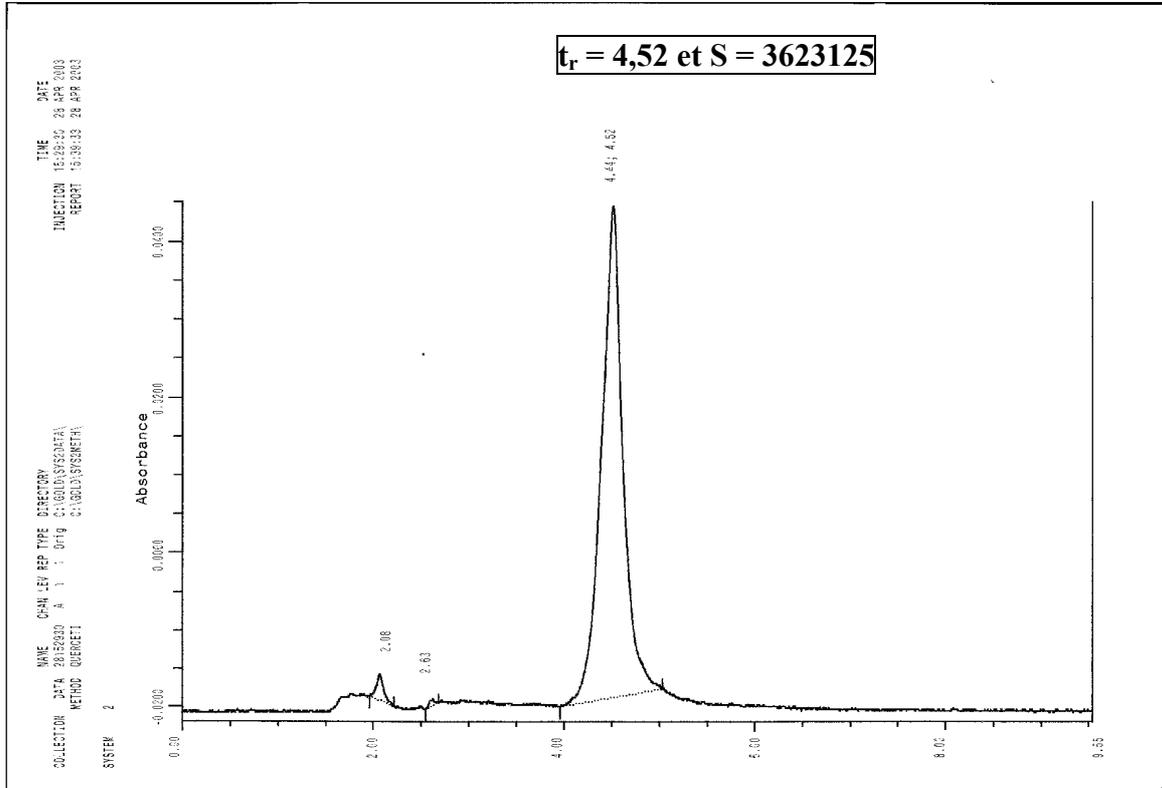
Après incubation



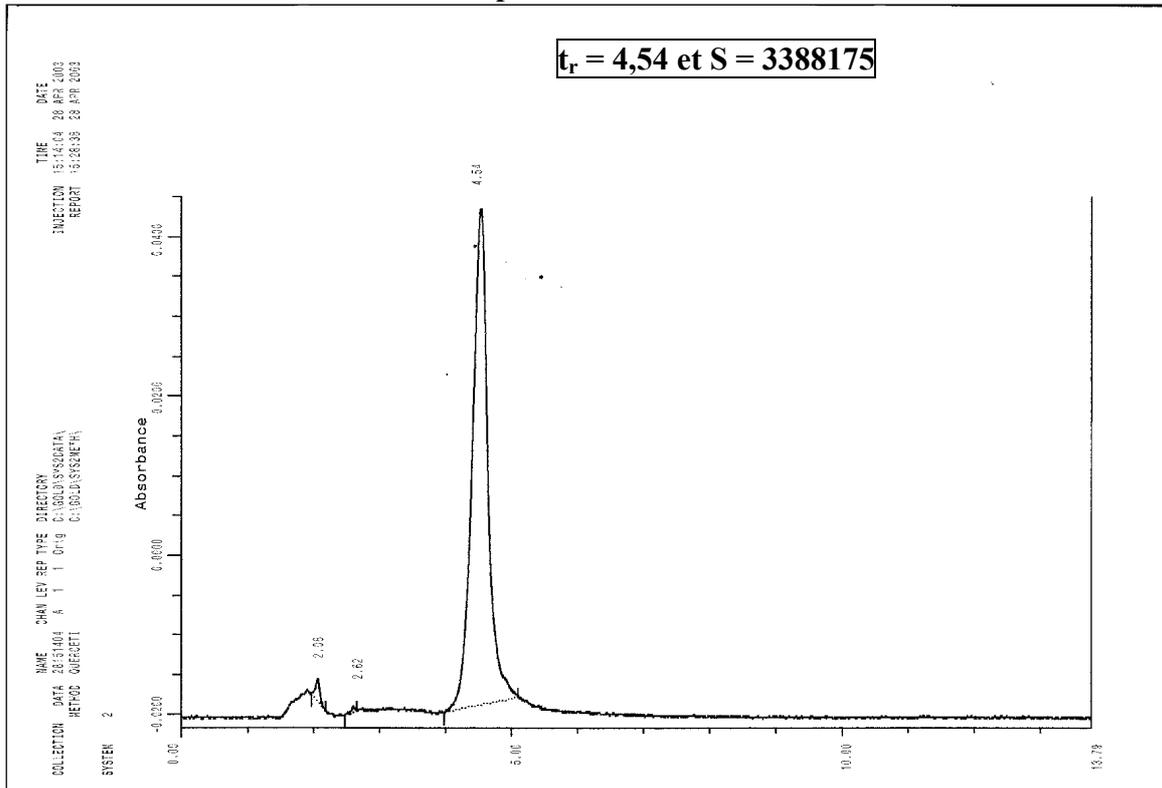
ANNEXE 6

Chromatogramme du MonoHEQ avant et après incubation à pH 10

Avant incubation



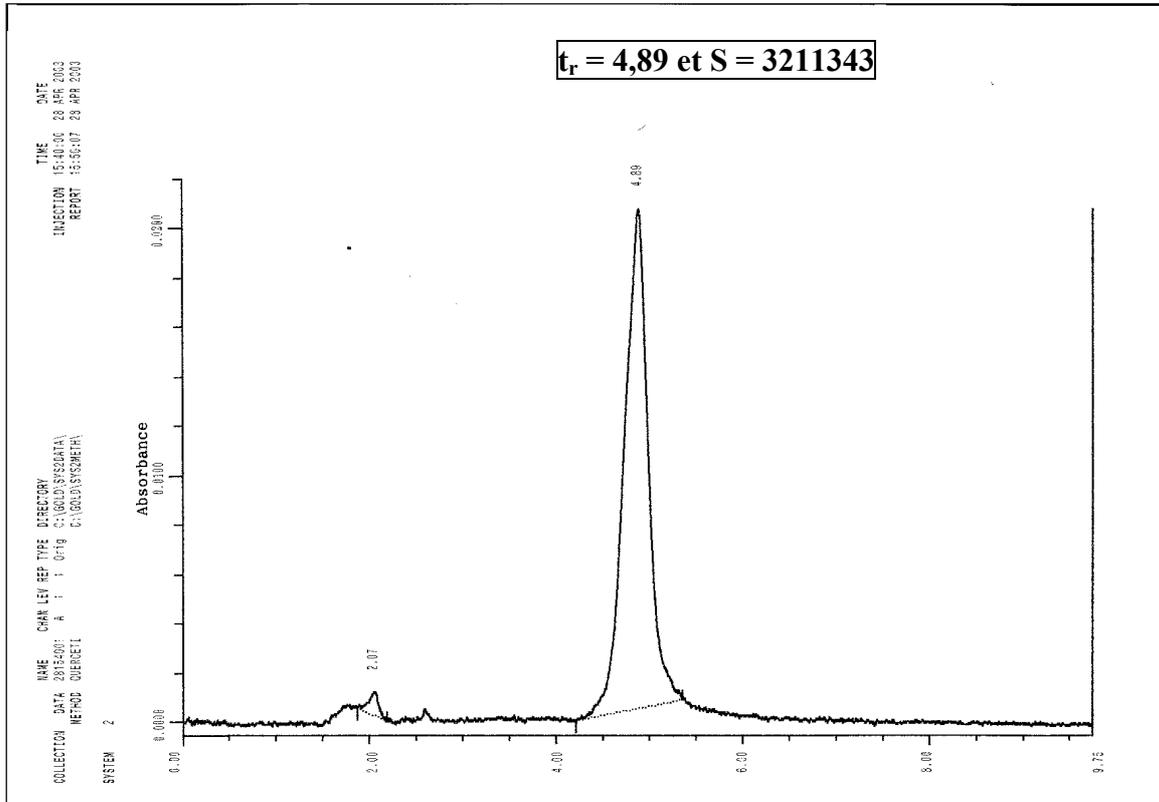
Après incubation



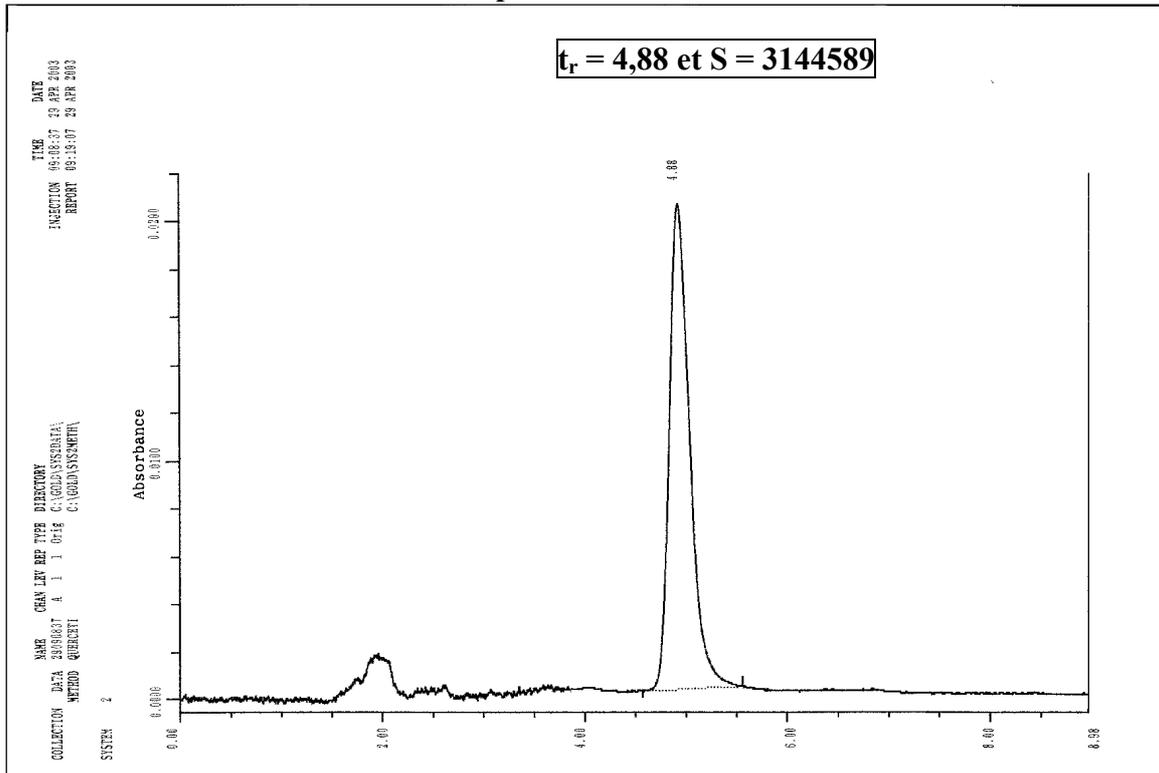
ANNEXE 7

Chromatogramme de la DiHEQ avant et après incubation à pH 10

Avant incubation



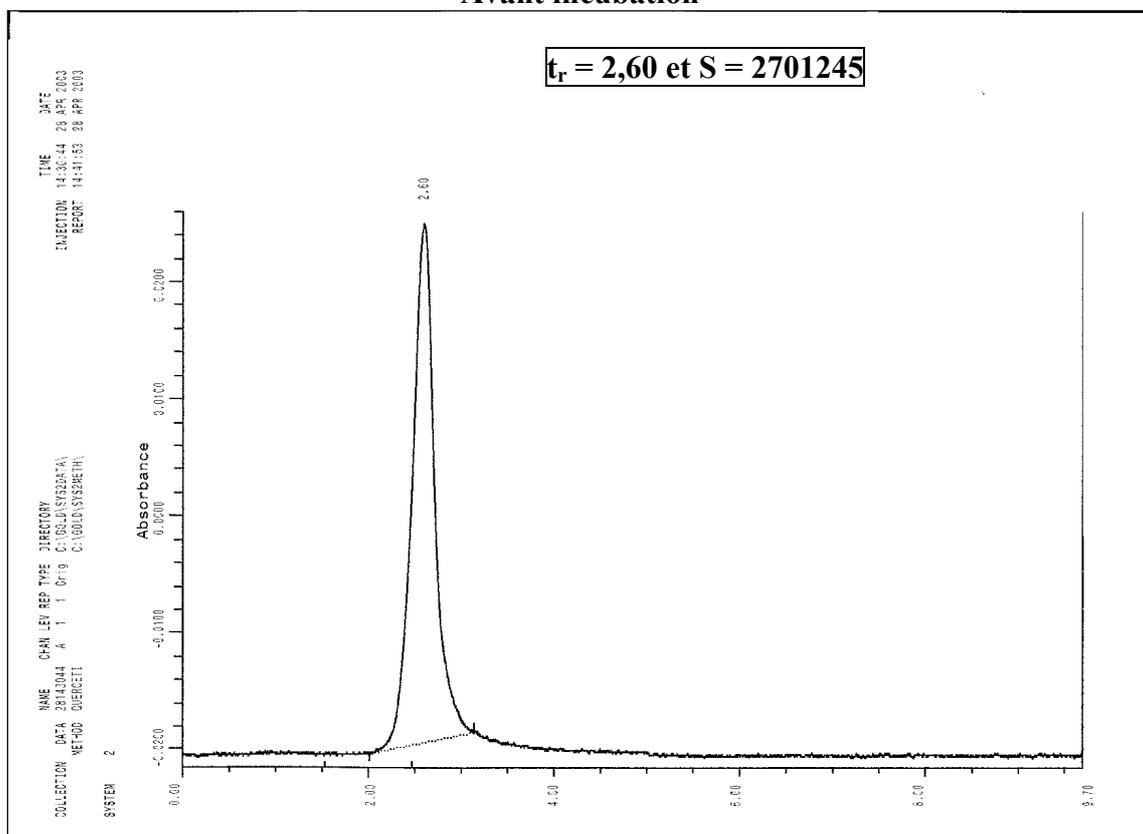
Après incubation



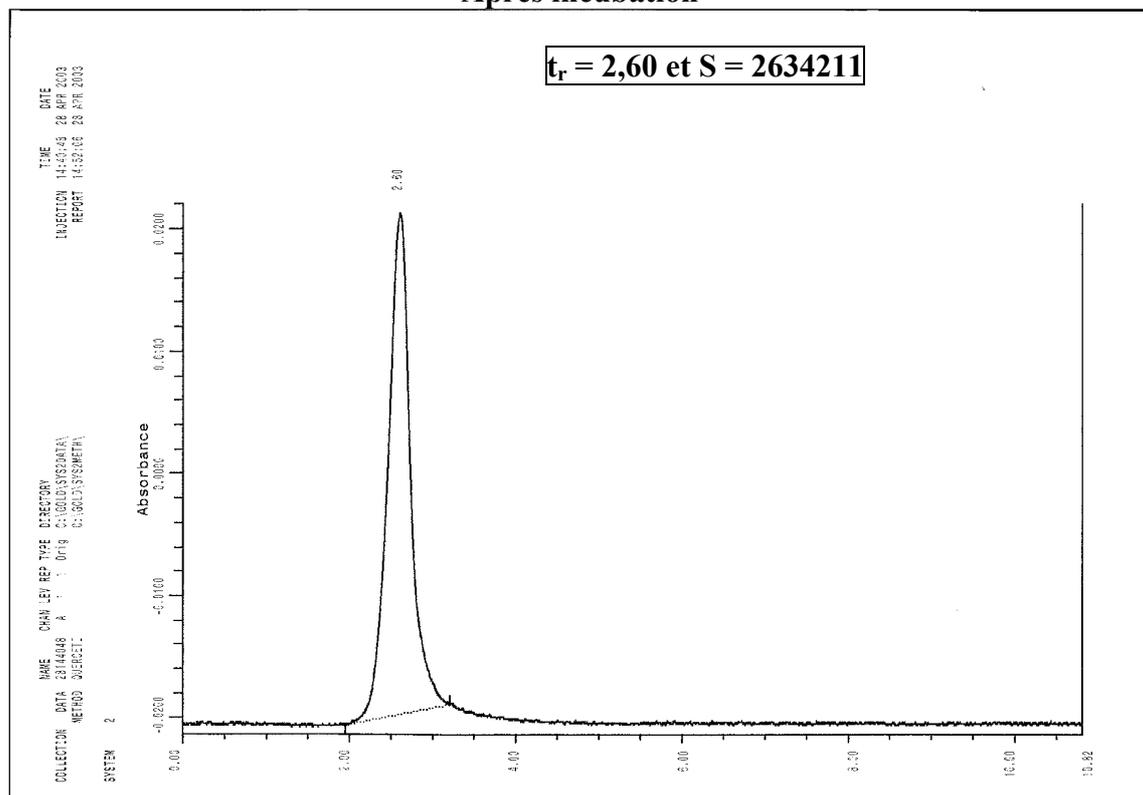
ANNEXE 8

Chromatogramme de la Rutine avant et après incubation à pH 10

Avant incubation



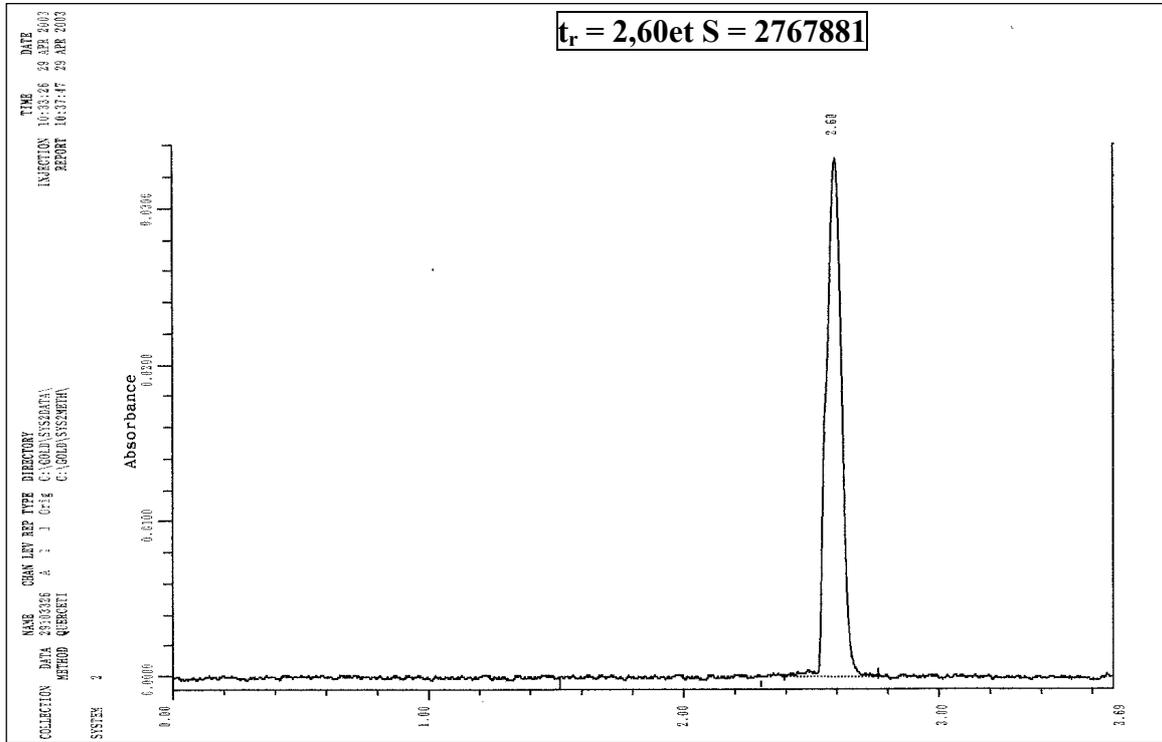
Après incubation



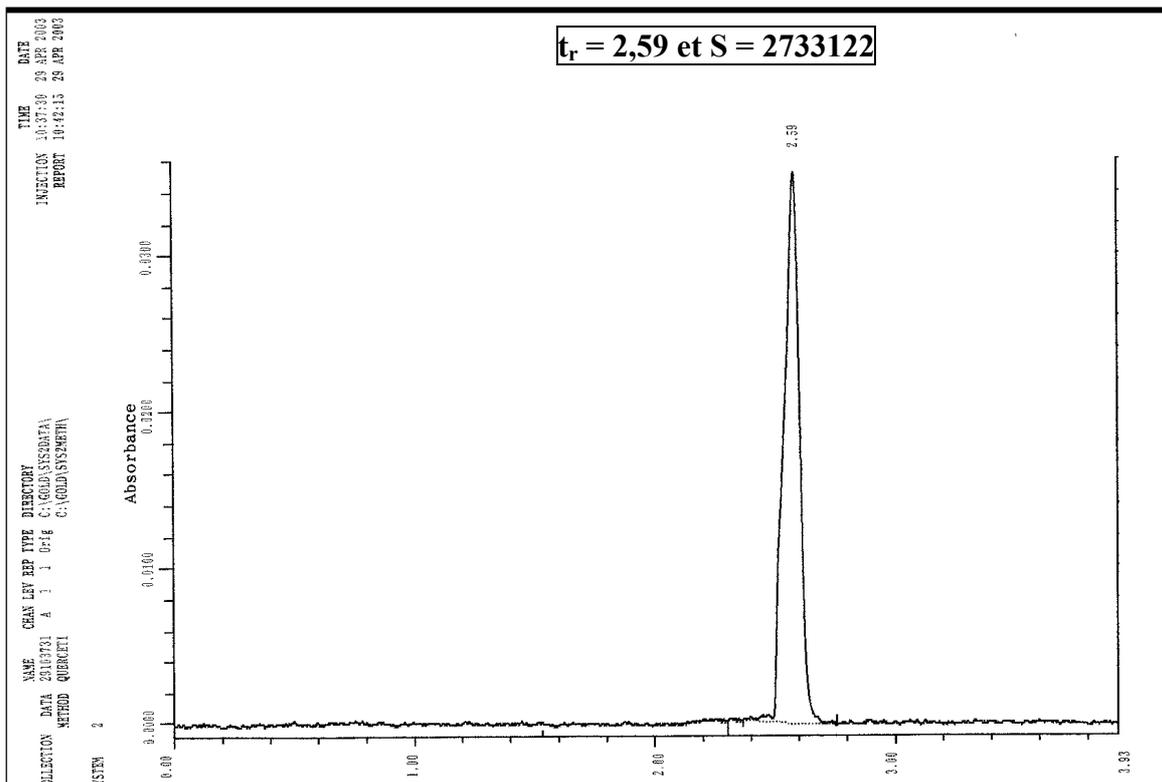
ANNEXE 9

Chromatogramme du MonoHER avant et après incubation à pH 10

Avant incubation



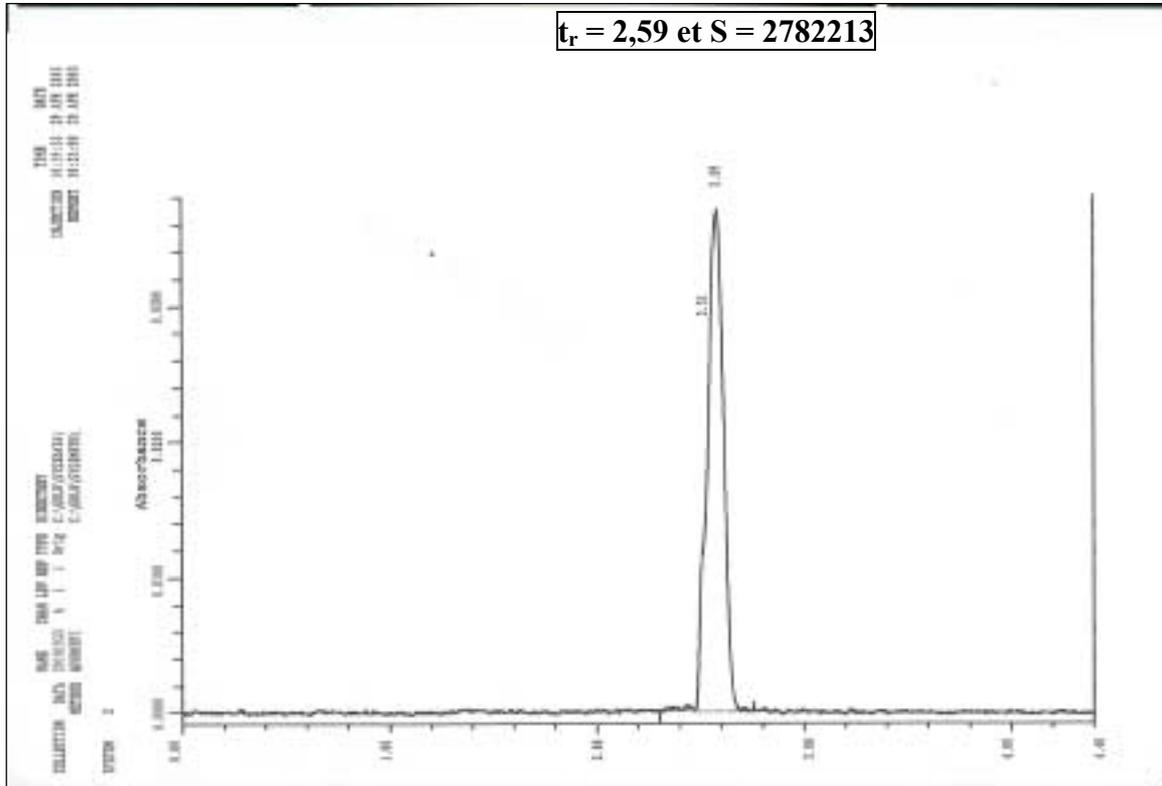
Après incubation



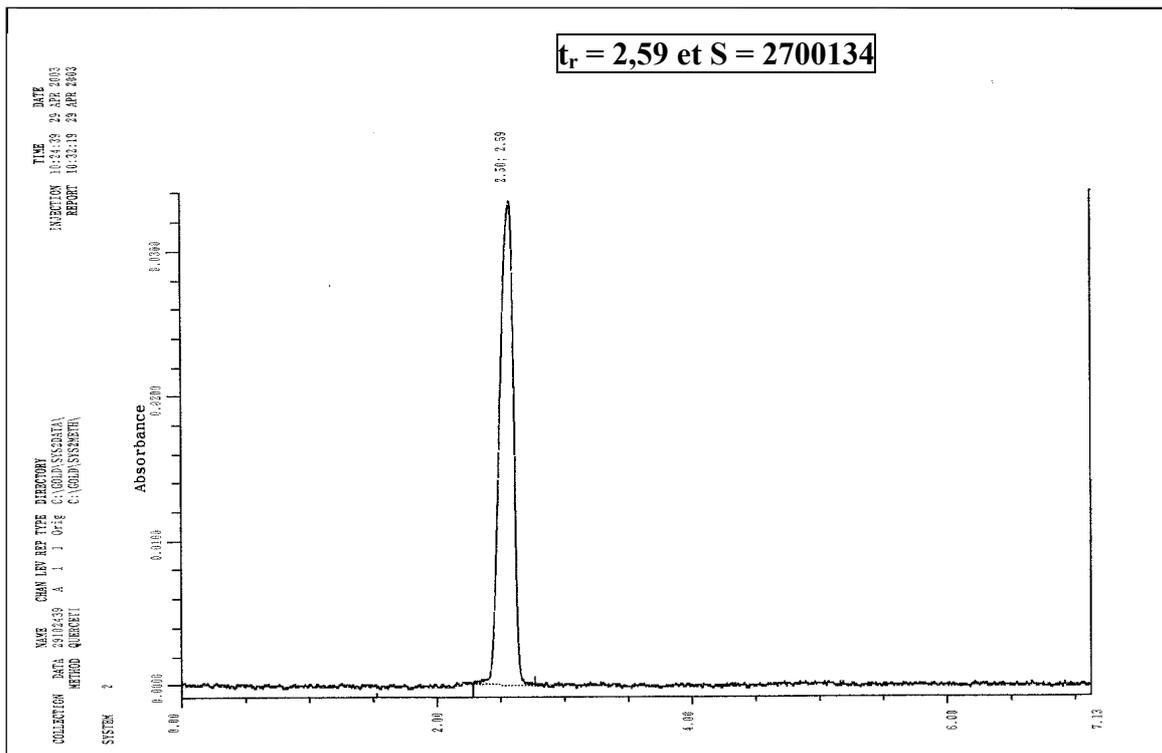
ANNEXE 10

Chromatogramme de la DiHER avant et après incubation à pH 10

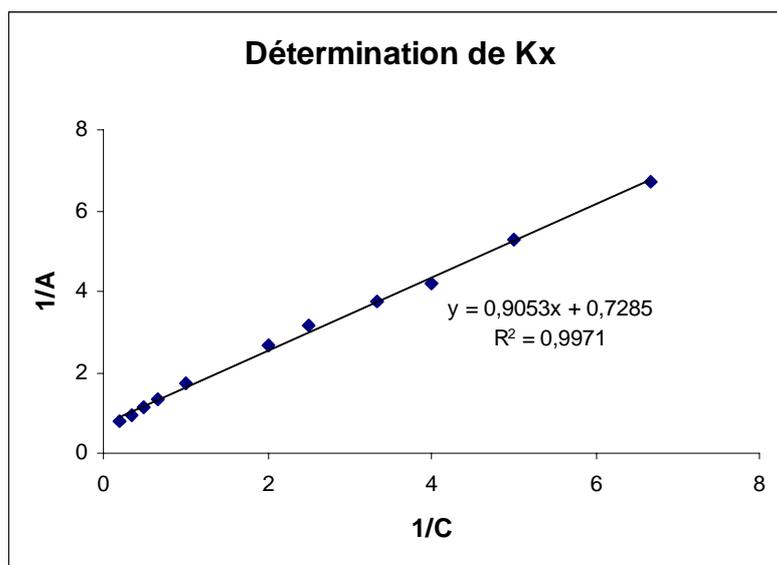
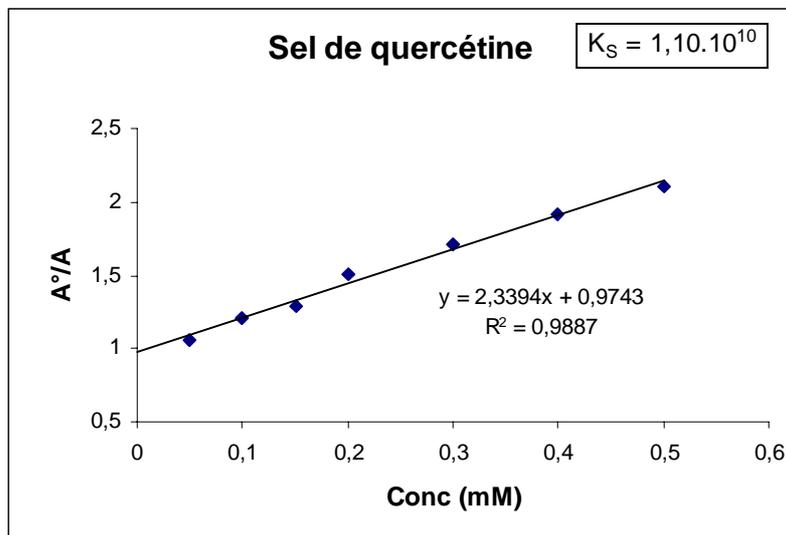
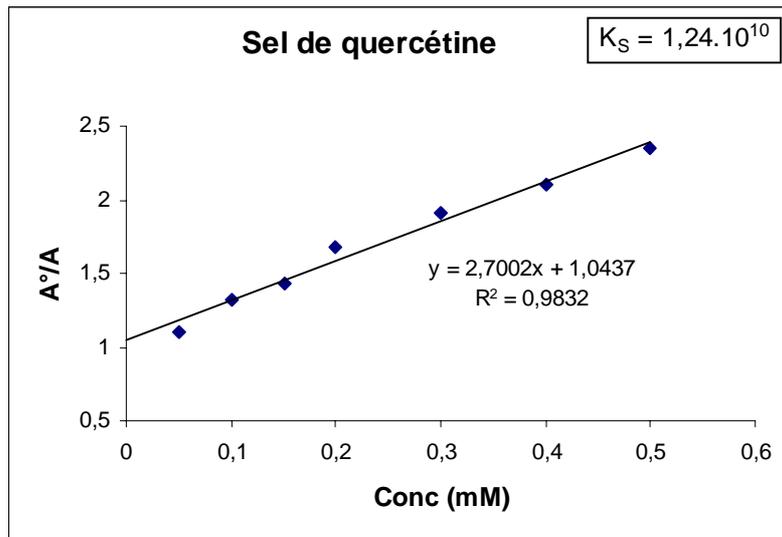
Avant incubation



Après incubation

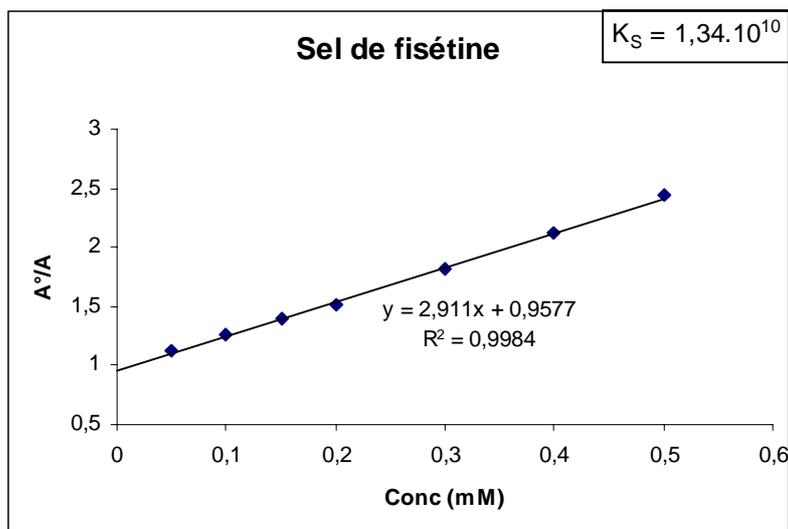
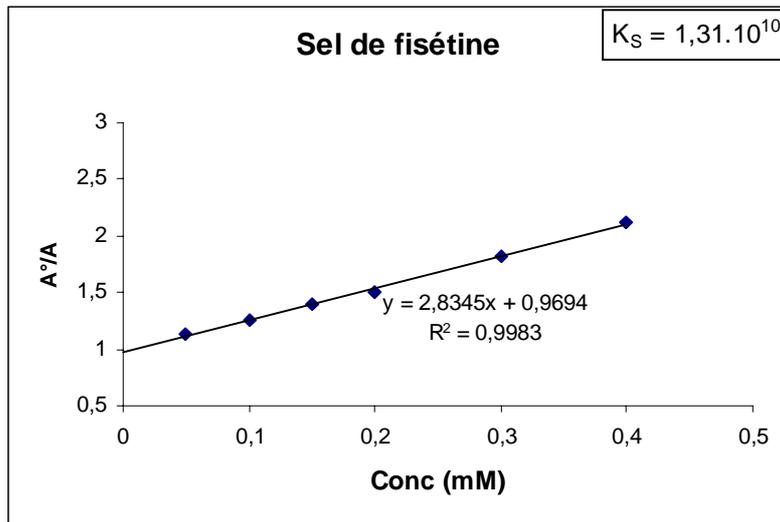
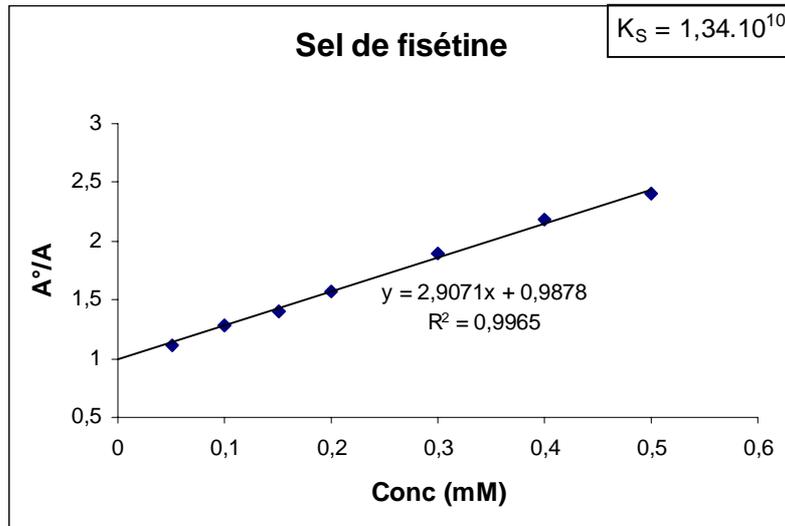


Résultats de capture des radicaux hydroxyles par les sels

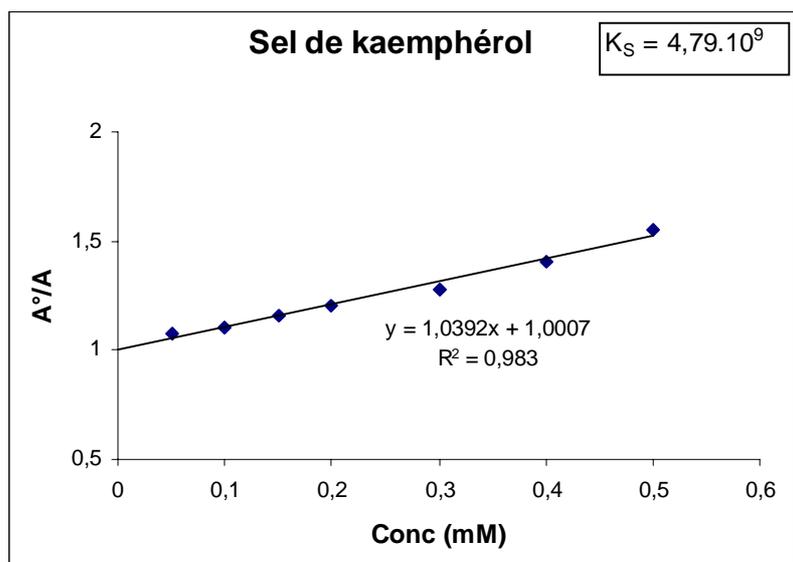
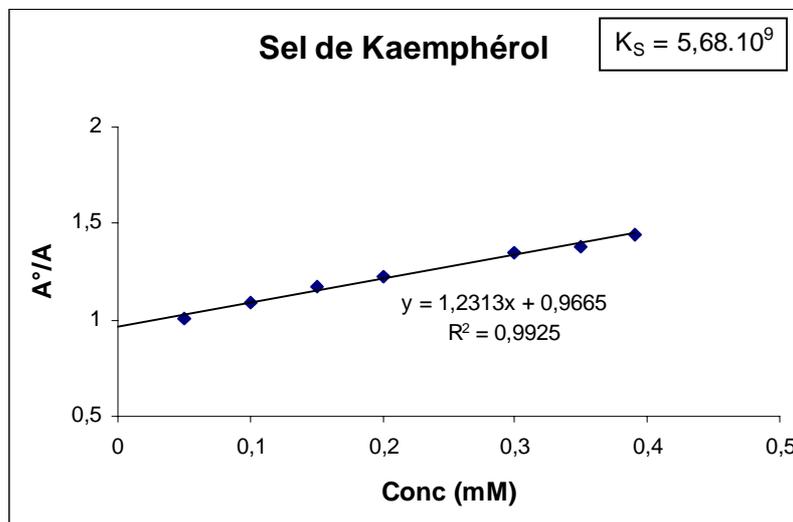
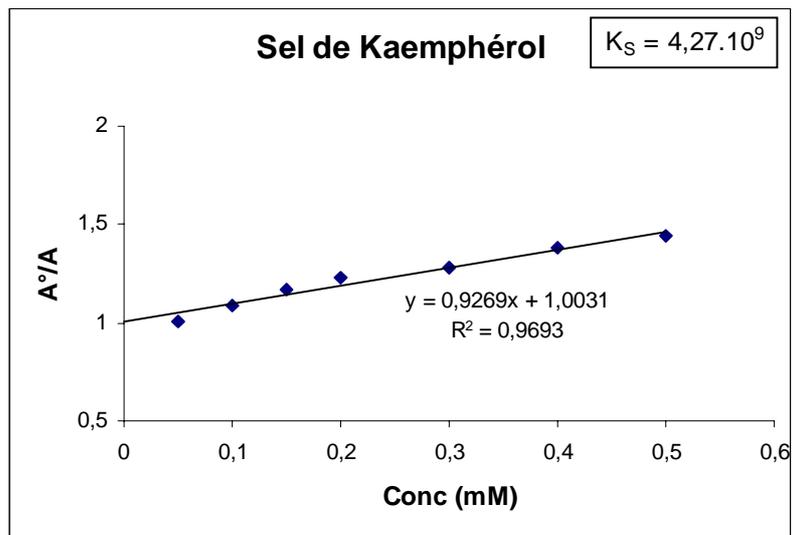


$$K_x = \frac{a}{b} \times K_D = 3,11 \cdot 10^9$$

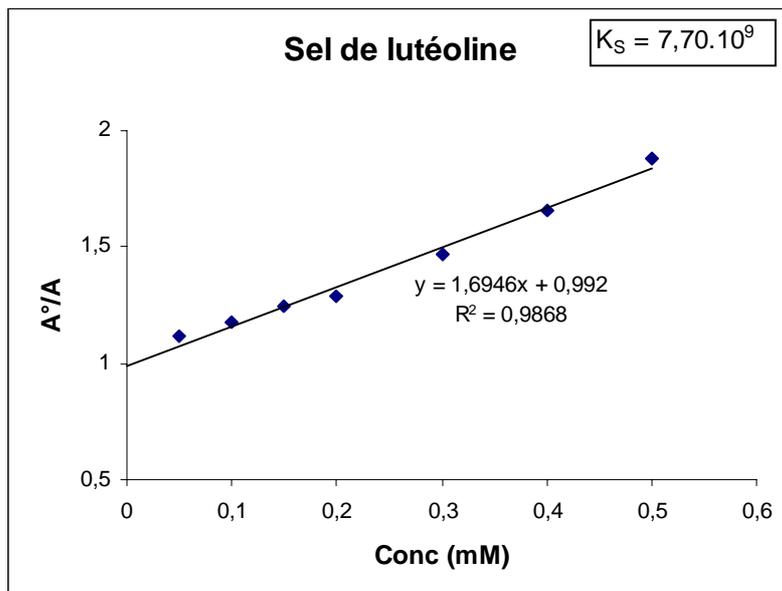
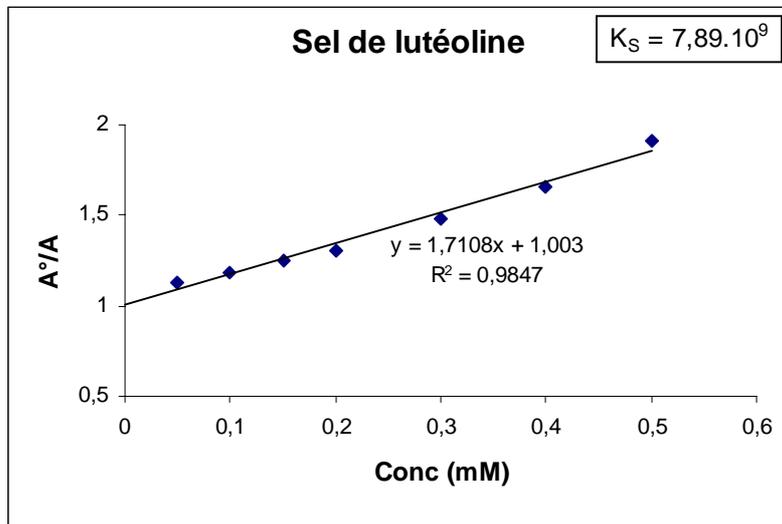
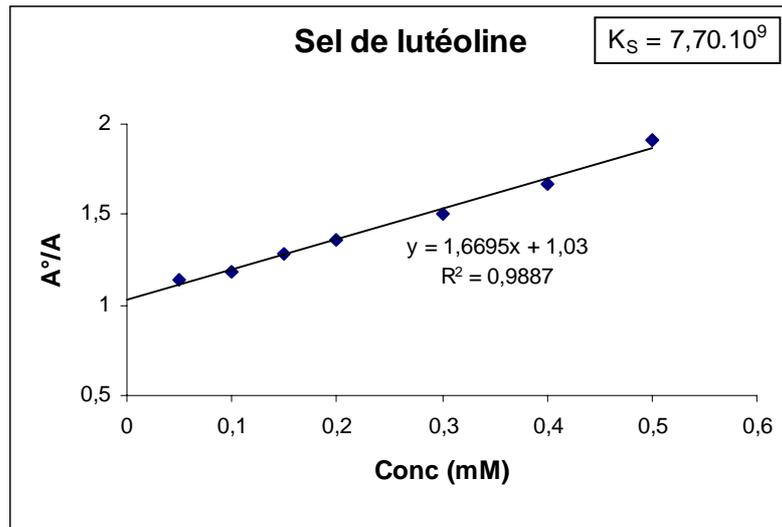
Résultats de capture des radicaux hydroxyles par les sels



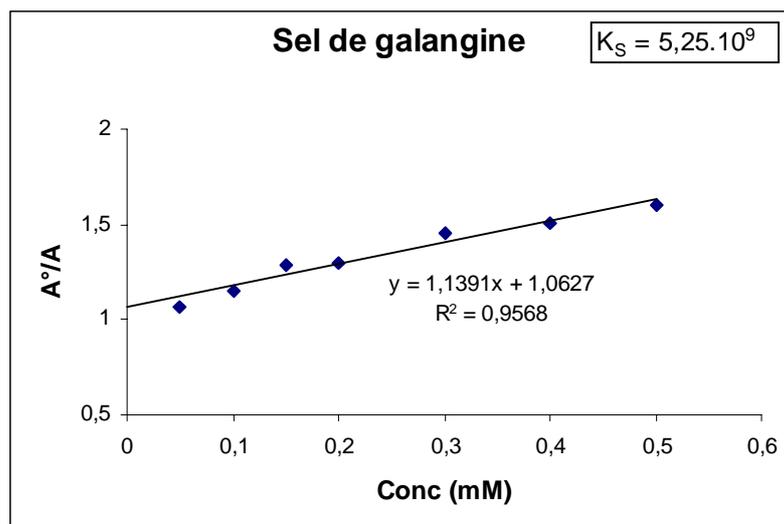
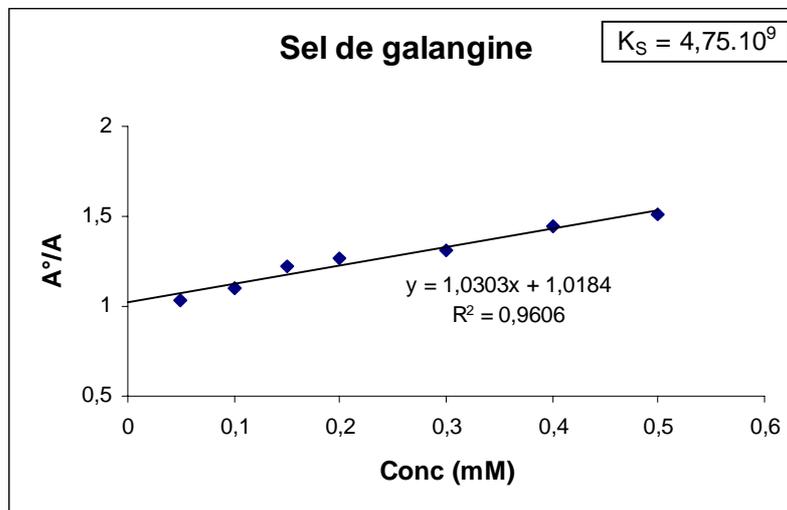
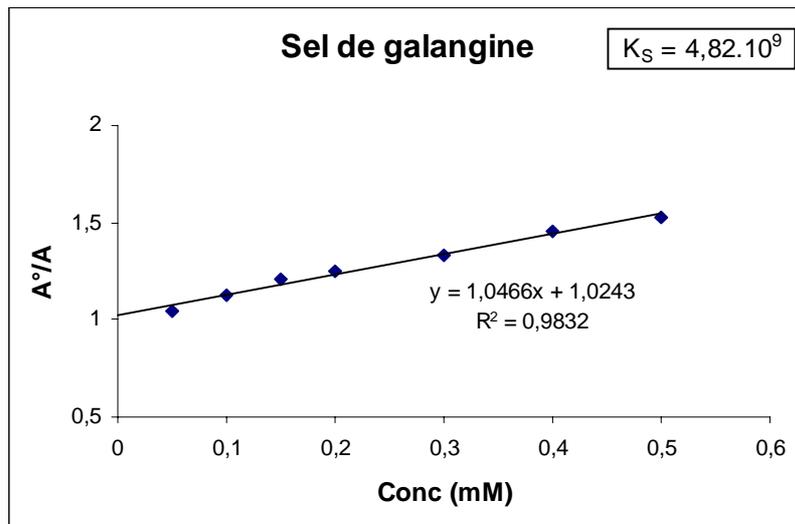
Résultats de capture des radicaux hydroxyles par les sels



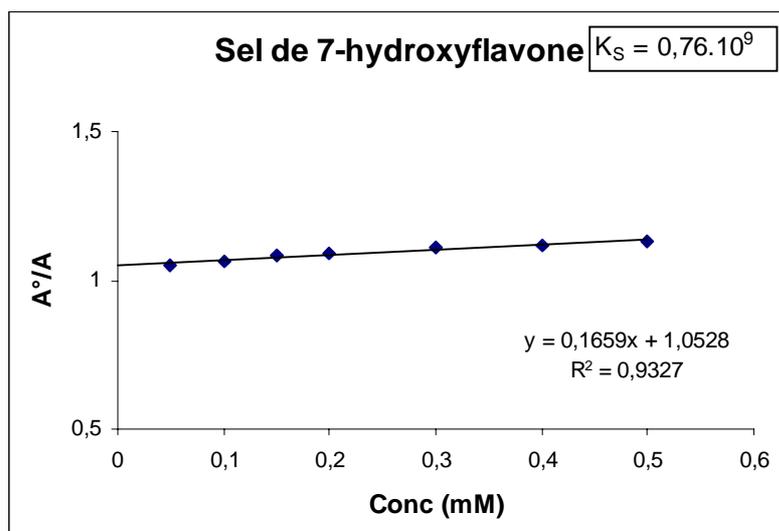
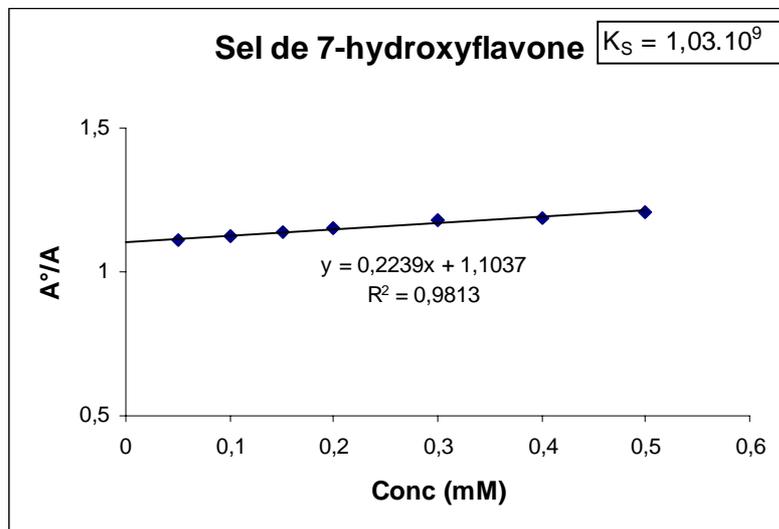
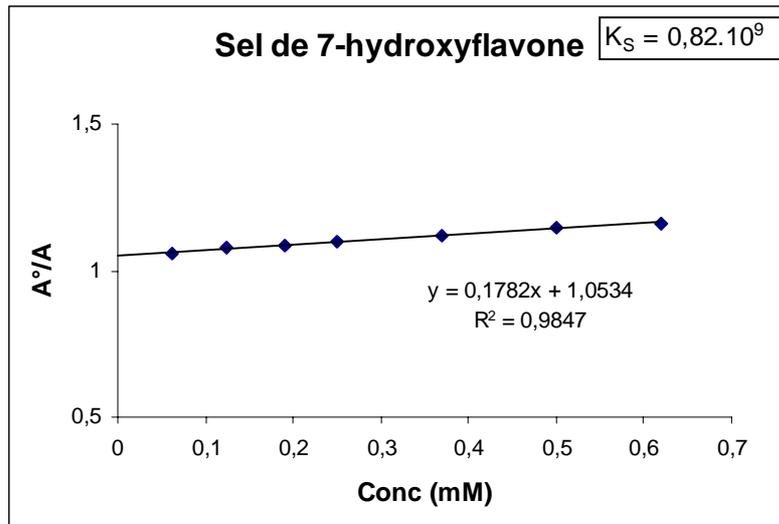
Résultats de capture des radicaux hydroxyles par les sels

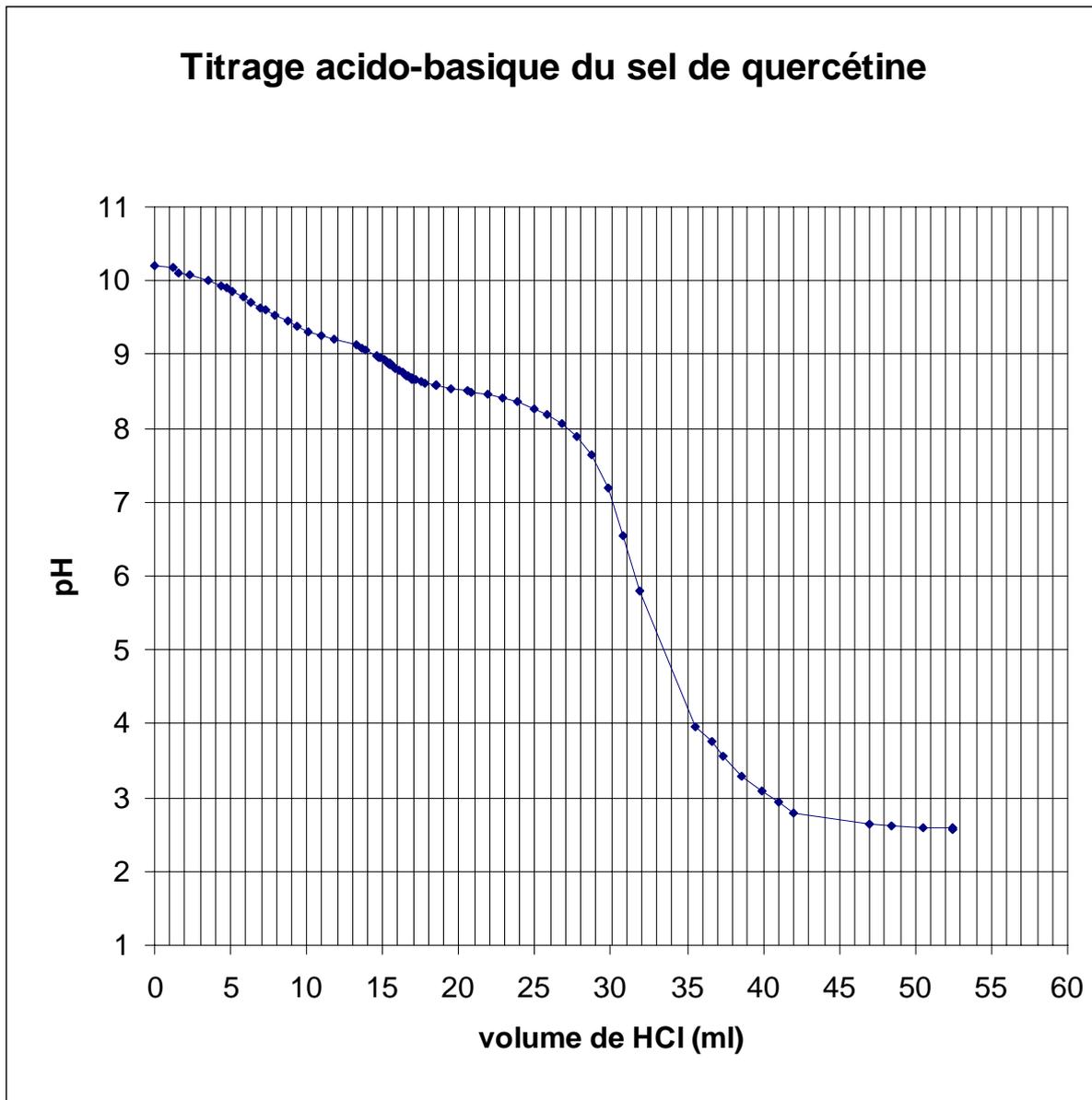


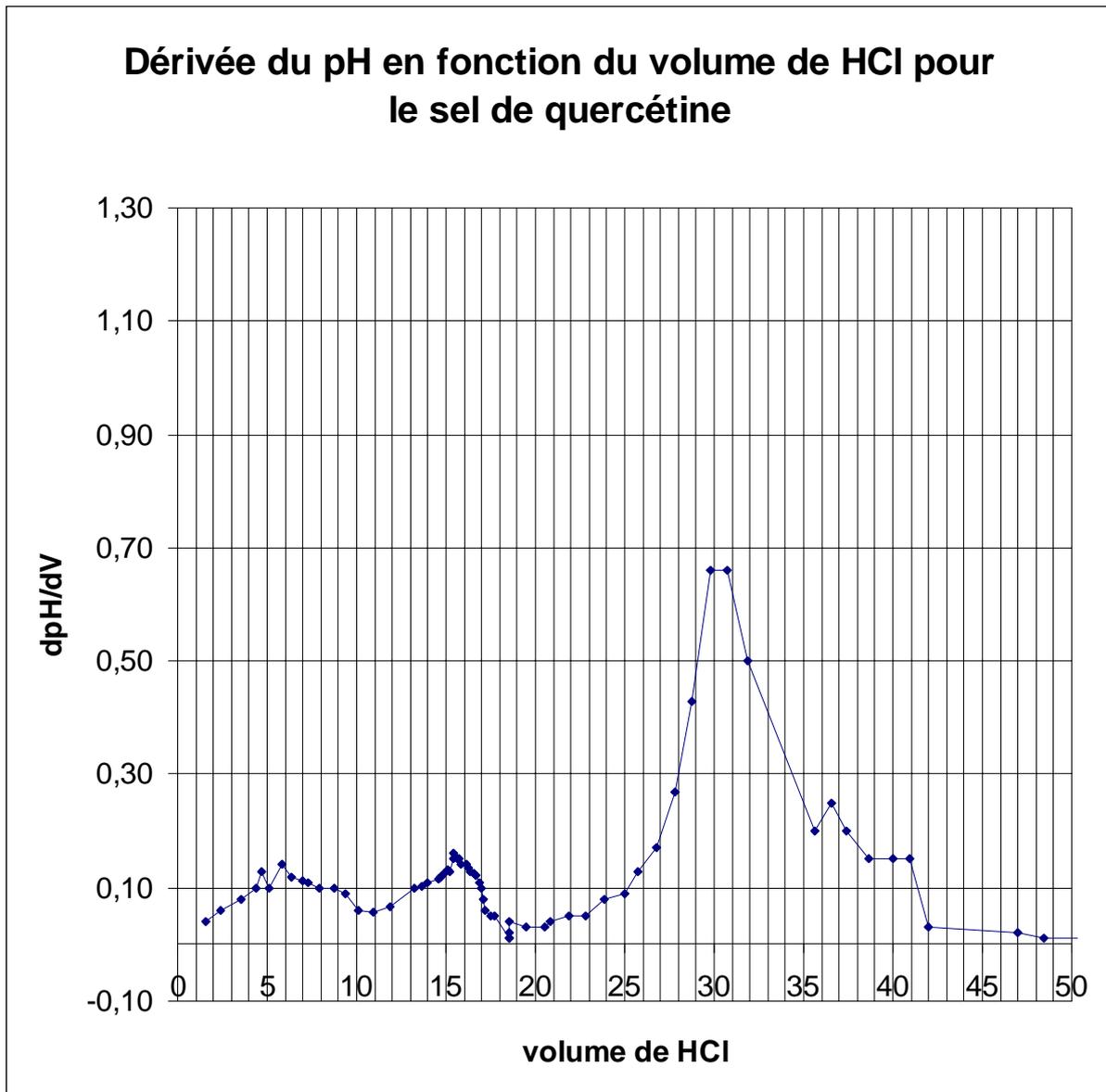
Résultats de capture des radicaux hydroxyles par les sels

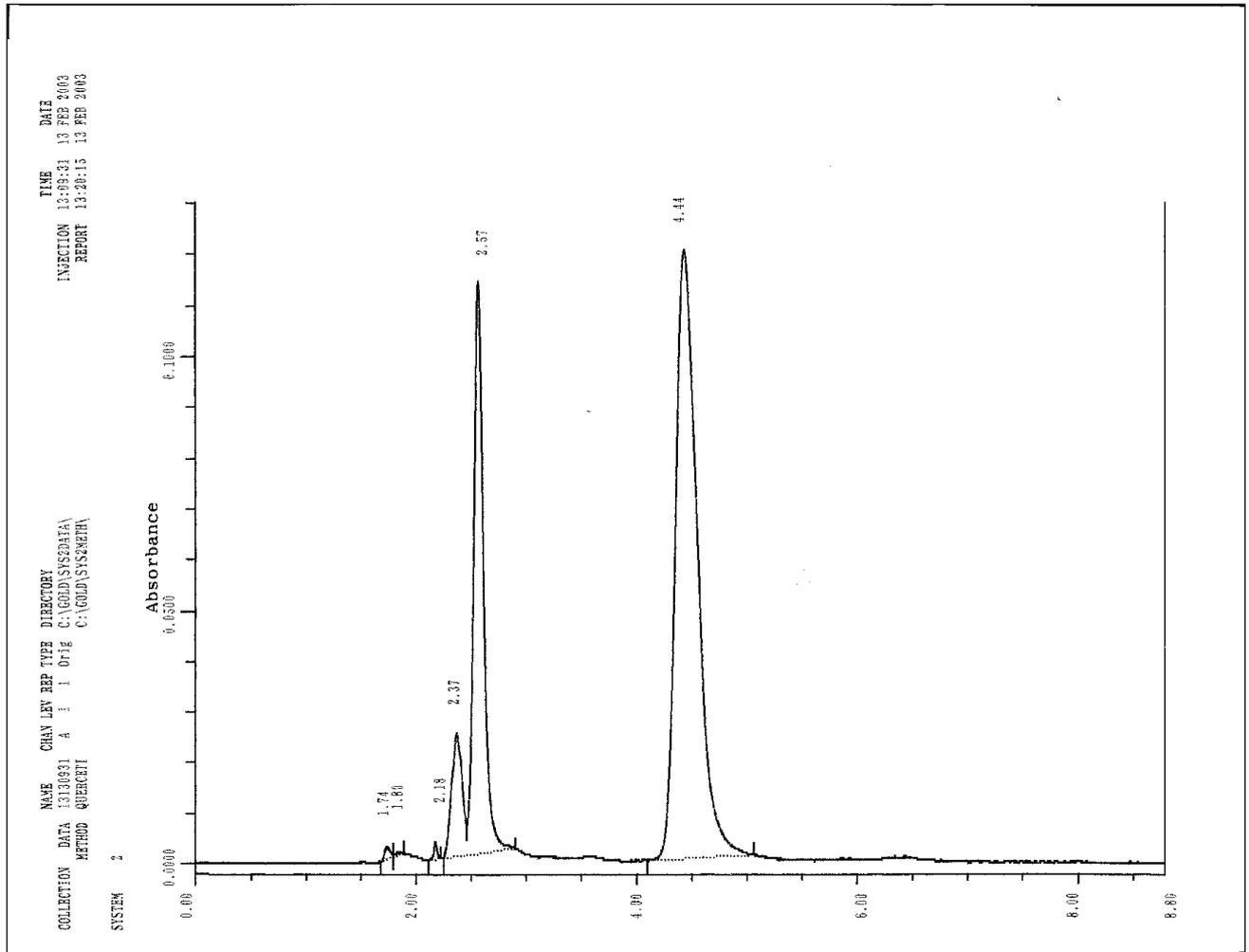


Résultats de capture des radicaux hydroxyles par les sels





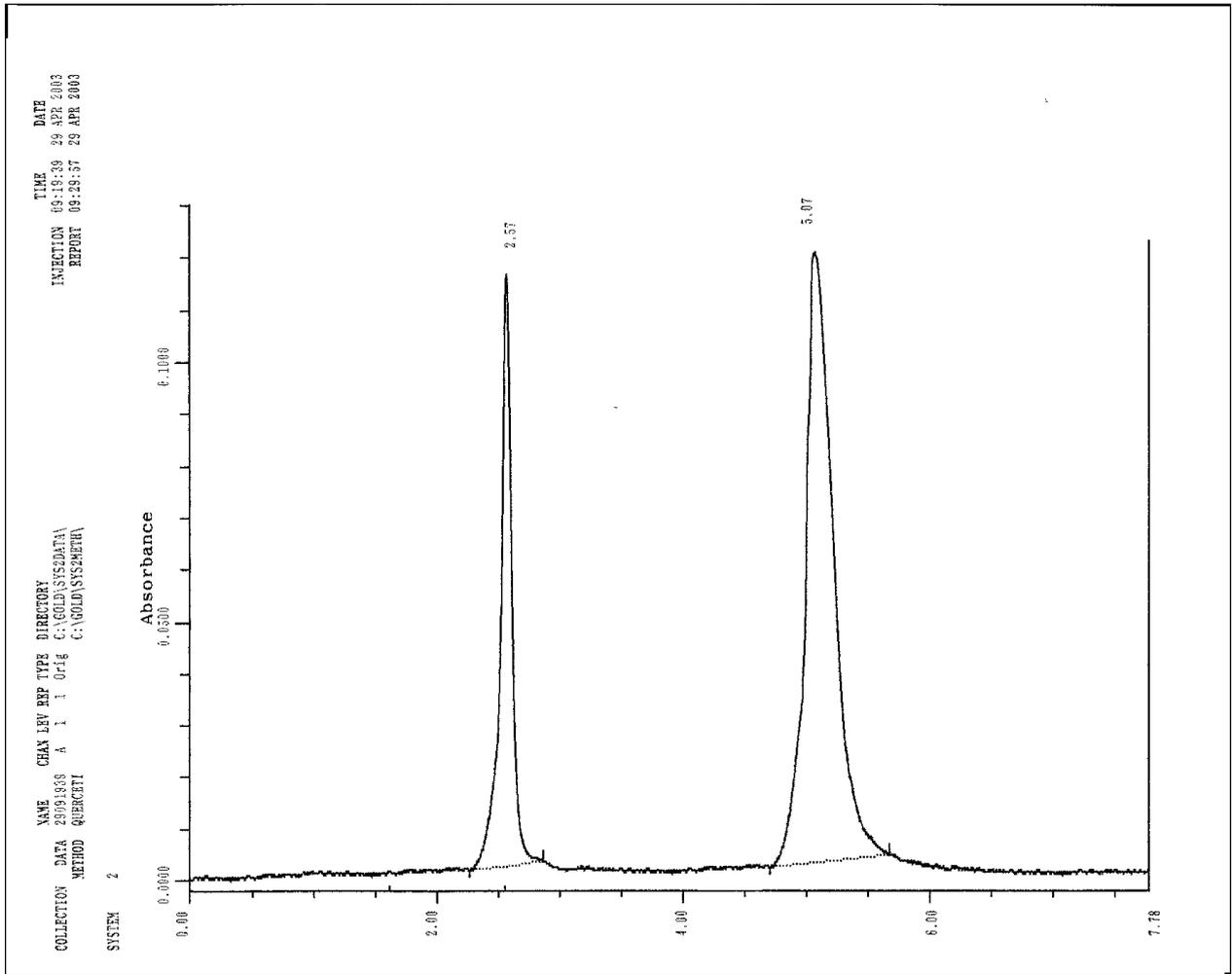


Chromatogramme du mélange de différents sels de quercétine dans la solution préparée à pH 10 – phase mobile pH 7,4

Phase stationnaire : Phase inversée (Colonne C18)
Phase mobile: (35% acétonitrile/65% eau à pH 7,4)
Débit: 1,3 ml/min

On constate la présence d'au moins 3 composés majoritaires

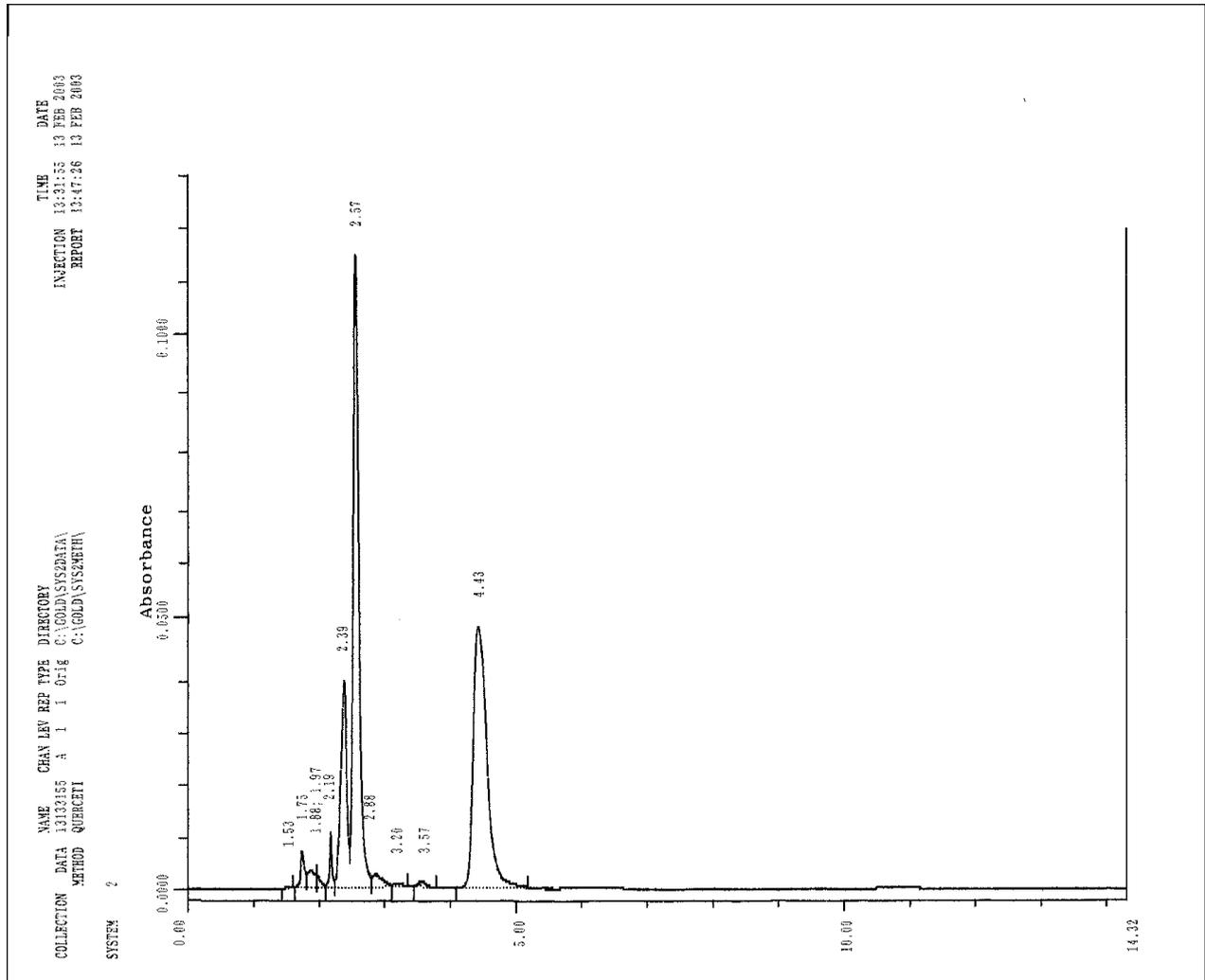
Chromatogramme du mélange de différents sels de quercétine dans la solution préparée à pH 10 – phase mobile pH 7,4



Phase stationnaire : Phase inversée (Colonne C18)
 Phase mobile: (35% acétonitrile/65% eau acidifiée)
 Débit: 1,3 ml/min

On constate la présence d'au moins 2 composés majoritaires

Chromatogramme du mélange de différents sels de quercétine de la solution préparée à pH 10 et après 2 heures d'interaction avec le tampon phosphate à pH 7,4 (phase mobile 7,4)



Phase stationnaire : Phase inversée (Colonne C18)
Phase mobile: (35% acétonitrile/65% eau à pH 7,4)
Débit: 1,3 ml/min

En comparant ce chromatogramme avec celui de l'annexe 19 on constate des modifications dues à la présence des phosphates mono et disodiques du tampon phosphate à pH 7,4

ANNEXE 22

Détermination des trois formes de sels sodiques de Quercétine par analyse du sodium par spectrophotomètre d'émission

Method: majeurs onf Page 1 Date: 20/03/2003 15:00:24

=====
 Analysis Begun

Start Time: 20/03/2003 14:50:59 Plasma On Time: 20/03/2003 10:24:24
 Logged In Analyst: Administrateur Technique: ICP Continuous
 Spectrometer Model: Optima 3300 DV Autosampler Model: AS-90plus

Sample Information File:
 Results Data Set: 2003.03.20
 Results Library: C:\pe\Administrateur\Results\Results.mdb

=====
 Method Loaded
 Method Name: majeurs onf Method Last Saved: 17/03/2003 11:14:35
 IEC File: MSF File:
 Method Description: onf

=====
 Sequence No.: 1 Autosampler Location: 1
 Sample ID: Calib Blank 1 Date Collected: 20/03/2003 14:50:59
 Analyst:
 Sample Wt: Sample Prep Volume:
 Dilution: Data Type: Original

=====
 Mean Data: Calib Blank 1

Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc. Units	Calib
Na 589.592	-362.7	405.93	131.42%	[0.00] mg/L	
Na 588.995	-22735.7	476.46	2.09%	[0.00] mg/L	

=====
 Sequence No.: 2 Autosampler Location: 2
 Sample ID: S1 Date Collected: 20/03/2003 14:53:24
 Analyst:
 Sample Wt: Sample Prep Volume:
 Dilution: Data Type: Original

=====
 Mean Data: S1

Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc. Units	Calib
Na 589.592	6331.1	134.40	1.97%	[1] mg/L	
Na 588.995	11767.3	552.33	4.69%	[1] mg/L	

=====
 Sequence No.: 3 Autosampler Location: 3
 Sample ID: S2 Date Collected: 20/03/2003 14:55:44
 Analyst:
 Sample Wt: Sample Prep Volume:
 Dilution: Data Type: Original

=====
 Mean Data: S2

Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc. Units	Calib
Na 589.592	15637.6	406.93	2.94%	[2] mg/L	
Na 588.995	23926.6	838.02	3.49%	[2] mg/L	

=====
 Sequence No.: 4 Autosampler Location: 4
 Sample ID: S3 Date Collected: 20/03/2003 14:58:04
 Analyst:
 Sample Wt: Sample Prep Volume:
 Dilution: Data Type: Original

=====
 Mean Data: S3

Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc. Units	Calib
Na 589.592	20923.4	488.89	2.34%	[3] mg/L	
Na 588.995	37034.5	1465.24	3.96%	[3] mg/L	

=====
 Sequence No.: 5 Autosampler Location: 5
 Sample ID: S4 Date Collected: 20/03/2003 15:00:24

Détermination des trois formes de sels sodiques de Quercétine par analyse du sodium par spectrophotomètre d'émission

Method: majeurs onf		Page 2		Date: 20/03/2003 15:06:52			
Analyst:		Sample Prep Volume:					
Sample Wt:		Data Type: Original					
Dilution:							

Mean Data: S4							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Calib Conc. Units			
Na 589.592	26408.3	313.52	1.19%	[4] mg/L			
Na 588.995	47308.5	1491.30	3.15%	[4] mg/L			
=====							
Sequence No.: 6		Autosampler Location: 6					
Sample ID: S5		Date Collected: 20/03/2003 15:02:45					
Analyst:							
Sample Wt:		Sample Prep Volume:					
Dilution:		Data Type: Original					

Mean Data: S5							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Calib Conc. Units			
Na 589.592	33526.0	699.98	2.09%	[5] mg/L			
Na 588.995	58958.6	1375.66	2.34%	[5] mg/L			

Calibration Summary							
Analyte	Stds.	Equation	Intercept	Slope	Curvature	Corr. Coef.	Reslope
Na 589.592	5	Lin, Calc Int	251.7	6670	0.00000	0.999443	
Na 588.995	5	Lin, Calc Int	242.7	11840	0.00000	0.999562	
=====							
Sequence No.: 7		Autosampler Location: 1					
Sample ID: blanc		Date Collected: 20/03/2003 15:05:06					
Analyst:							
Sample Wt:		Sample Prep Volume:					
Dilution:		Data Type: Original					

Mean Data: blanc							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Calib Conc. Units	Std.Dev.	Sample Conc. Units	Std.Dev.	RSD	
Na 589.592	400.5	0.022 mg/L	0.0436	0.022 mg/L	0.0436	195.40%	
Na 588.995	674.9	0.036 mg/L	0.0491	0.036 mg/L	0.0491	134.42%	

Principe:

Les échantillons sont nébulisés et l'aérosol ainsi produit est amené au sein d'un plasma induit par haute fréquence. A la température du plasma, tout élément devient émissif, ce qui permet de le caractériser et le doser. Le spectre est dispersé par un réseau et l'intensité des raies est évaluée par les détecteurs fixes (UV 165-403 nm et visible 404-782) du spectromètre. Les résultats sont traités et contrôlés par un système informatique. Lors d'un dosage une correction informatique est utilisée pour compenser les variations de la contribution du bruit de fond.

ANNEXE 24

Détermination des trois formes de sels sodiques de Quercétine par analyse du sodium par spectrophotomètre d'émission

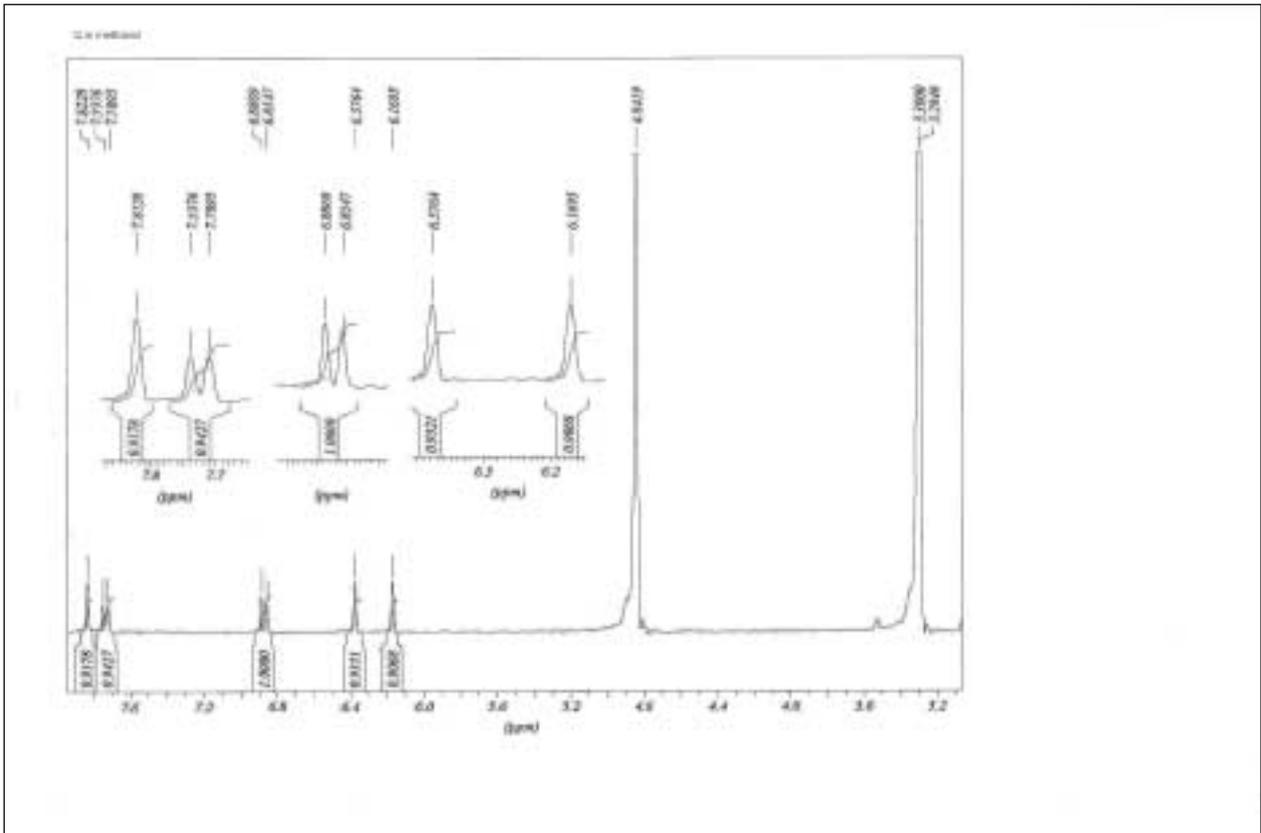
Sequence No.: 16				Autosampler Location: 12			
Sample ID: syn pr 8.7				Date Collected: 20/03/2003 16:22:57			
Analyst:							
Sample Wt:				Sample Prep Volume:			
Dilution:				Data Type: Original			

Mean Data: syn pr 8.7							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Calib Conc. Units	Std.Dev.	Sample Conc. Units	Std.Dev.	RSD	
Na 589.592	15221.5	2.10 mg/L	0.171	2.10 mg/L	0.171	8.10%	
Na 588.995	26310.6	2.04 mg/L	0.182	2.04 mg/L	0.182	8.99%	
=====							
Sequence No.: 17				Autosampler Location: 13			
Sample ID: syn pr 9.9				Date Collected: 20/03/2003 16:25:17			
Analyst:							
Sample Wt:				Sample Prep Volume:			
Dilution:				Data Type: Original			

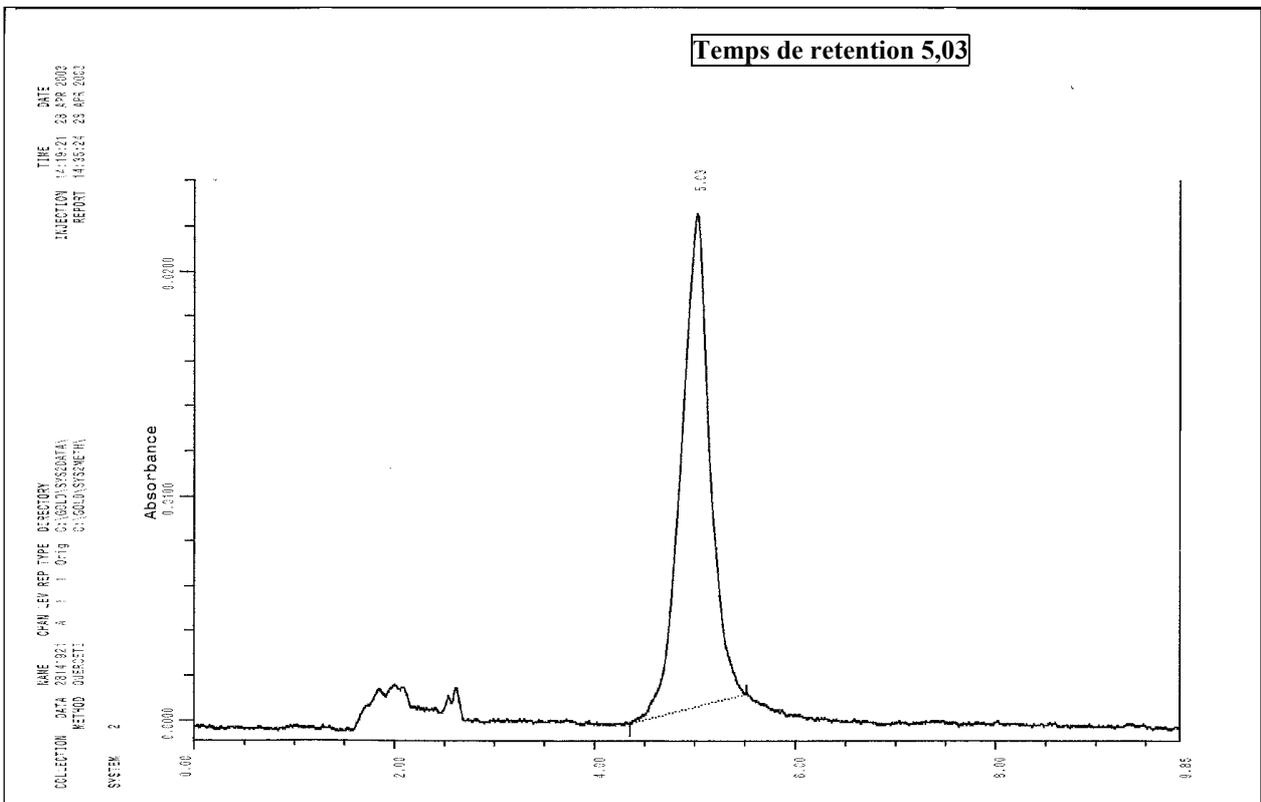
Mean Data: syn pr 9.9							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Calib Conc. Units	Std.Dev.	Sample Conc. Units	Std.Dev.	RSD	
Na 589.592	15839.9	2.20 mg/L	0.092	2.20 mg/L	0.092	4.18%	
Na 588.995	27184.9	2.11 mg/L	0.104	2.11 mg/L	0.104	4.92%	
=====							
Sequence No.: 18				Autosampler Location: 14			
Sample ID: syn pr 10.4				Date Collected: 20/03/2003 16:27:38			
Analyst:							
Sample Wt:				Sample Prep Volume:			
Dilution:				Data Type: Original			

Mean Data: syn pr 10.4							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Calib Conc. Units	Std.Dev.	Sample Conc. Units	Std.Dev.	RSD	
Na 589.592	16339.9	2.26 mg/L	0.107	2.26 mg/L	0.107	4.75%	
Na 588.995	28894.3	2.24 mg/L	0.198	2.24 mg/L	0.198	8.82%	
=====							
Sequence No.: 19				Autosampler Location: 7			
Sample ID: icp IV				Date Collected: 20/03/2003 16:29:59			
Analyst:							
Sample Wt:				Sample Prep Volume:			
Dilution:				Data Type: Original			

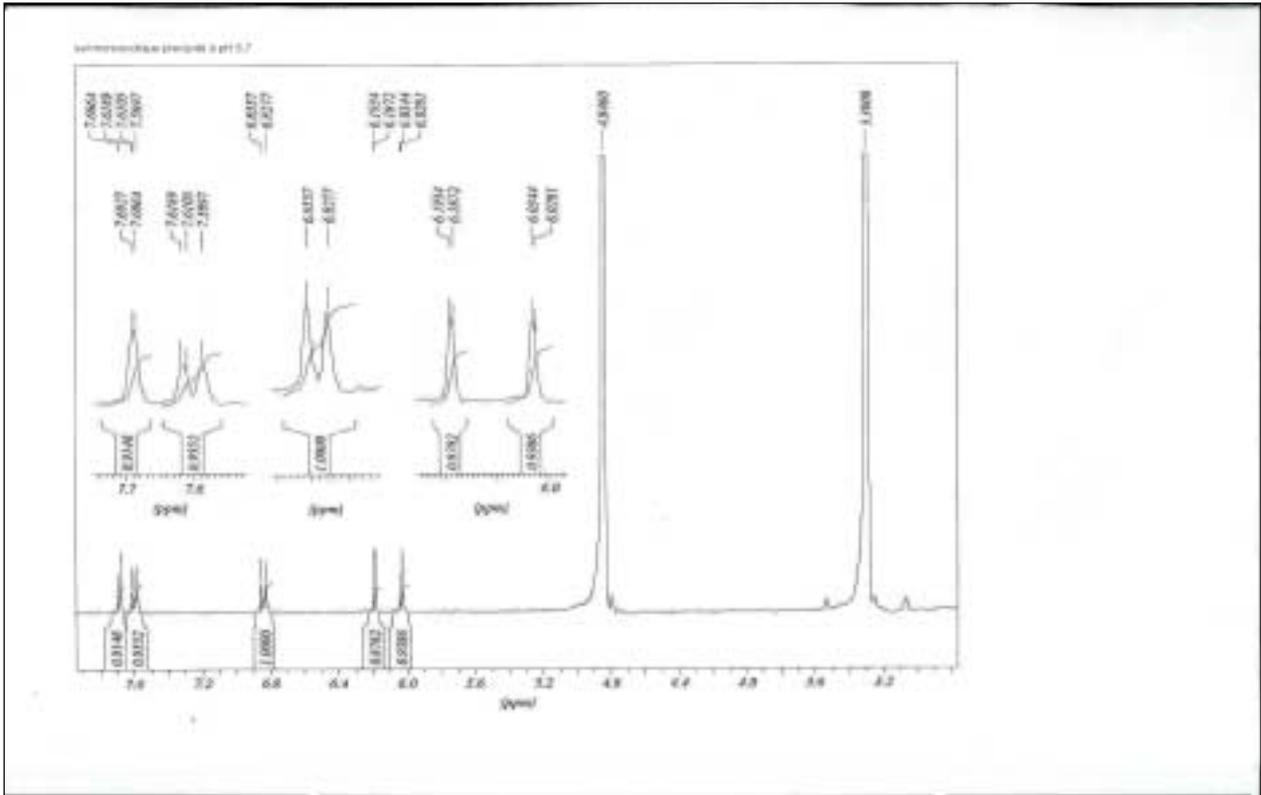
Mean Data: icp IV							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Calib Conc. Units	Std.Dev.	Sample Conc. Units	Std.Dev.	RSD	
Na 589.592	16851.8	2.33 mg/L	0.091	2.33 mg/L	0.091	3.90%	
QC value within limits for Na 589.592 Recovery = 93.26%							
Na 588.995	29856.3	2.32 mg/L	0.109	2.32 mg/L	0.109	4.69%	
QC value within limits for Na 588.995 Recovery = 92.81%							
All analytes passed QC.							

Spectres H¹RMN et chromatogramme de la quercétine

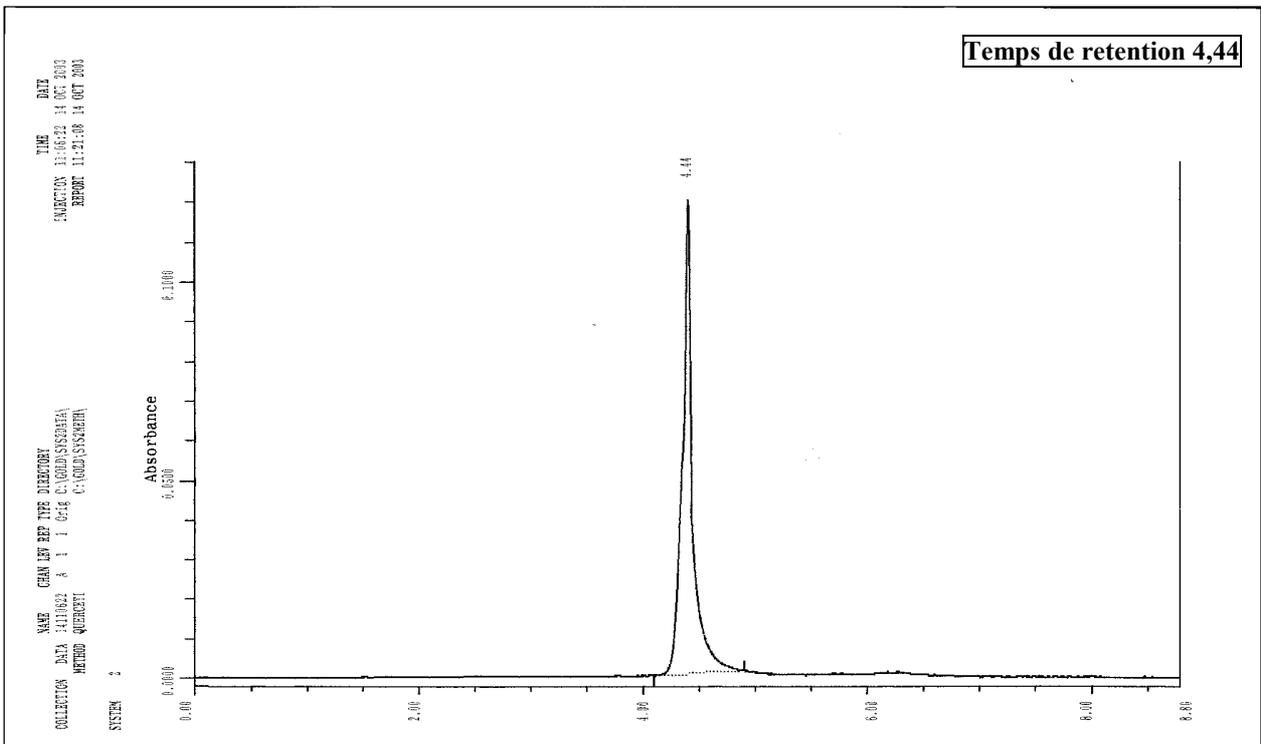
Δ 6,17 (s, 1H, H₆) ; Δ 6,38 (s, 1H, H₈) ; Δ 6,86 (d, J = 6, 1H, H₅) ; Δ 7,71 (d, J = 6, 1H, H₆) ;
 Δ 7,82 (s, 1H, H₂)



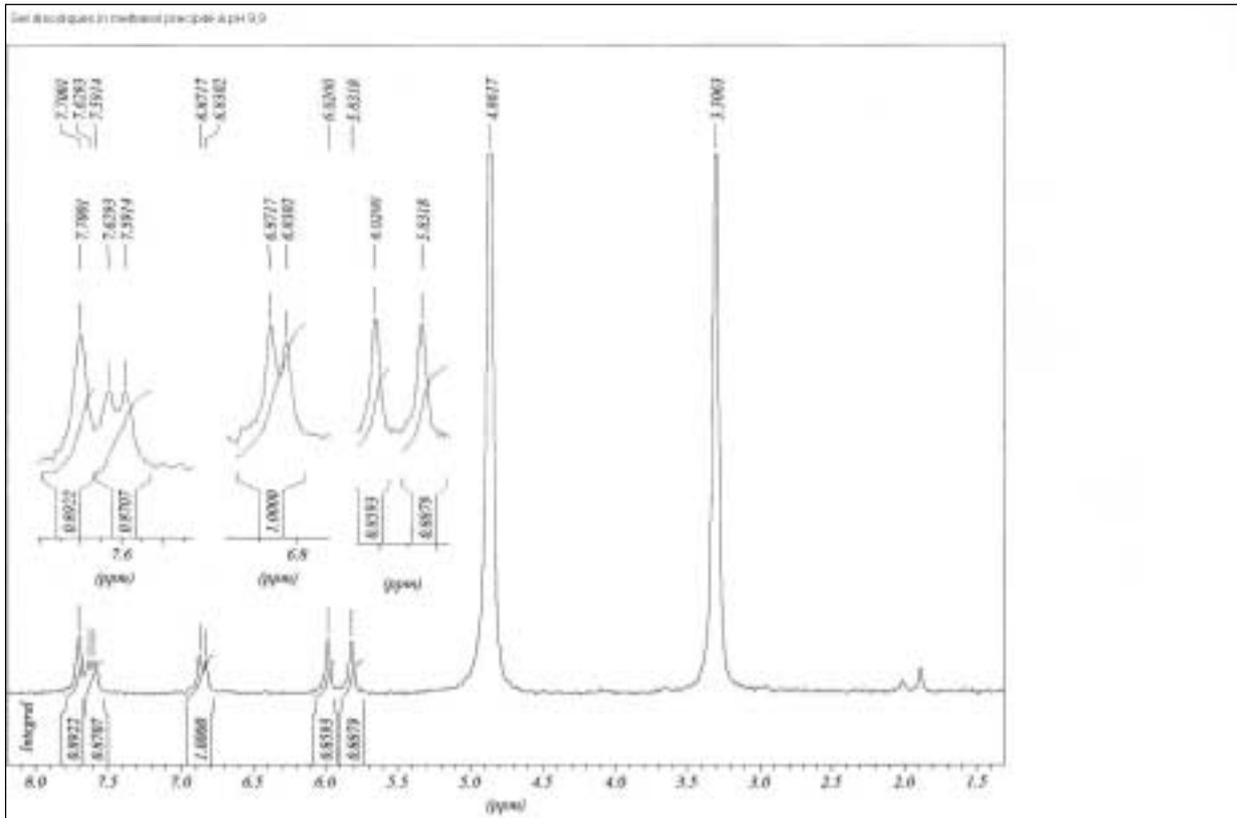
**Spectres H^1 RMN et chromatogramme du sel monosodique
(obtenu par précipitation à pH 8,7)**



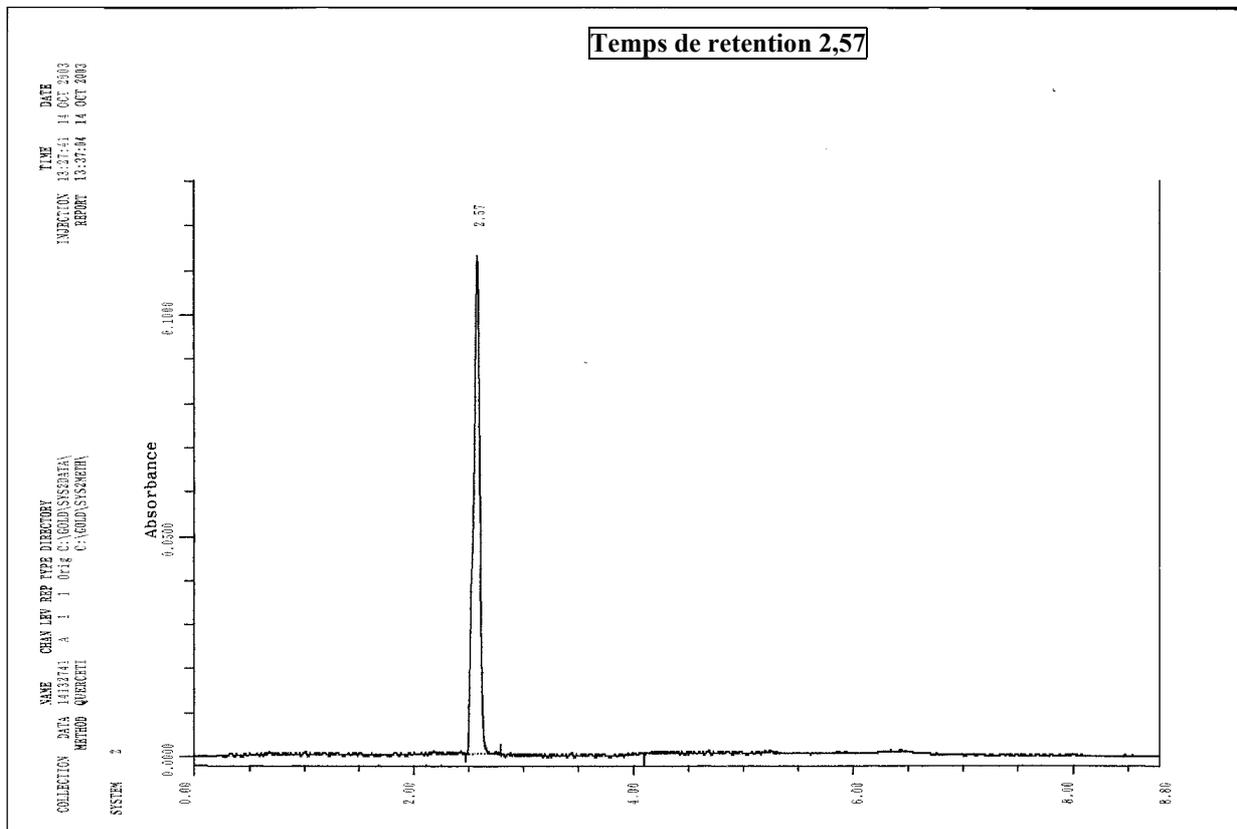
Δ 6,03 (s, 1H, H_6) ; Δ 6,19 (s, 1H, H_8) ; Δ 6,83 (d, J = 6, 1H, H_5) ; Δ 7,61 (d, J = 6, 1H, H_6) ;
 Δ 7,69 (s, 1H, H_2)



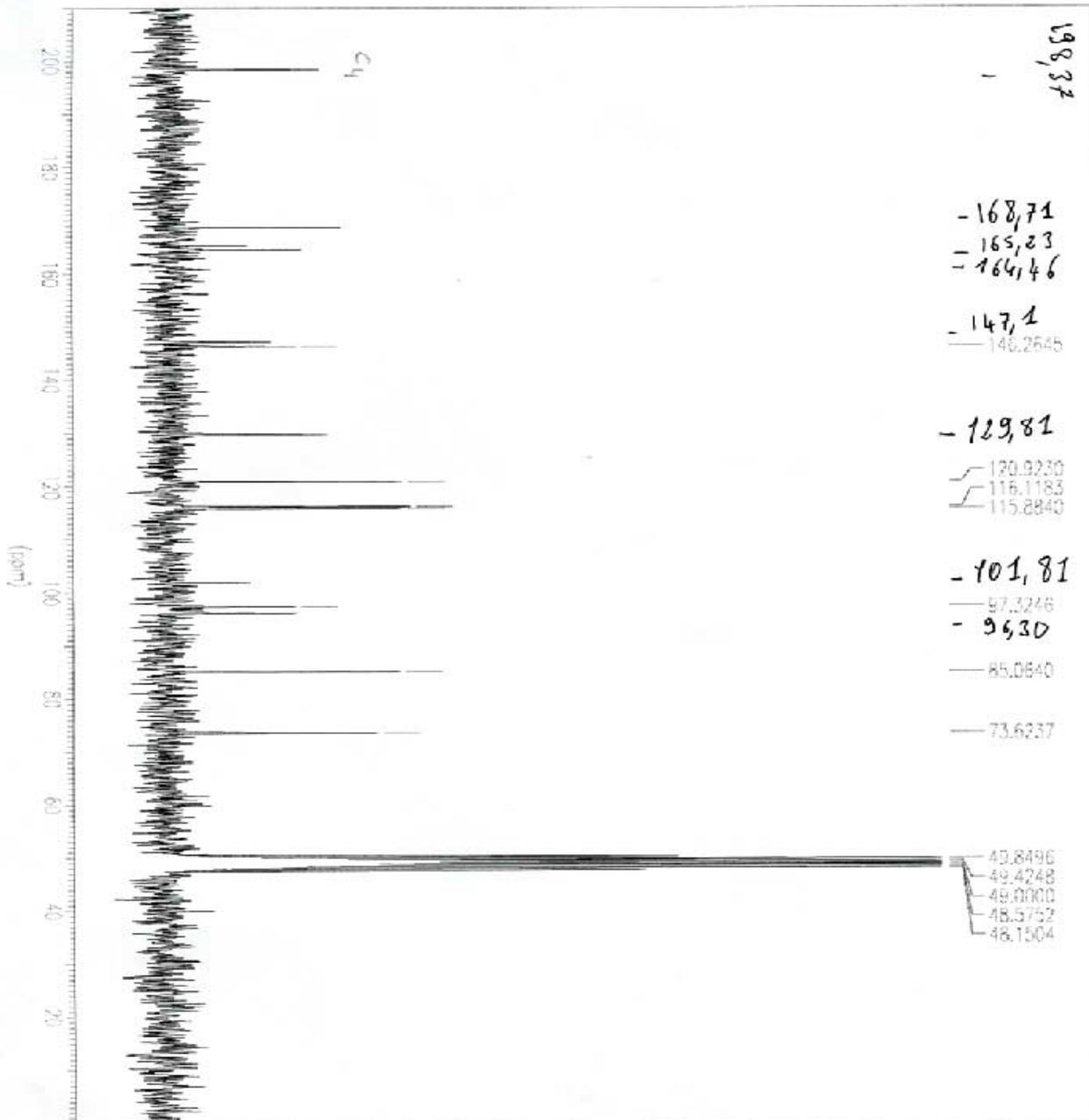
**Spectres H^1 RMN et chromatogramme du sel disodique
(obtenu par précipitation à pH 9,9)**



Δ 5,83 (s, 1H, H_6) ; Δ 6,02 (s, 1H, H_8) ; Δ 6,85 (d, J = 6, 1H, H_5) ; Δ 7,60 (d, J = 6, 1H, H_6) ; Δ 7,70 (s, 1H, H_2)

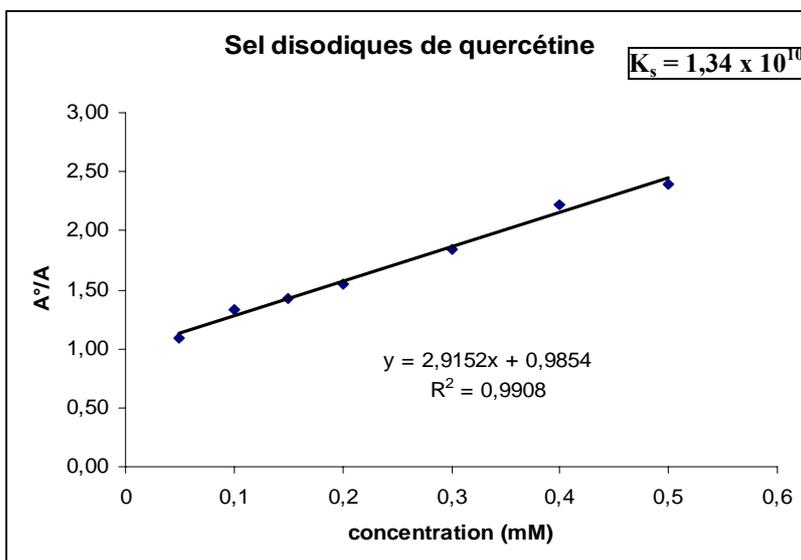
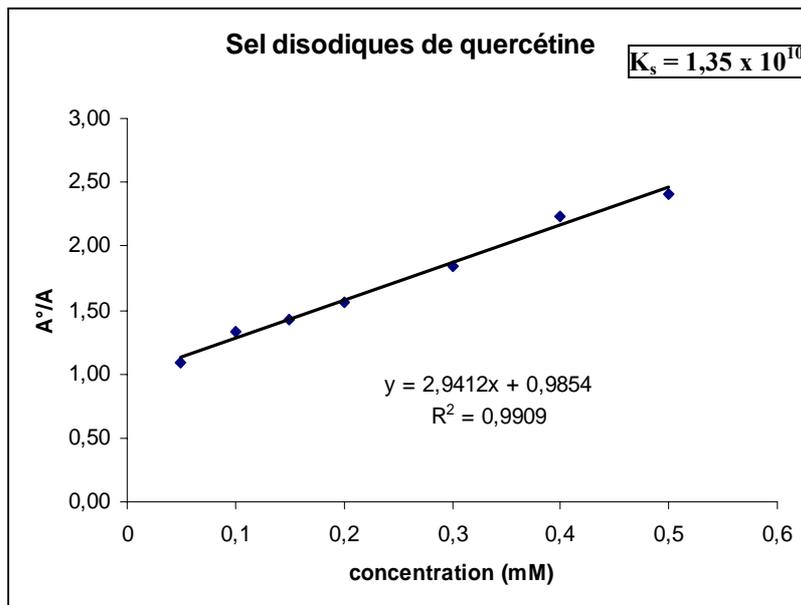
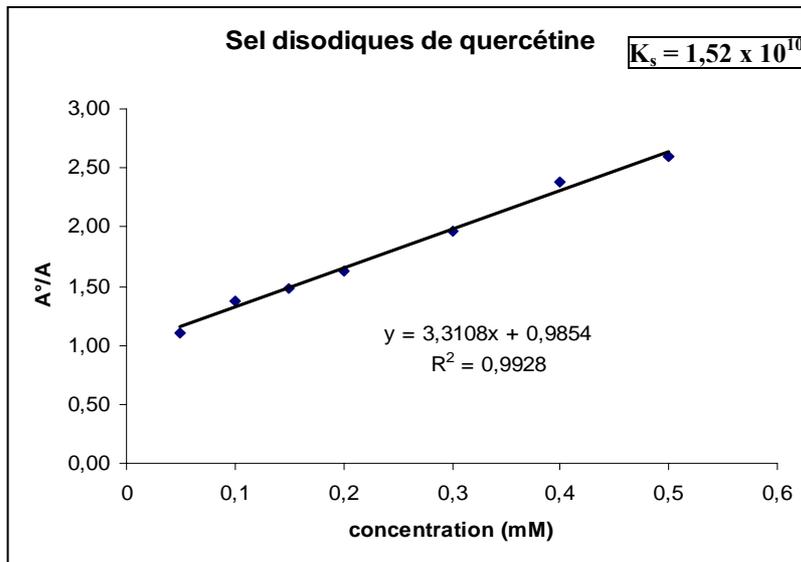


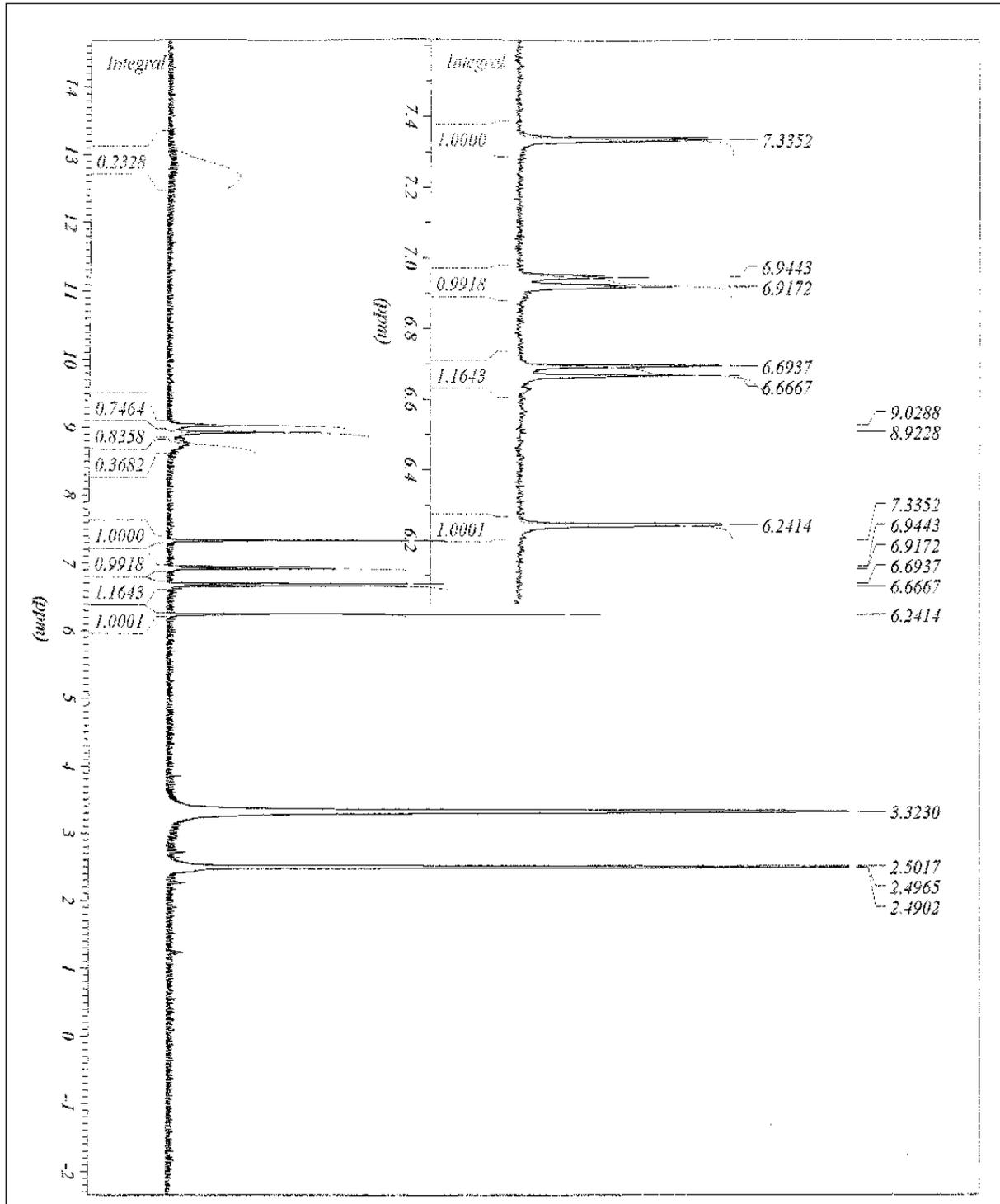
Spectres C¹³RMN du sel disodique

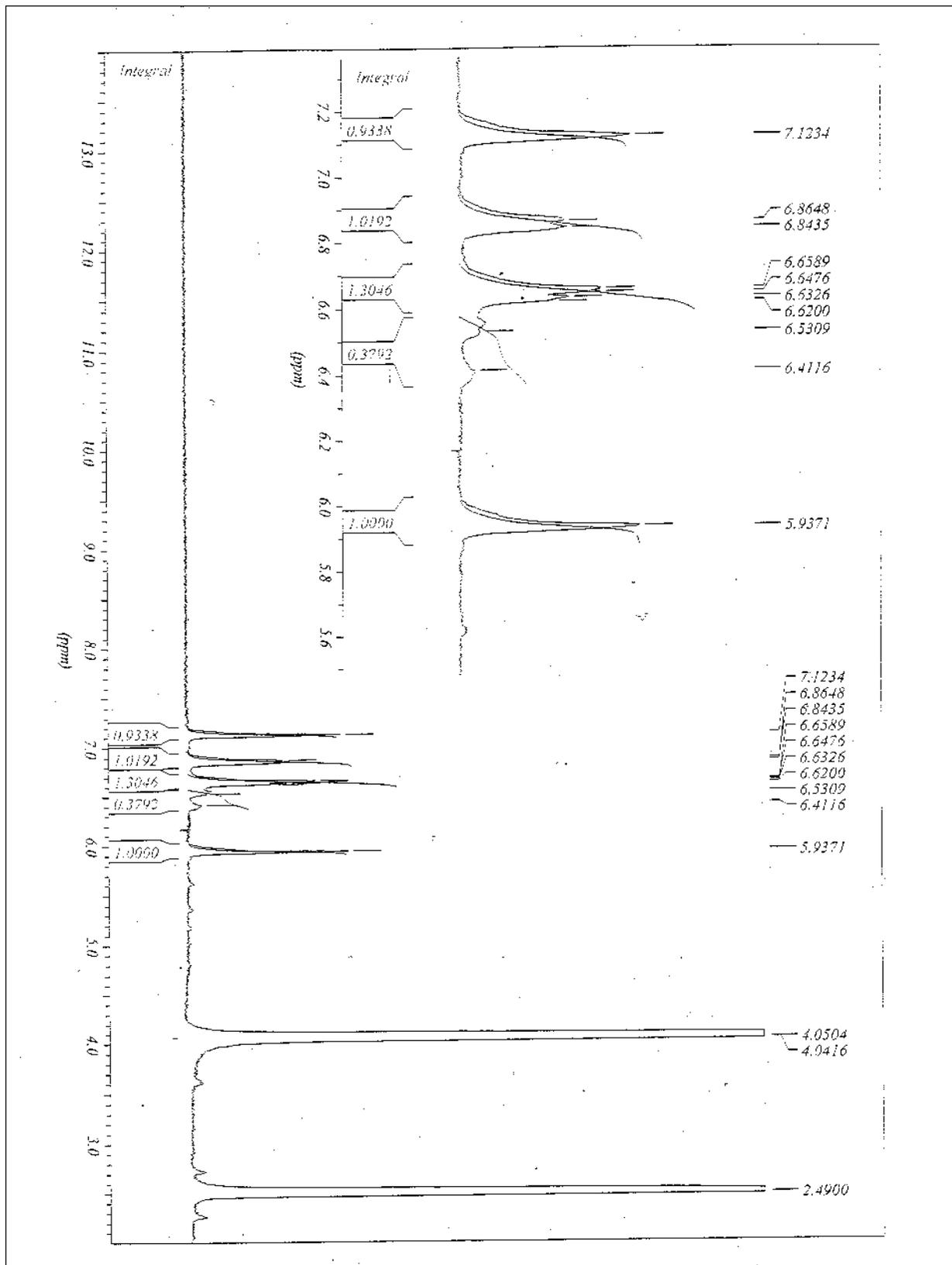


*** Current Data Parameters ***
 NAME :
 EXPNO : 1
 PROCNO : 1
 F2 : 125.761
 F3 : 2
 F4 : 1

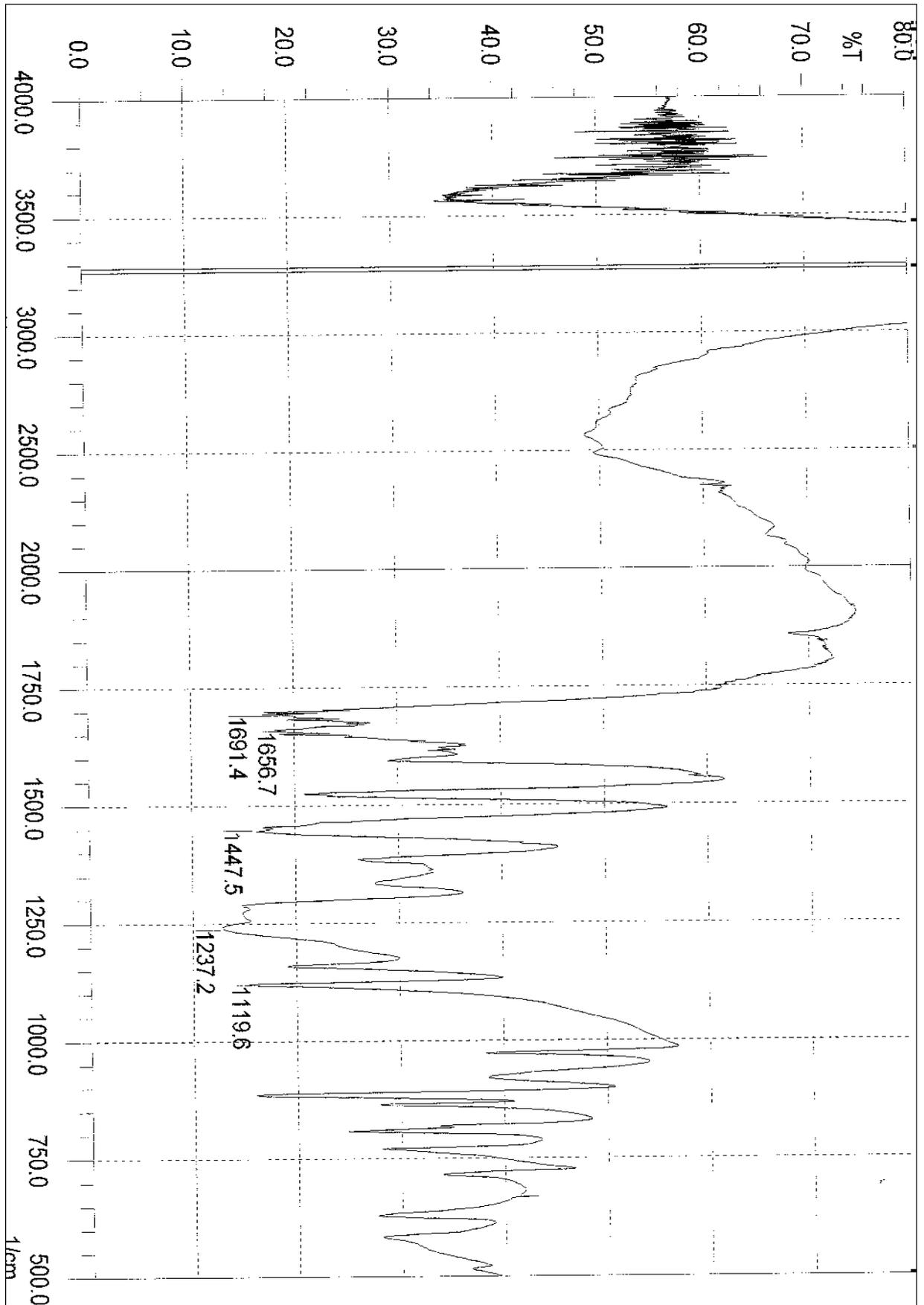
Capture de radicaux hydroxyles par le sel disodique de quercétine



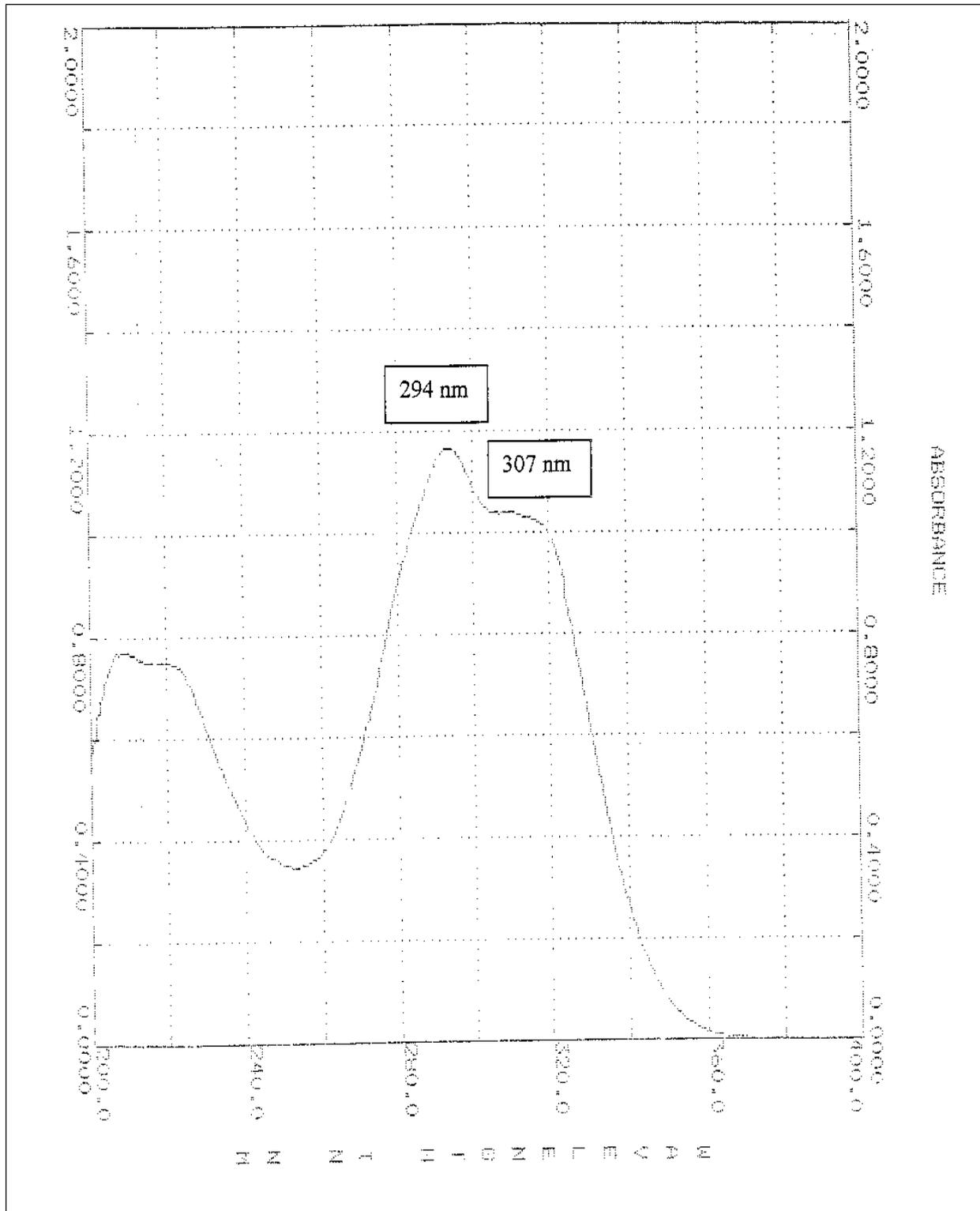
Spectre H¹RMN de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique (DMSO)

Spectre H^1 RMN de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique (DMSO/ D_2O)

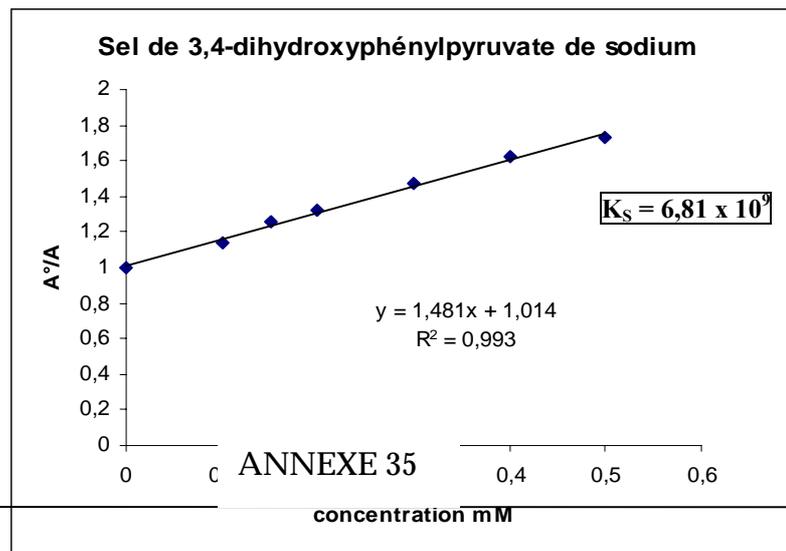
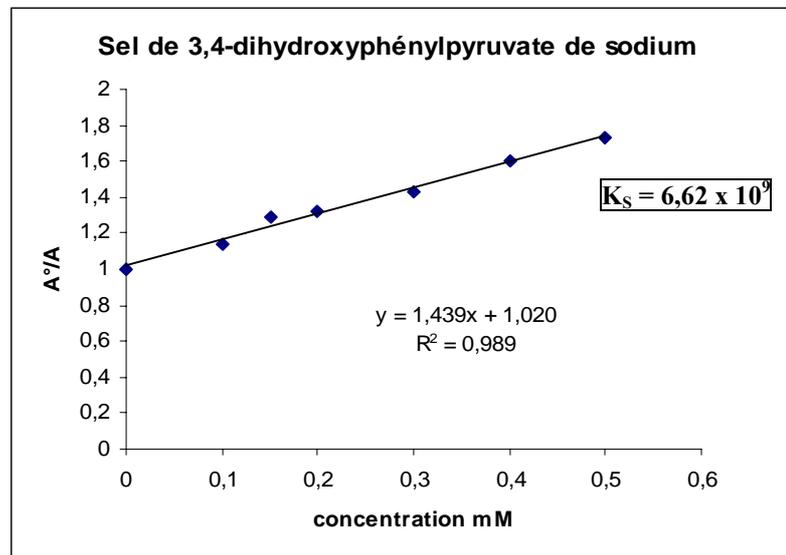
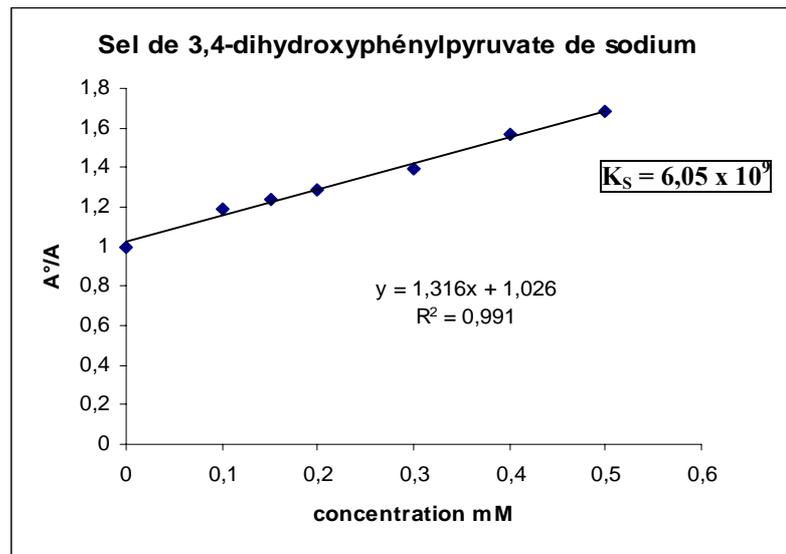
Spectre IR de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique



Spectre UV/VIS de l'acide 3,4-dihydroxyphénylpyruvique



Capture de OH^\ominus par le sel 3,4-dihydroxyphénylpyruvate de sodium



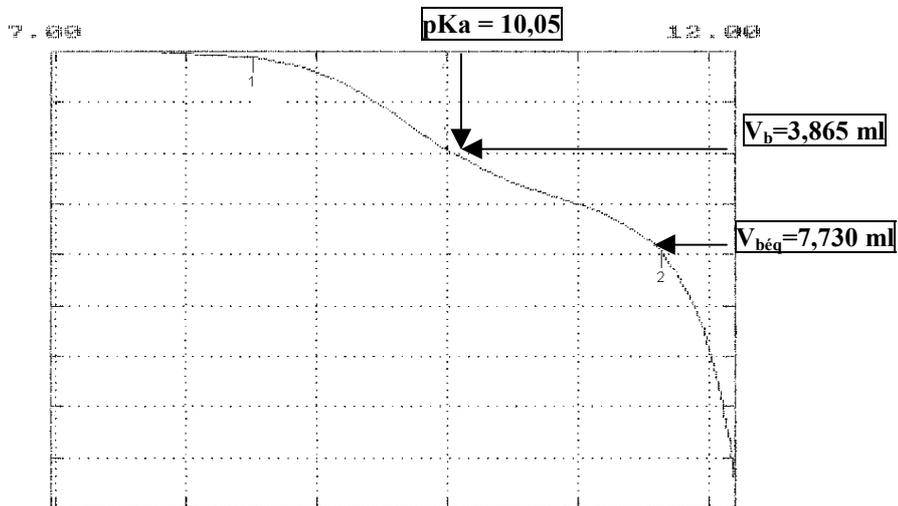
ANNEXE 35

Courbe de détermination de pK_a de l'hydroxyle phénolique le plus acide du phénol

```

^cu
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 16:01  1
V départ 0.000 ml  DET pH ACID1CAP
2.0 ml/div          dpH=1.0/div

```



```

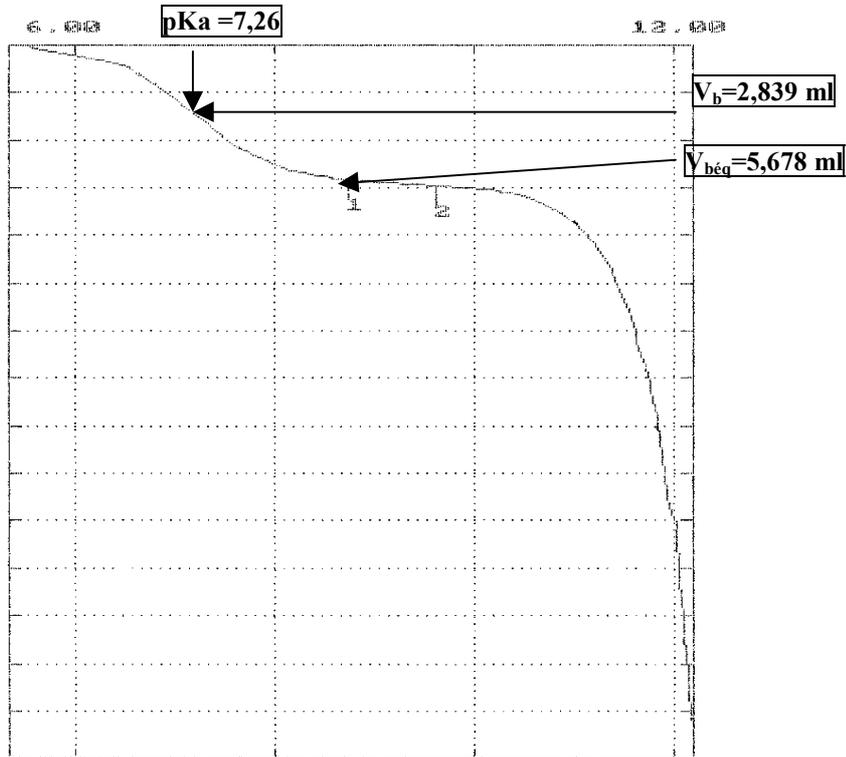
^fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 16:02  1
pHc(init) 7.13      DET pH ACID1CAP
EP1      0.077 ml   7.85
EP2      7.730 ml  11.85
val.mes.d'arret atteint

```

X = 1/2 alors pKa = pH correspondant à V_b = V_{EP2}/2 car c'est un monoacide.

Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde

*cu
 716 DMS Titrimo 45194 716.0022
 date 2003-05-15 heure 19:24 10
 V départ 0.000 ml DET pH ACIDICAP
 2.0 ml/div dPH=2.0/div



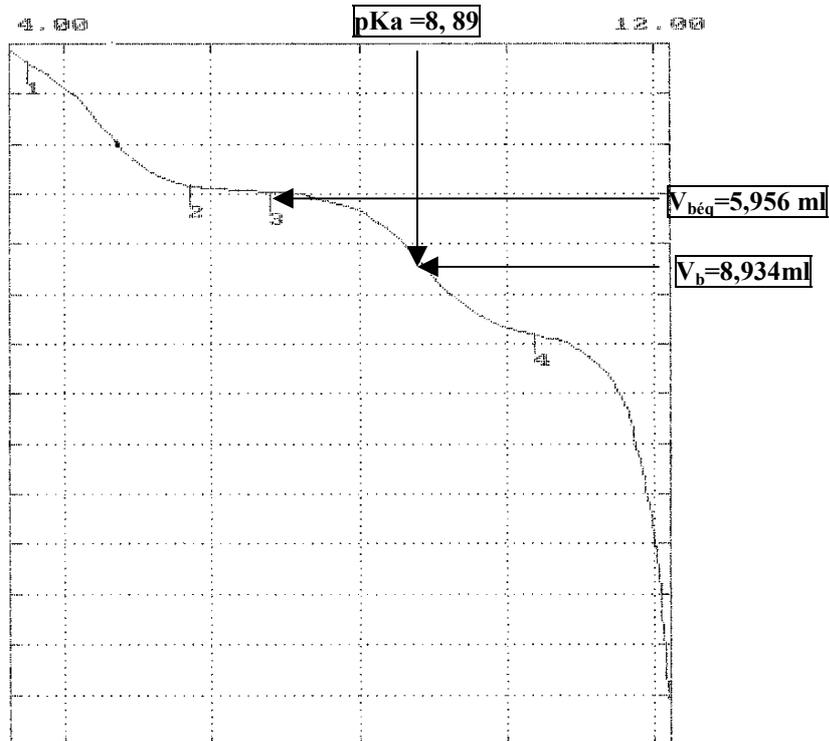
*fr
 716 DMS Titrimo 45194 716.0022
 date 2003-05-15 heure 19:25 10
 pHc(init) 5.43 DET pH ACIDICAP
 EP1 5.678 ml 8.75
 EP2 5.938 ml 9.62
 val.mes.d'arret atteint

X = 1/2 alors pKa = pH correspondant à $V_b = V_{EP1}/2$ car c'est la première fonction acide du diacides qui sera déterminé de la même façon qu'un monoacide.

Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 3,4-dihydroxybenzoïque acide

```

fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 16:41  2
V départ  0.000 ml  DET pH  ACIDICAP
2.0 ml/div          dpH=2.0/div
  
```



```

fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 16:42  2
pHc(init)  3.27      DET pH  ACIDICAP
EP1        0.739 ml  3.50
EP2        5.677 ml  5.72
EP3        5.959 ml  6.79
EP4       11.585 ml  10.36
val.mes.d'arret atteint
  
```

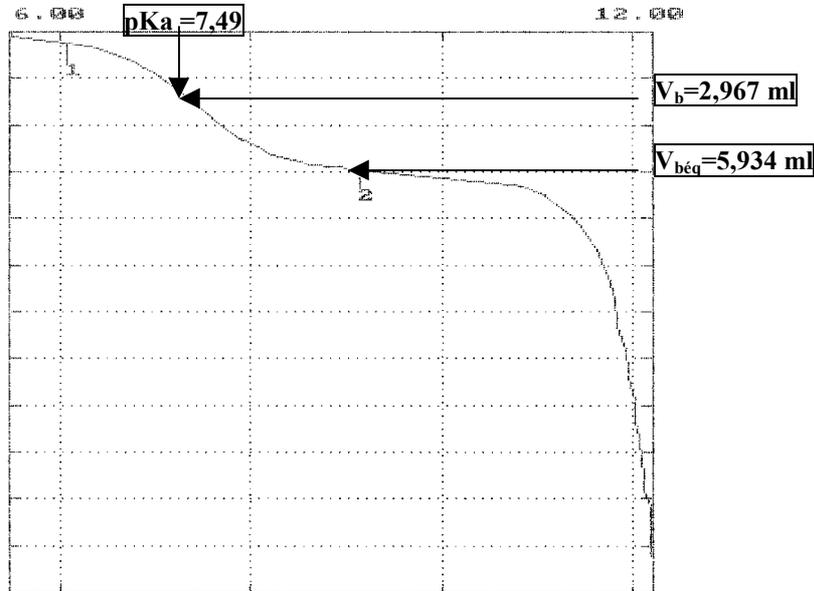
X = 3/2 alors pKa = pH correspondant à $V_b = 3/2 (V_{EP3})$ car c'est la deuxième fonction acide du triacides.

Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 4-hydroxybenzaldehyde

```

^cu
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 17:50  4
V départ 0.000 ml  DET pH ACIDICAP
2.0 ml/div          dpH=2.0/div

```



```

^fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 17:51  4
pHc(init) 5.52      DET pH ACIDICAP
EP1 0.532 ml      6.08
EP2 5.934 ml      9.14
val.mes.d'arret atteint

```

X = 1/2 alors pKa = pH correspondant à V_b = V_{EP2}/2 car c'est un monoacide.

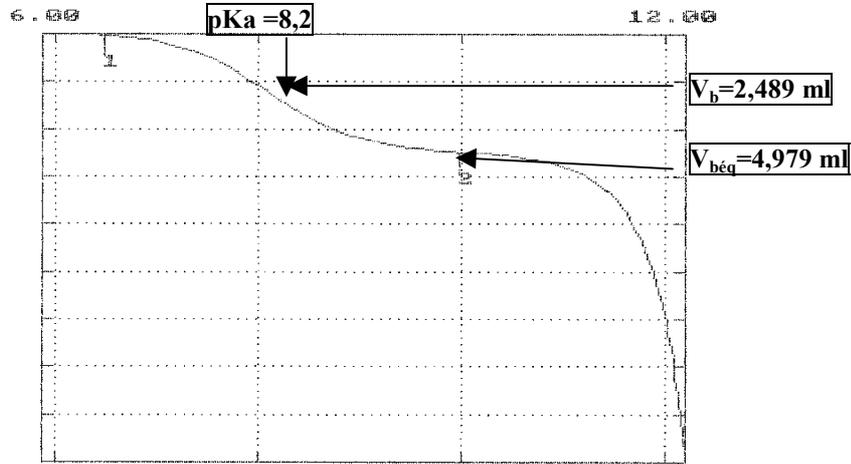
ANNEXE 39

Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 2-hydroxybenzaldehyde

```

/cu
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 18:01  5
V départ 0.000 ml  DET pH ACIDICAP
2.0 ml/div          dpH=2.0/div

```



```

/fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 18:01  5
pHc(init) 5.93      DET pH ACIDICAP
EP1       0.079 ml   6.47
EP2       4.979 ml   9.97
val.mes.d'arret atteint
=====

```

X = ½ alors pKa = pH correspondant à V_b = V_{EP2}/2 car c'est un monoacide.

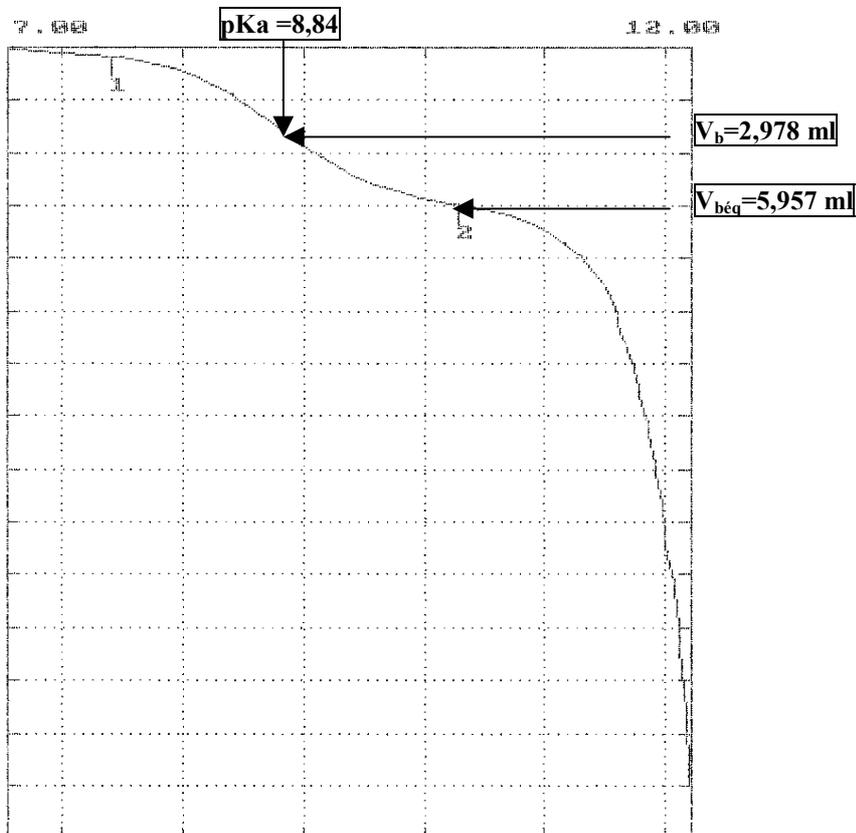
ANNEXE 40

Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 3-hydroxybenzaldehyde

```

'cu
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 17:16   3
V départ 0.000 ml  DET pH ACID1CAP
2.0 ml/div          dpH=1.0/div

```



```

'fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 17:17   3
pHc(init) 6.71      DET pH ACID1CAP
EP1       0.351 ml   7.42
EP2       5.957 ml  10.28
val.mes.d'arret atteint

```

X = 1/2 alors pKa = pH correspondant à V_b = V_{EP2}/2 car c'est un monoacide.

ANNEXE 41

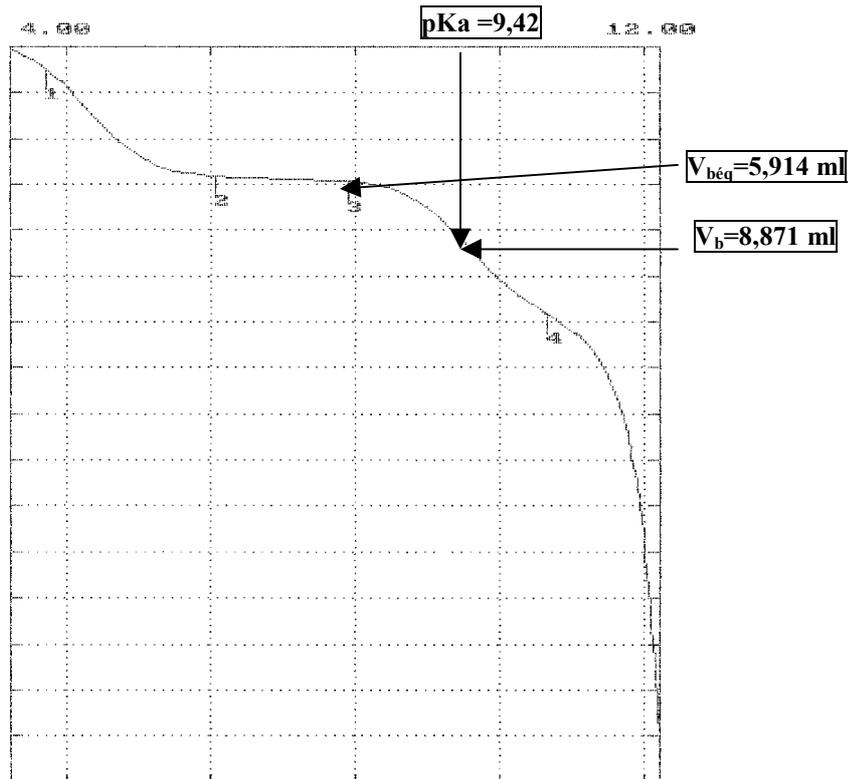
Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 3,4-dihydroxyphényl acétique acide

```

'fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 19:41   11
pHc(init)          3.24   DET pH  ACIDICAP
EP1                 0.982 ml   3.73
EP2                 5.633 ml   6.06
EP3                 5.914 ml   7.91
EP4                11.632 ml  10.64
val.meas.d'arret atteint
=====
    
```

```

'cu
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 19:42   11
V départ           0.000 ml  DET pH  ACIDICAP
2.0 ml/div         dpH=2.0/div
    
```



X = 3/2 alors pKa = pH correspondant à $V_b = 3/2 (V_{EP3})$ car c'est la deuxième fonction acide du triacides.

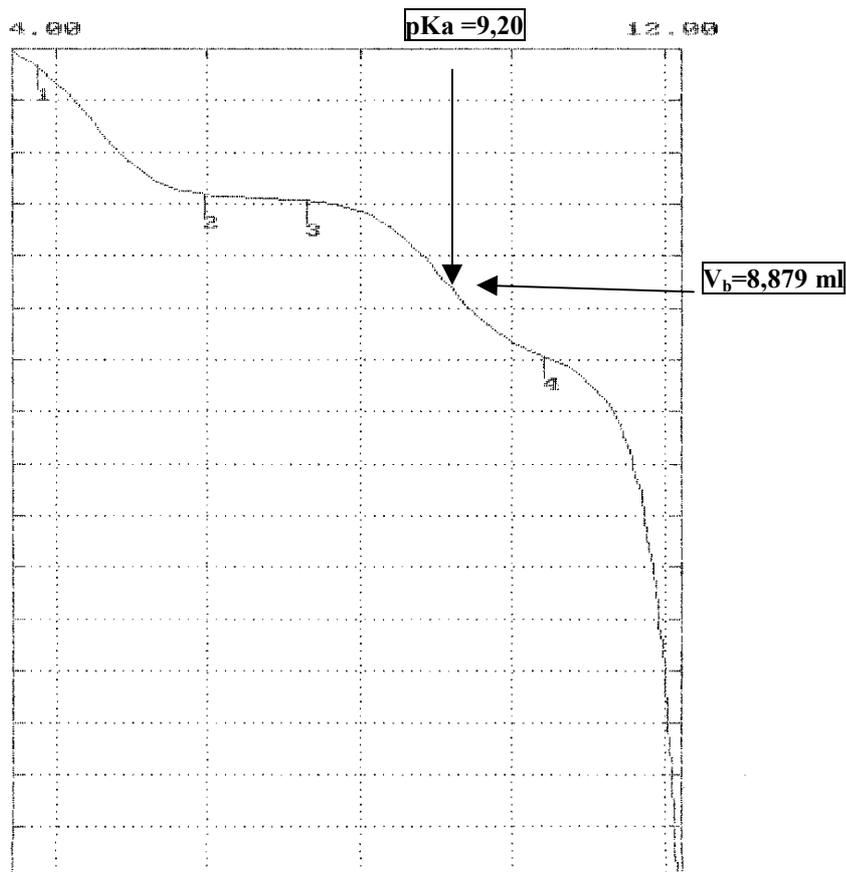
Courbe de détermination de pKa de l'hydroxyle phénolique le plus acide du 4-hydroxybenzoïque acide

```

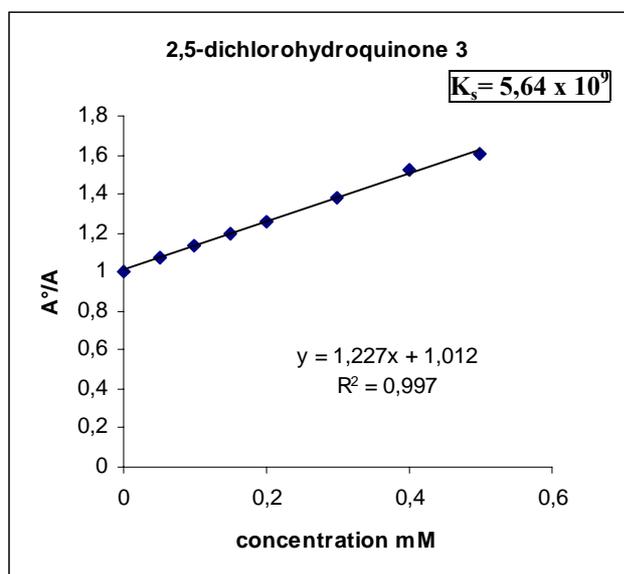
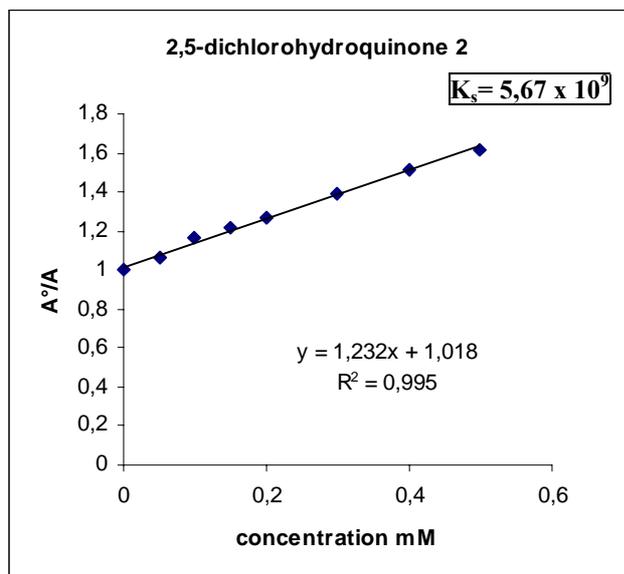
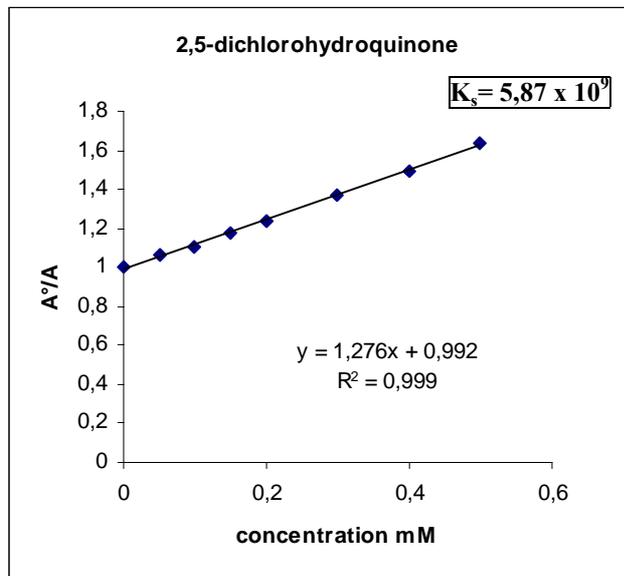
=====
'fr
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 18:36  7
pHc(init)          3.42      DET pH  ACID1CAP
EP1                 0.674 ml      3.73
EP2                 5.649 ml      5.94
EP3                 5.932 ml      7.27
EP4                 11.827 ml     10.40
val.mes.d'arret atteint
=====
    
```

```

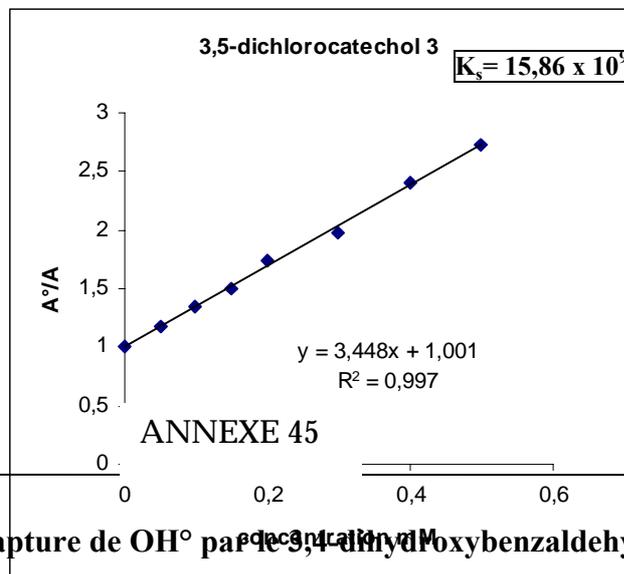
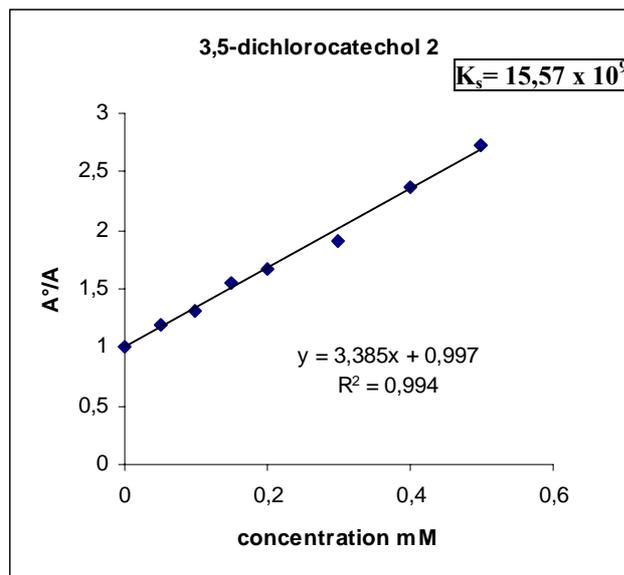
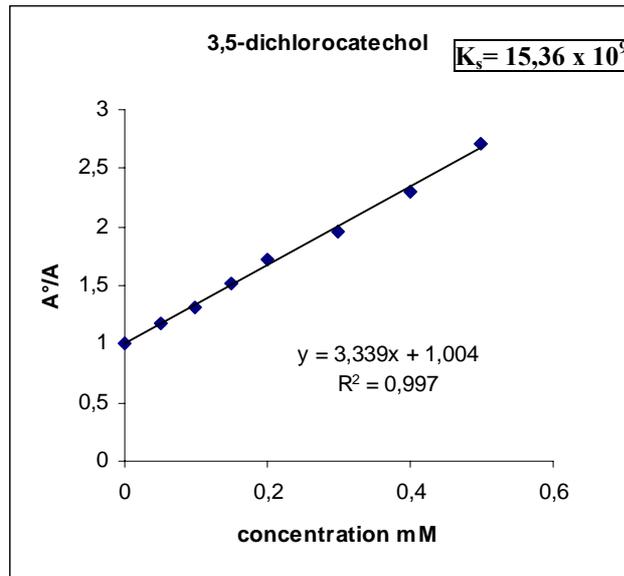
'cu
716 DMS Titrimo      45194  716.0022
date 2003-05-15     heure 18:36
V départ           0.000 ml  DET pH  ACID1CAP
2.0 ml/div         dpH=2.0/div
    
```



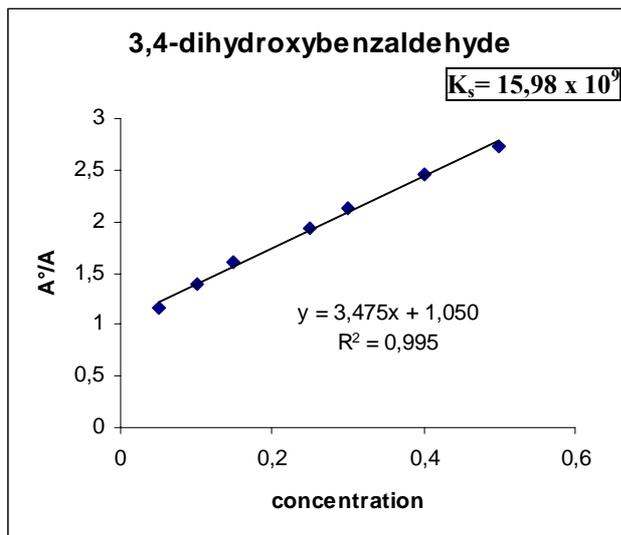
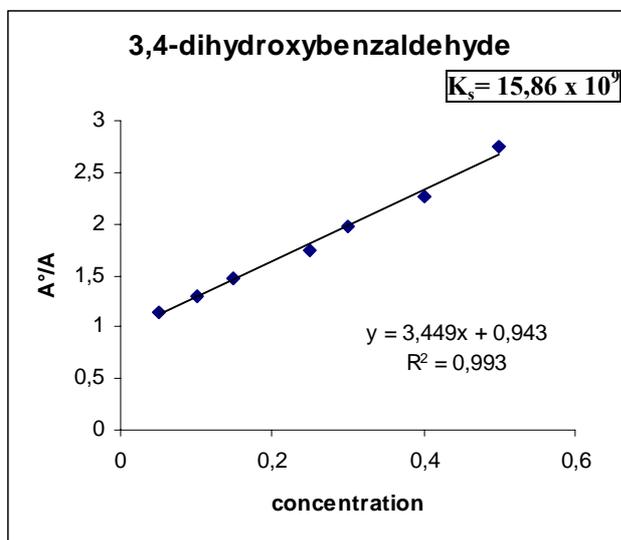
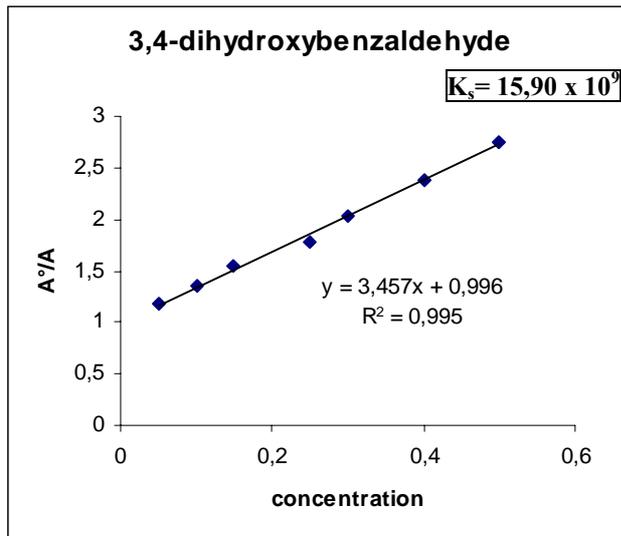
Dans ce cas les deux points d'inflexion sont bien déterminés et bien différents donc : V_b pour ce deuxième point d'inflexion est égale à $V_{EP3} + \frac{1}{2}(V_{EP4} - V_{EP3})$.

Capture de OH° par le 2,5-dichlorohydroquinone

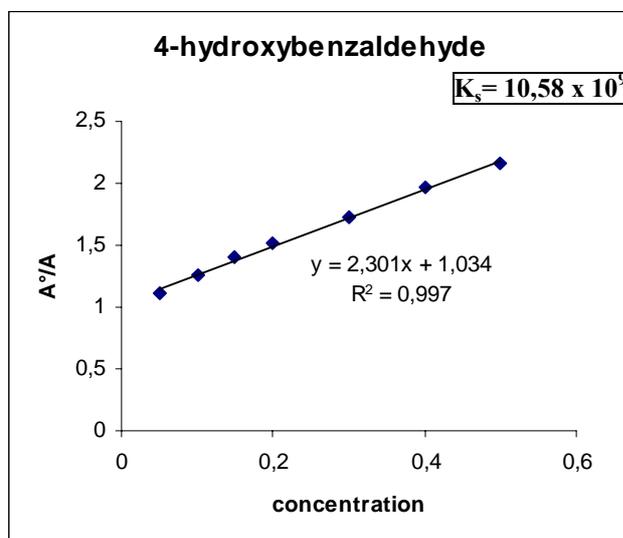
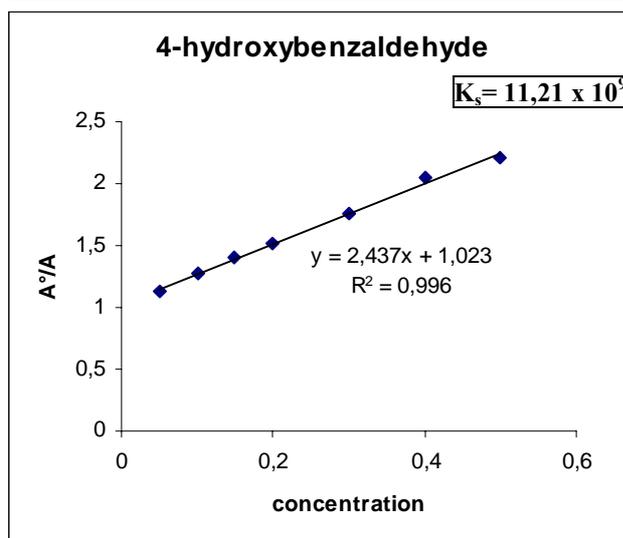
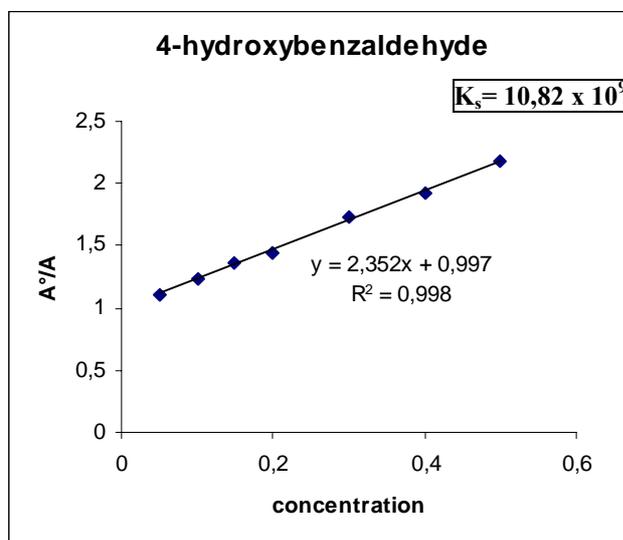
Capture de OH° par le 3,5-dichlorocatechol



Capture de OH° par le 3,4-dihydroxybenzaldehyde



Capture de OH° par le 4-hydroxybenzaldehyde



Les différentes zones de radiations solaires

Le soleil émet un spectre continu de radiations électromagnétiques que l'on divise, en fonction des longueurs d'onde, en différentes zones.

Les études de photoprotection s'intéressent plus particulièrement à la zone ultra-violette responsable de la majorité des effets biologiques au niveau cutané.

Cette zone est subdivisée en trois groupes :

- rayons UVA ou UV longs : 400 à 315 nm
- rayons UVB ou UV moyens : 315 à 280 nm
- rayons UVC ou UV courts : 280 à 190 nm .

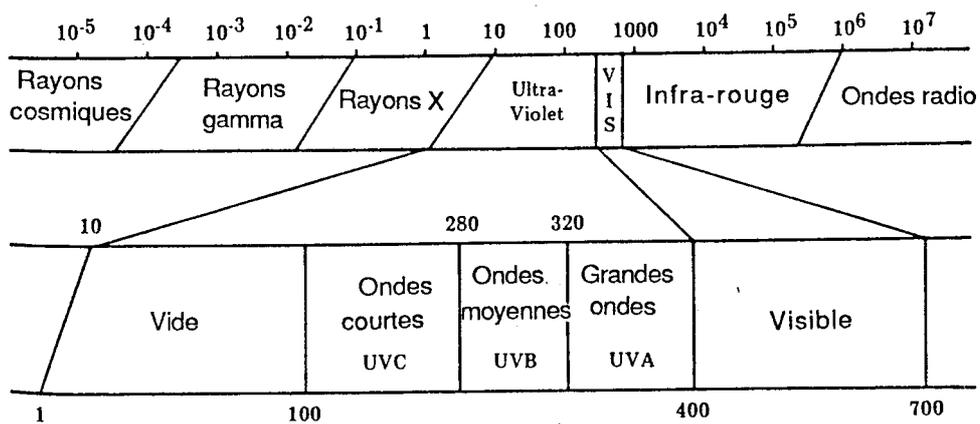


Figure 1 : classification de la zone ultra-violette du spectre électromagnétique.

Schéma de fabrication classique des crèmes

CHRONOLOGIE DES OPERATIONS	ETAPES	CONTROLES EN COURS
	0	← MATERIEL ATMOSPHERE
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>PREPARATION PHASE AQUEUSE</p> <p>↓</p> <p>CHAUFFAGE</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>PREPARATION PHASE HUILEUSE</p> <p>↓</p> <p>CHAUFFAGE</p> </div> </div>	I	← HOMOGENEITE
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>CHAUFFAGE</p> <p>↓</p> <p>INCORPORATION D'UNE PHASE DANS L'AUTRE</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>CHAUFFAGE</p> <p>↓</p> <p>INCORPORATION D'UNE PHASE DANS L'AUTRE</p> </div> </div>	II	← TEMPERATURE (S) POIDS RESTANT ← CONFORMITE
<div style="text-align: center;"> <p>INCORPORATION D'UNE PHASE DANS L'AUTRE</p> <p>↓</p> <p>MELANGE REFROIDISSEMENT</p> </div>	III	← SENS
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>MELANGE REFROIDISSEMENT</p> <p>↓</p> <p>HOMOGENEISATION</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>MELANGE REFROIDISSEMENT</p> <p>↓</p> <p>MURISSEMENT</p> </div> </div>	IV	← VITESSE, DUREE D'AGITATION, TEMPERATURE ← ASPECT, CONSISTANCE
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>HOMOGENEISATION</p> <p>↓</p> <p>MURISSEMENT</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>MURISSEMENT</p> <p>↓</p> <p>TRANSFERT</p> </div> </div>	V	← TAILLE DES PARTICULES
<div style="text-align: center;"> <p>MURISSEMENT</p> <p>↓</p> <p>TRANSFERT</p> </div>	VI	← DUREE, TEMPERATURE CONSISTANCE
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>TRANSFERT</p> <p>↓</p> <p>RECIPIENTS</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>TRANSFERT</p> <p>↓</p> <p>REPARTITION</p> </div> </div>	VII	← PROPRETE (canalisations cuves)
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>RECIPIENTS</p> <p>↓</p> <p>REPARTITION</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>REPARTITION</p> <p>↓</p> <p>ETIQUETAGE</p> </div> </div>	VIII	← PROPRETE CONFORMITE (IDENTIFICATION...)
<div style="text-align: center;"> <p>REPARTITION</p> <p>↓</p> <p>ETIQUETAGE</p> </div>	IX	← POIDS, ETANCHEITE, QUALITES A L'EXTRUSION
<div style="text-align: center;"> <p>ETIQUETAGE</p> <p>↓</p> <p>CONDITIONNEMENT</p> </div>	X	← CONFORMITE
	XI	← CONFORMITE

ANNEXE 49

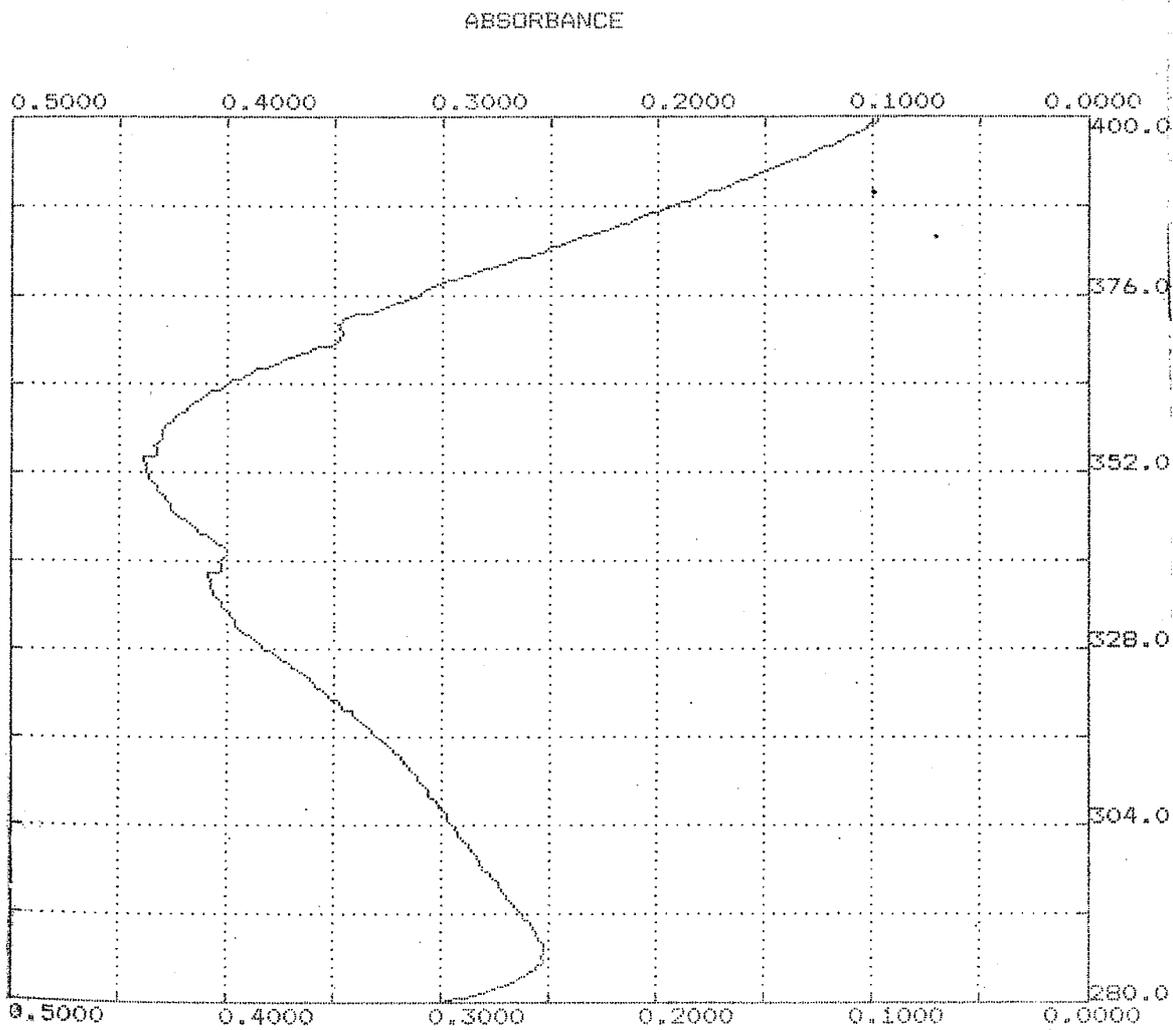
Liste des filtres solaires autorisés en cosmétique

NUMÉRO d'ordre a	SUBSTANCE b	CONCENTRATION maximale autorisée c	AUTRES limitations et exigences d	CONDITIONS D'EMPLOI et d'avertissements à reprendre obligatoirement sur l'étiquetage e
1	Acide 4-aminobenzoïque.	5 %.		
2	Sulfate de méthyle de N, N, N-triméthyl [(oxo-2 bornylidène-3) méthyl]-4 anilinium.	6 %.		
3	Homosalate (DCI).	10 %.		
4	Oxybenzone (DCI).	10 %.	Contient de l'oxybenzone (1).	
5	<i>Supprimé par directive 93/47/CEE du 22 juin 1993.</i>			
6	Acide 2-phényl-benzimidazol 5 sulfonique et ses sels de potassium, de sodium et de triéthanolamine.	8 % (exprimé en acide).		
7	3,3'-(1,4-phénylènediméthylène) bis [7,7-diméthyl-2-oxo-bicyclo-(2,2,1) hept-1-méthanésulfonique acide] et ses sels.	10 % (exprimé en acide).		
8	1-(4-tert-butylphényl)-3-(4-méthoxyphényl) propane-1,3-dione.	5 %.		
9	Acide alpha-(oxo-2-bornylidène-3) -toluène 4-sulfonique et ses sels.	6 % (exprimé en acide).		
10	2-cyano-3,3-diphényl-acide acrylique, ester 27-éthylhexyl (Octocrylène).	10 % (exprimé en acide).		
11	Polymère de N-((2 et 4)-((2-oxoborn-3-ylidène)méthyl)-benzyl)acrylamide.	6 %.		
12	Méthoxycinnamate d'octyle	10 %.		
13	Éthyl-4-aminobenzoate éthoxylé (PEG-25 PABA)	10 %.		
14	Isopentyl-4-méthoxycinnamate (Isoamyl p-Methoxycinnamate)	10 %.		
15	2,4,6-Trianiilino-p-carbo-2'-éthylhexyl-1'oxy-1,3,5-triazine (Octyl Triazone)	5 %.		
16	Phénol, 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-méthyl-6-(2-méthyl-3-(1, 3, 3, 3-tétraméthyl-1-(triméthylsilyloxy)-disiloxanyl)propyl)) Drometrisole Trisiloxane)	15 %.		
17	Acide benzoïque, 4-((6-((1, 1-diméthyléthyl)amino)carbonyl)phényl)amino) 1, 3, 5-triazine-2, 4-diyldiimino)bis-,bis(2-éthylhexyl)ester)	10 %.		
18	3-(4'-Méthylbenzylidène)-d-1 camphre (4-Méthylbenzylidène Camphor)	4 %.		
19	3-Benzylidène camphre (3-Benzylidène Camphor)	2 %.		
20	2-Éthylhexyl-salicylate (octyl-salicylate)	5 %.		

(1) Mention non exigée si la concentration est égale ou inférieure à 0,5 % et si la substance n'est utilisée que pour protéger le produit.

ANNEXE 50

Spectre du sel disodique de quercétine

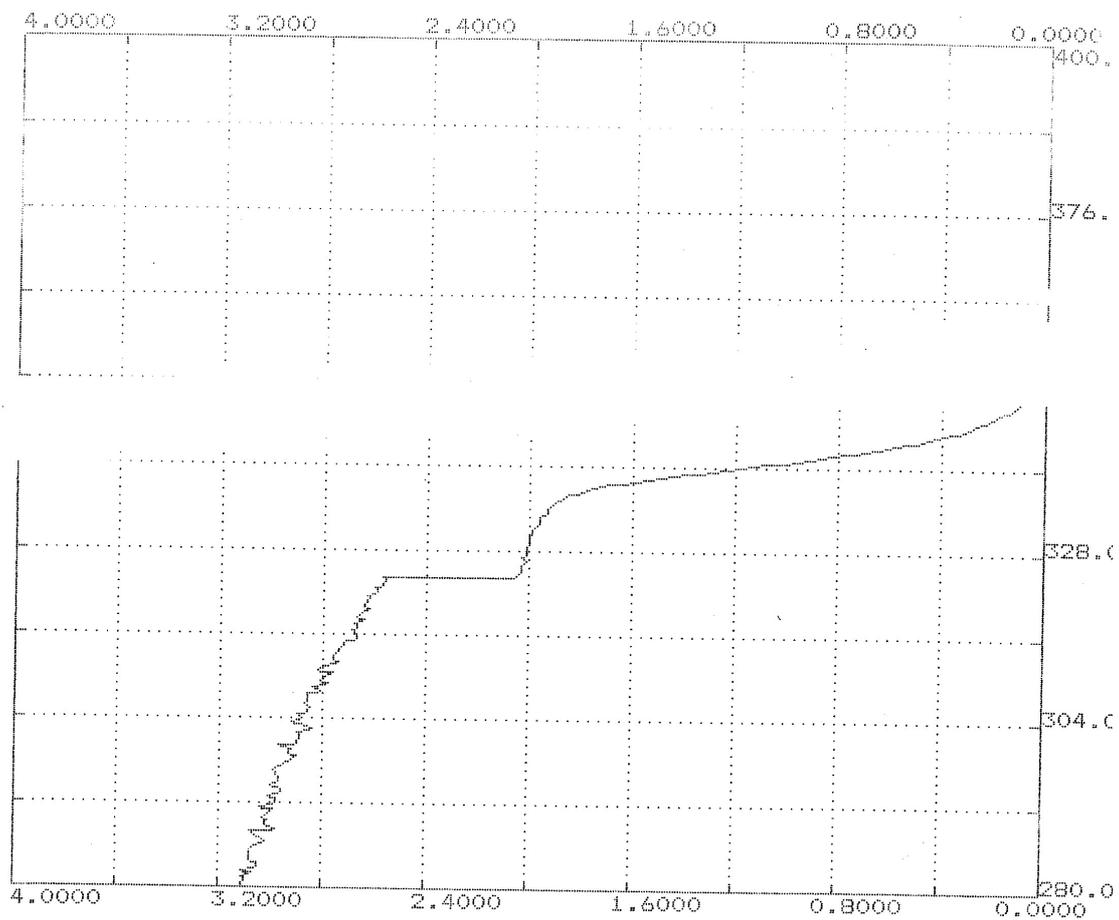


Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
372.0	0.349	280.0	0.301
337.5	0.439		
337.5	0.409		

ANNEXE 50

Spectre du PMC



Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
293.0	3.007	280.0	3.109
290.0	3.034		
290.0	3.034		
287.5	3.062		
285.0	3.082		

ANNEXE 51

Chromatogramme du sel disodiques de quercétine après une heures d'incubation à pH 2,3

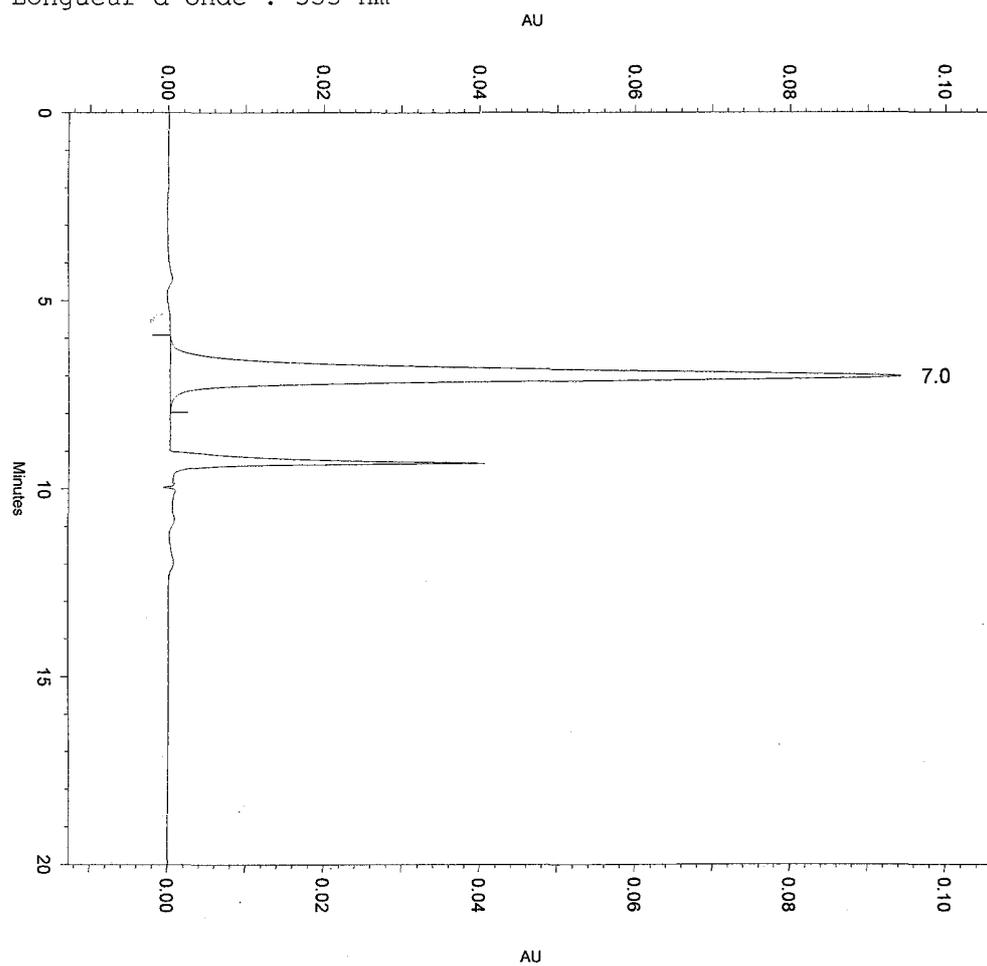
Conditions chromatographiques

Colonne : C18

Débit : 1 ml/min

Phase mobile : 20/80 ACN/Eau acidifiée pH 2,3

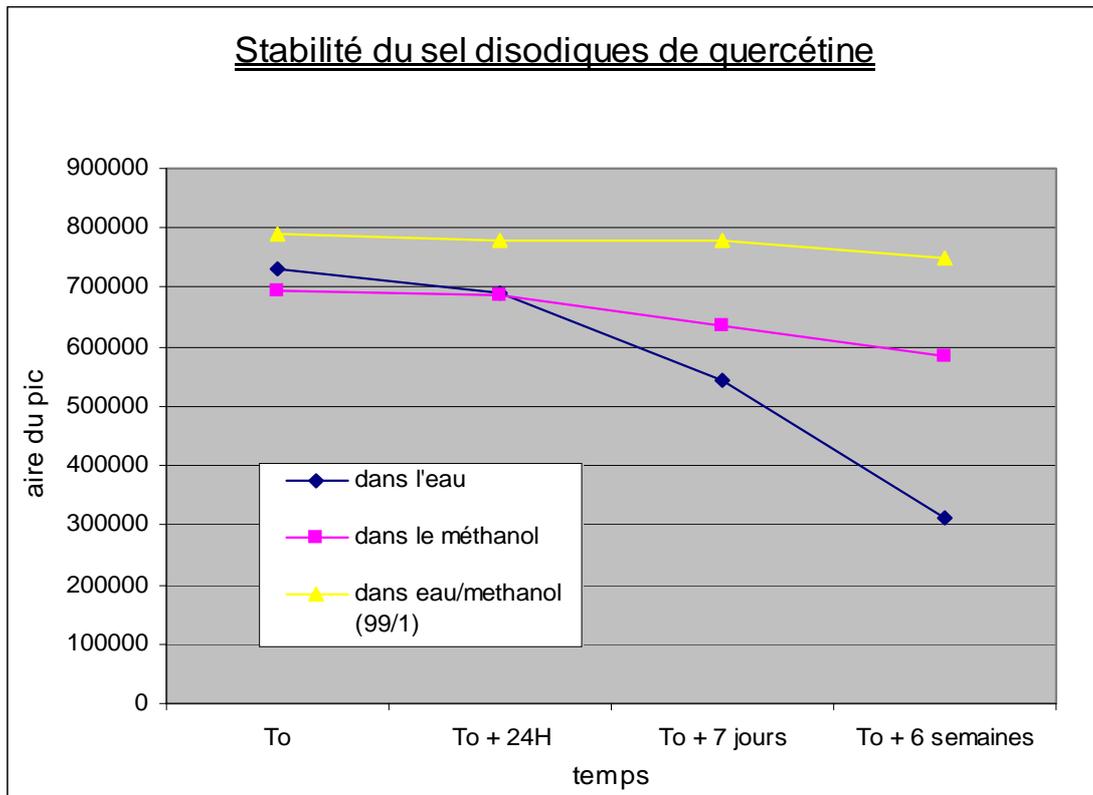
Longueur d'onde : 353 nm



ANNEXE 52

Stabilité du sel disodiques de quercétine dans différents solvants

	Temps	To	To + 24H	To + 7 jours	To + 6 semaines
Dans l'eau	Aire du pic	730463	690123	542613	311036
	Pourcentage de perte		5,52	25,72	57,42
Dans le méthanol	Aire du pic	693231	686794	634049	582567
	Pourcentage de perte		0,93	8,54	15,96
Dans eau/méthanol 99/1	Aire du pic	789403	779854	778043	751023
	Pourcentage de perte		1,21	1,44	4,86



Chromatogramme de l'injection de la solution d'extraction de la crème ne contenant pas le sel disodique de quercétine (spécificité)

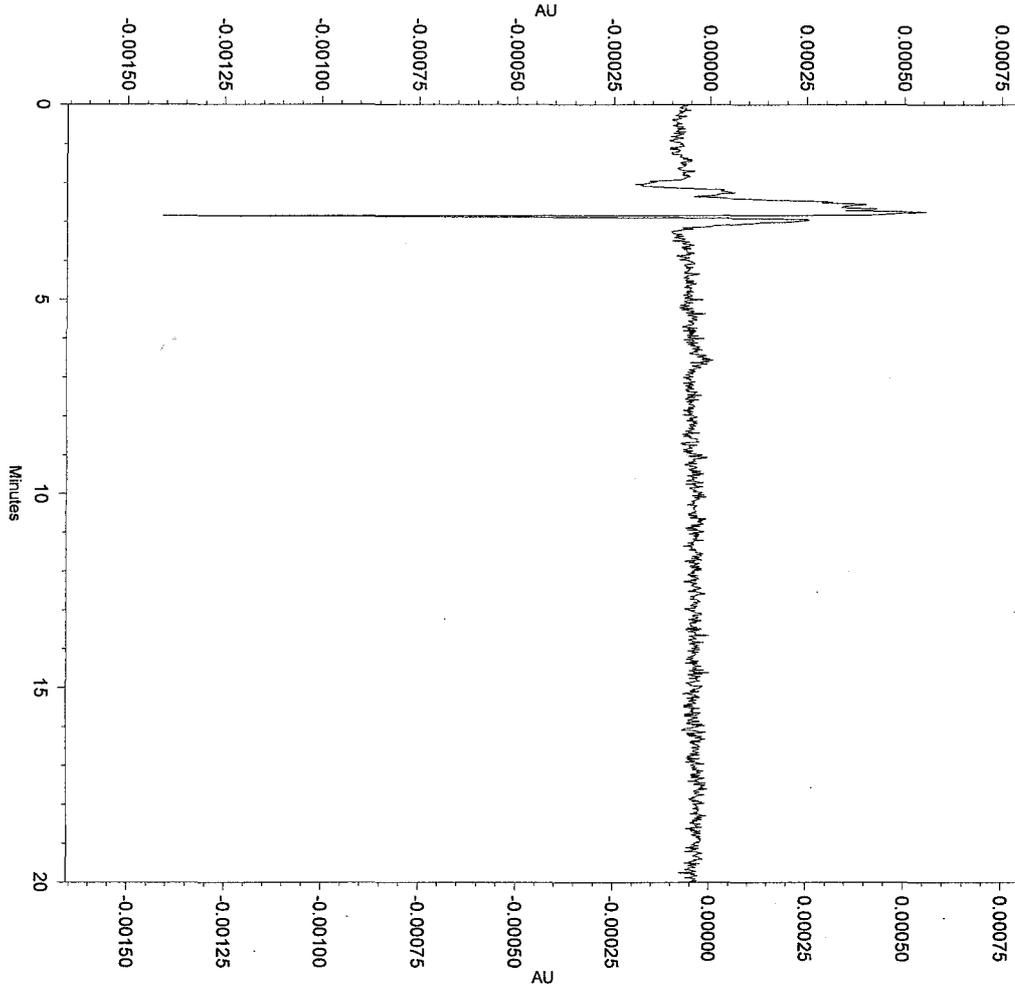
Conditions chromatographiques

Colonne : C18

Débit : 1 ml/min

Phase mobile : 20/80 ACN/Eau acidifiée pH 2,3

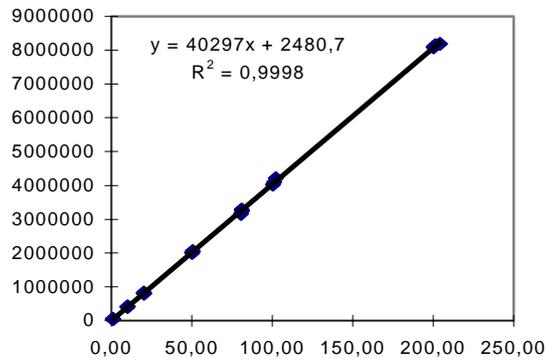
Longueur d'onde : 353 nm



Droites d'étalonnage du disodiques de quercétine de référence dans eau/méthanol 99/1 (linéarité et exactitude)

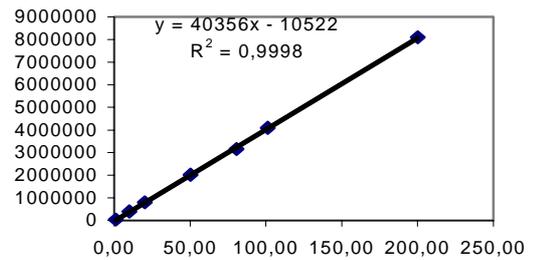
Linéarité: (solution de sel disodique de quercétine)

Essai (i/j)	Conc. (µg/ml) X_{ij}	surface y_{ij}
1/1	1,00	48304
2/1	1,00	48356
3/1	1,01	48035
1/2	10,00	409468
2/2	10,10	415123
3/2	10,13	415456
1/3	20,23	807409
2/3	20,14	828753
3/3	20,33	806542
1/4	50,21	2018094
2/4	50,15	2004186
3/4	50,54	2059854
1/5	80,56	3163111
2/5	81,24	3254645
3/5	81,03	3284521
1/6	101,25	4094543
2/6	102,26	4213546
3/6	100,35	4021555
1/7	200,15	8086613
2/7	201,32	8142332
3/7	204,23	8185338
1/8		
2/8		
3/8		
1/9		
2/9		
3/9		

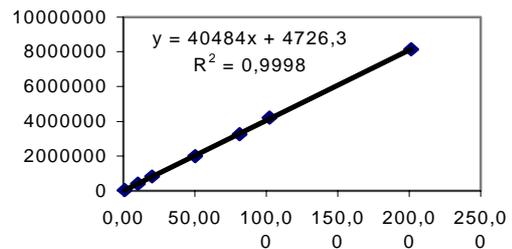


Moyenne= 2027378,0

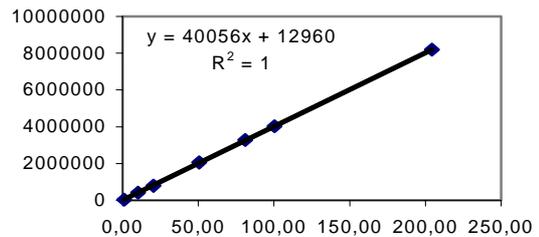
Jour 1



Jour 2



Jour 3

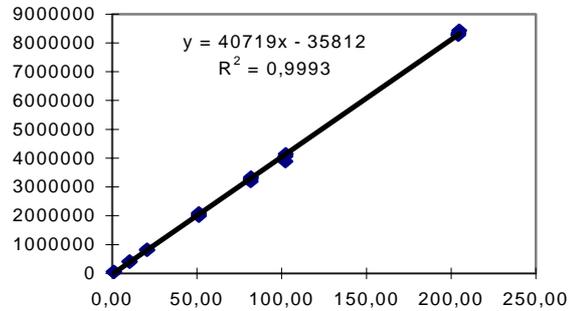


ANNEXE 54

Droites d'étalonnage de disodiques de quercétine de la crème dans eau/méthanol 99/1 (linéarité et exactitude)

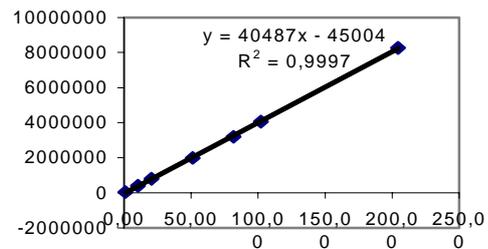
Linéarité: (extrait de la crème)

Essai (i/j)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) X_{ij}	Surface y_{ij}
1/1	1,02	38442
2/1	1,02	47229
3/1	1,02	47023
1/2	10,21	391026
2/2	10,24	410270
3/2	10,22	403196
1/3	20,43	805566
2/3	20,47	826854
3/3	20,44	809083
1/4	51,06	1985725
2/4	51,18	2091654
3/4	51,10	2035556
1/5	81,70	3188425
2/5	81,88	3330744
3/5	81,76	3262412
1/6	102,13	4065005
2/6	102,36	4139055
3/6	102,20	3892263
1/7	204,26	8272252
2/7	204,71	8433473
3/7	204,41	8341990
1/8		
2/8		
3/8		
1/9		
2/9		
3/9		

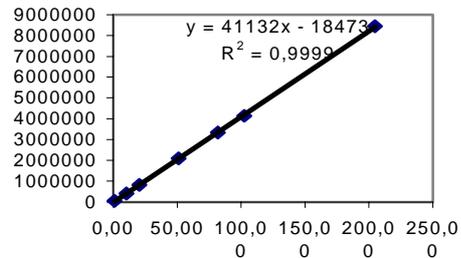


Moyenne= 2037645,0

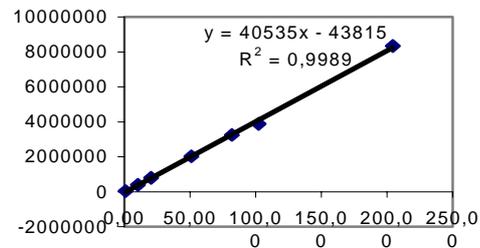
Jour 1



Jour 2



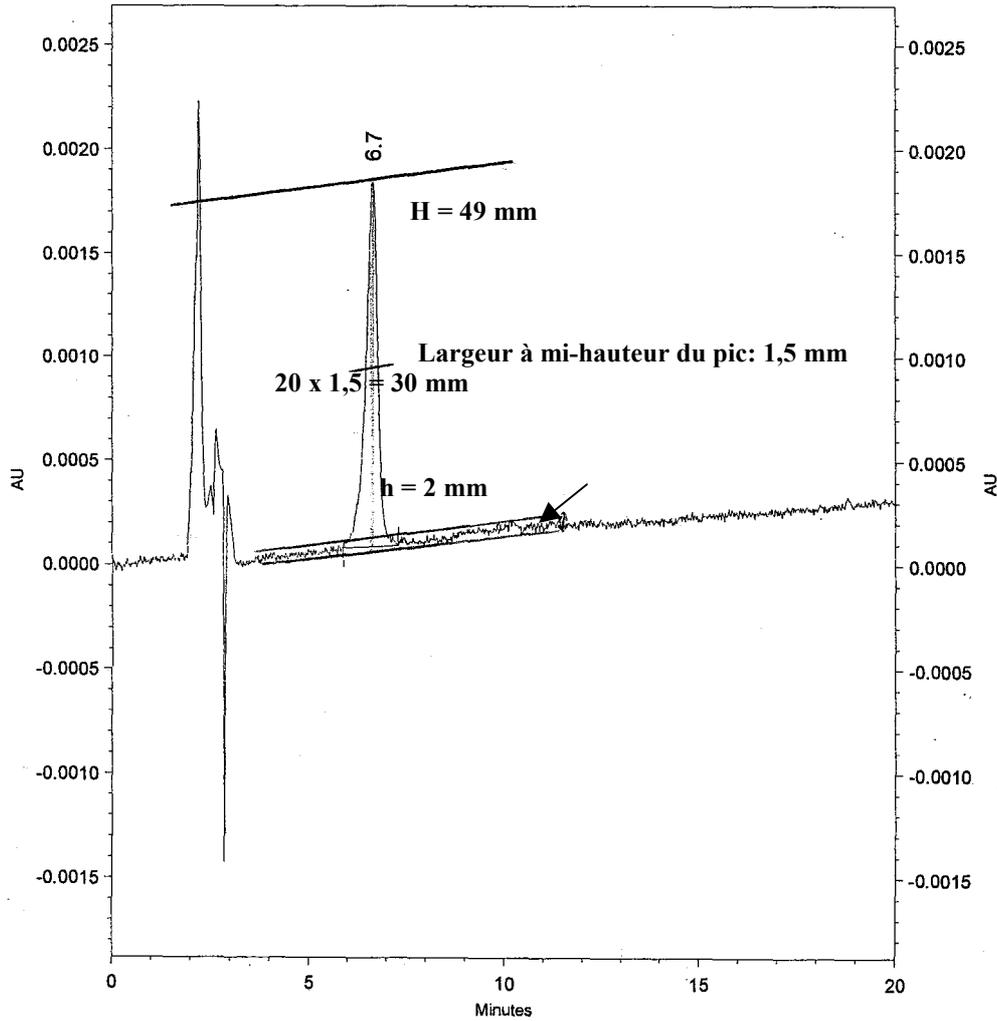
Jour 3



Détermination du seuil de détection et de quantification

Conditions chromatographiques

Colonne : C18
 Débit : 1 ml/min
 Phase mobile : 20/80 ACN/Eau acidifiée pH 2,3
 Longueur d'onde : 353 nm



Det 166
 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height	Height Percent
1		6.650	38654	100.000	1758	100.000
Totals			38654	100.000	1758	100.000

Echelle 1cm = 2min ; bruit de fond sur 6min (3 min de part et d'autre du pic) donc puisque le pic est à 7 min donc le bruit de fond est mesuré de 4 à 10 min.

$$S/N = 2 \times H / h = 2 \times 49 / 2 = 49$$

Mode opératoire pour l'étude de la pénétration cutanée du sel disodiques de quercétine

PHASE DE PENETRATION

- peser environ exactement 0,15 g de crème
- étaler sans masser sur une surface de 5x2 cm bien délimitée
- peser la spatule afin de connaître la quantité exacte déposée
- attendre pendant 60 minutes

PHASE D'EXTRACTION

- poser la bande de stripping sur la surface enduite, appuyer fortement et tirer d'un coup sec
- introduire la bande dans un tube à vis de 15 ml en prenant garde de ne pas mettre en contact la partie collante et le verre du tube
- ajouter 10 ml de MeOH.
- agiter 30 secondes au vortex, puissance maximale
- passer 10 minutes au bac à ultra-sons
- filtrer à travers une membrane de 0,45 µm
- évaporer sous vide (speed vac, de Savant Technologies)
- reprendre le résidu avec 10 ml de mélange eau/méthanol à 99/1
- analyser par HPLC avec la méthode appropriée (Quercetine.met sur HPLC 1)

ANNEXE 57

Résultats de l'étude de la pénétration cutanée in vivo

surface								
couche	1er essais	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	Moyenne	Ecart type
1	6433324	4400649	5316889	6443777	4763201	6626979	5664137	837224
2	2175832	1139531	2940961	1796811	2420899	1320856	1965815	546749
3	846224	1162361	1385292	710397	977016	960792	1007014	177875
4	462315	737202	615419	504033	384588	693983	566257	115945
5	179253	481919	332534	176349	375268	374061	319897	94731
6	158672	462808	215065	190895	293115	363666	280704	92493
7	116093	403058	138354	61867	200953	228014	191390	85952
8	22131	208777	79582	65081	186993	215257	129637	74039
9	43185	207329	70657	30107	240012	209142	133405	85422
10	29150	238049	43325	17457	75640	147958	91930	67382
11	43402	176108	31894	22443	92704	68871	72570	41224
12	9886	213784	22697	19876	60010	107943	72366	58998
13	5030	203391	13155	14947	64218	61229	60328	49284
14	4153	102396	6251	57779	27006	45192	40463	27993
15		101107	7092	9057	21110	34432	34560	26619
16		64079	3249	72537	34089	17347	38260	24038
quantité en µg/cm2								
couche	1er essais	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	Moyenne	Ecart type
1	157	107	130	157	116	162	138	24
2	53	27	71	43	59	32	47	17
3	20	28	33	17	23	23	24	6
4	10	17	14	11	9	16	13	3
5	4	11	7	3	8	8	7	3
6	3	10	4	4	6	8	6	3
7	2	9	3	1	4	5	4	3
8	0	4	1	1	4	4	2	2
9	0	4	1	0	5	4	2	2
10	0	5	0	0	1	3	1	2
11	0	3	0	0	1	1	1	1
12	0	4	0	0	1	2	1	2
13	0	4	0	0	1	1	1	2
14	0	2	0	1	0	0	0	1
15	0	2	0	0	0	0	0	1
16	0	1	0	1	0	0	0	1
quantité en µg de sel retrouvés								
par cm2	248	239	264	237	237	268	249	11
totale	2484	2389	2643	2374	2368	2678	2490	114
quantité en µg de crème déposée								
totale	151 000	149 000	152 000	148 000	144 000	148 000	148667	2000
quantité en µg de sel déposée								
totale	3020	2980	3040	2960	2880	2960	2973	40
% trouvés	82,3	80,2	86,9	80,2	82,2	90,5	84	3

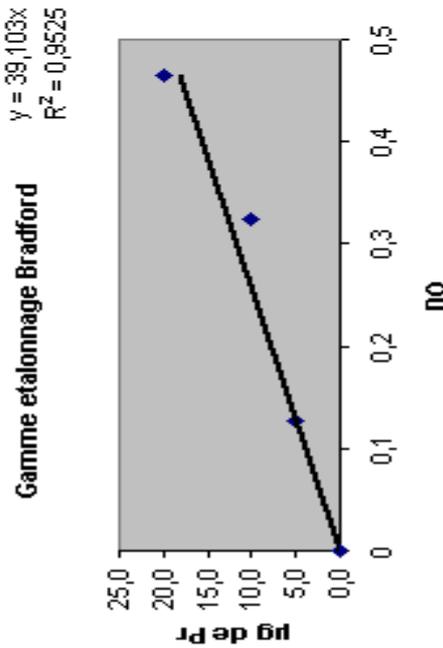
ANNEXE 58

Résultats de l'étude de la pénétration cutanée in vitro

surface										
couche	1er essais	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	Moyenne	Ecart type		
1	1568333	1450337	1352628	2722477	1955622	1802545	1808657	500163		
2	916758	949642	1509238	1791877	1143138	1125544	1239366	343025		
3	663703	989636	821164	765542	769218	954233	827249	123656		
4	802709	1077325	1728367	880044	1096653	1523646	1184791	365643		
5	736985	617775	920168	600617	431605	786516	682278	169774		
6	467032	178263	398830	319142	295324	371800	338399	99180		
7	117759	179837	181931	176048	260588	272045	198035	58152		
8	151513	104577	112016	105895	219577	165123	143117	45253		
9	102919	82663	84526	58479	212429	78563	103263	55333		
10	474122	209203	73571	84596	144108	56321	113560	62839		
11	659267	211988	68969	50974	99052	41195	94436	69303		
12		154173	91701	60068	87293	52865	89220	40001		
13		156808	51366	88372	88178	54662	87877	42391		
		788000	406689	651543	731376	490456	613613	161015		
quantité en µg/ml										
couche	1er essais	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	Moyenne	Ecart type		
1	38	35	32	66	47	43	44	11		
2	22	22	36	43	27	27	30	8		
3	15	23	19	18	18	23	19	2		
4	19	26	42	21	26	37	28	8		
5	17	14	22	14	10	18	16	3		
6	11	3	9	7	6	8	7	2		
7	2	4	4	3	6	6	4	1		
8	3	2	2	2	5	3	3	0		
9	2	1	1	1	4	1	2	0		
10	11	4	1	1	3	1	2	1		
11	15	4	1	0	2	0	1	1		
12		3	1	1	1	0	1	0		
13		3	0	1	1	0	1	0		
		18	9	15	17	11	14	3		
quantité en µg/cm2										
couche	1er essais	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	Moyenne	Ecart type		
1	47,0	43,4	40,4	82,5	58,9	54,2	54,4	14,3		
2	27,0	28,1	45,2	53,9	34,0	33,5	36,9	9,4		
3	19,3	29,3	24,1	22,4	22,5	28,2	24,3	2,7		
4	9,4	12,8	20,8	10,4	13,0	18,3	14,1	4,1		
5	8,6	7,1	10,9	6,9	4,9	9,2	7,9	1,6		
6	5,3	1,7	4,5	3,5	3,2	4,1	3,7	0,8		
7	1,0	1,8	1,8	1,7	2,8	2,9	2,0	0,3		
8	1,4	0,8	0,9	0,9	2,3	1,6	1,3	0,1		
9	0,8	0,6	0,6	0,3	2,2	0,5	0,8	0,2		
10		2,1	0,5	0,6	1,3	0,3	1,0	0,3		
11		2,2	0,4	0,2	0,8	0,1	0,7	0,4		
12		1,5	0,7	0,3	0,6	0,2	0,7	0,1		
13		1,5	0,2	0,6	0,6	0,2	0,6	0,1		
Peau rest.	13,7	9,2	4,6	7,6	8,5	5,6	7,1	1,5		
quantité en µg de sel retrouvés										
par cm2	134	142	155	192	156	159	156	20		
totale	534	568	622	767	622	635	625	80		
quantité en µg de crème déposée										
totale	40 000	40 000	40 000	40 000	40 000	40 000	40 000	40 000		
quantité en µg de sel déposée										
totale	800	800	800	800	800	800	800	800		
% trouvés	66,8	71,0	77,7	95,9	77,8	79,4	78,1	9,9		

Dosage des protéines dans les Cacos-2

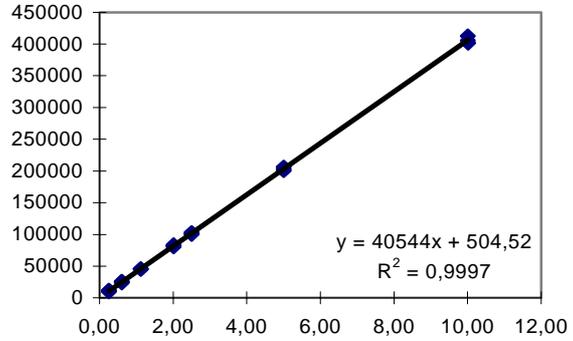
Gamme étalonnage BSA (595nm)			Moyenne en µg/Insert					
Volume de l'échantillon (mL)	Qté dans tube (µg)	DO à 595nm	114					
0	0,0	0	Ecart type	25				
125	5,0	0,1278						
250	10,0	0,32337						
500	20,0	0,4644						
1000	40,0	0,45711						
	0,0	0,5						
Calcul de l'équation de la droite								
Coefficient de pente								
Ordonnée à l'origine								
		40,547						
		-0,530801087						
Calcul de la teneur en Pr des échantillons								
DO à 595nm	Qté dans tube (µg)	Conc. (µg/mL)	Vol. extract. (mL)	1	Aire insert (cm²)	1,1	Nb cellules/mL	1,00E+05
0,13641	5,000153734	125,00	Qté extract. (µg)	125,4026	Qté/insert	114,002	Qté/cellules	1,25E-03
0,15922	5,925020528	148,13	125,0038433	125,0038	113,6398576	113,64	1,25E-03	1,25E-03
0,1056	3,750914543	93,77	148,1255132	148,1255	134,6595575	134,66	1,48E-03	1,48E-03
0,12722	4,627530944	115,69	93,77286357	93,77286	85,24805779	85,2481	9,38E-04	9,38E-04
0,17792	6,683241004	167,08	115,6882736	115,6883	105,1711578	105,171	1,16E-03	1,16E-03
0,11445	4,109751506	102,74	167,0810251	167,081	151,891841	151,892	1,67E-03	1,67E-03
			102,7437877	102,7438	93,40344332	93,4034	1,03E-03	1,03E-03



Droites d'étalonnage de sel disodiques de quercétine pour les faibles concentrations dans eau/méthanol 99/1 après extraction du milieu HBSS (linéarité et exactitude)

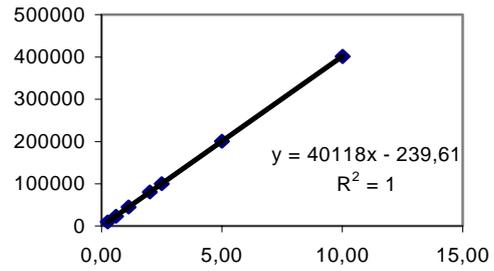
Linéarité: (après extraction)

Essai (i/j)	Conc. (µg/ml)X _{ij}	Surface y _{ij}
1/1	0,25	9639
2/1	0,25	11843
3/1	0,25	11791
1/2	0,60	23571
2/2	0,60	26028
3/2	0,60	25693
1/3	1,12	45067
2/3	1,12	46258
3/3	1,12	45264
1/4	2,01	80269
2/4	2,01	83685
3/4	2,01	81968
1/5	2,50	100255
2/5	2,50	103080
3/5	2,50	101303
1/6	5,00	200611
2/6	5,00	206264
3/6	5,00	202707
1/7	10,01	401422
2/7	10,01	412734
3/7	10,01	405617
1/8		
2/8		
3/8		
1/9		
2/9		
3/9		

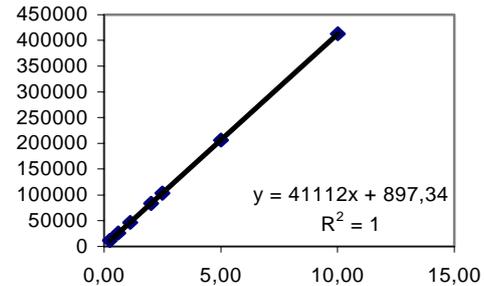


Moyenne= 81973,9

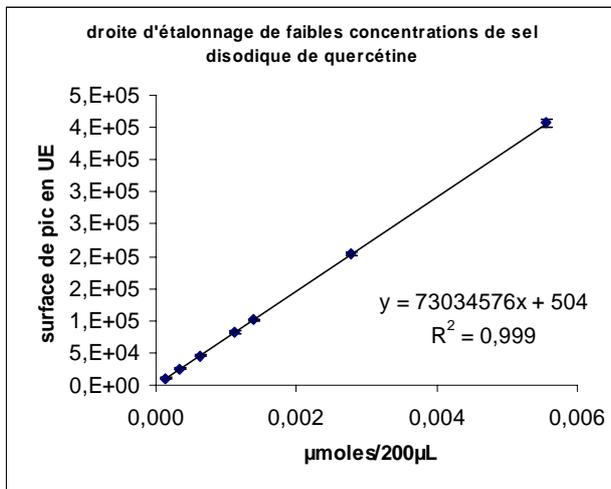
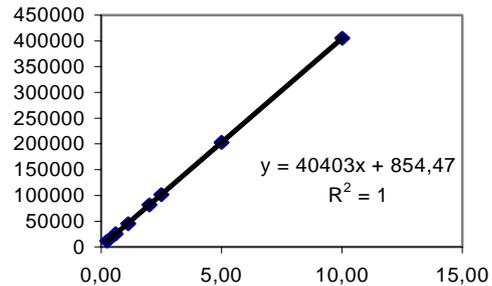
Jour 1



Jour 2



Jour 3



Transport du sel disodiques de quercétine à travers les Cacos-2

Disel de quercétine

A vers B		concentration en $\mu\text{moles/mg}$ de protéines					
temps min	1ère	2ème	3ème	4ème	5ème	Moyenne	Ecart type
30	0,06	0,00	0,06	0,0552	0,066	0,06	0,01
60	0,12	0,14	0,12	0,11	0,14	0,12	0,01
90	0,21	0,27	0,18	0,16	0,20	0,19	0,02
120	0,24	0,39	0,21	0,22	0,25	0,23	0,02

B vers A		concentration en $\mu\text{moles/mg}$ de protéines					
temps min	1ère	2ème	3ème	4ème	5ème	Moyenne	Ecart type
30	0,08	0,02	0,027	0,02	0,03	0,02	0,01
60	0,09	0,03	0,050	0,05	0,06	0,05	0,01
90	0,14	0,07	0,094	0,09	0,11	0,09	0,01
120	0,37	0,13	0,169	0,15	0,15	0,15	0,02

Effet de la phlorizine (inhibiteur du transporteur SGLT1) sur le transport du sel

Disel de quercétine

A vers B		concentration en $\mu\text{moles/mg}$ de protéines					
temps min	1ère	2ème	3ème	4ème	5ème	Moyenne	Ecart type
30	0,06	0,00	0,06	0,0552	0,0658	0,06	0,01
60	0,12	0,14	0,12	0,11	0,14	0,12	0,01
90	0,21	0,27	0,18	0,16	0,20	0,19	0,02
120	0,24	0,39	0,21	0,22	0,25	0,23	0,02

A vers B + phlorizine 116 μM		concentration en $\mu\text{moles/mg}$ de protéines			
temps min	1ère	2ème	3ème	Moyenne	Ecart type
30	-0,02	-0,02	0,000	-0,01	0,01
60	-0,01	-0,01	0,000	-0,01	0,01
90	-0,01	-0,01	0,000	-0,01	0,01
120	-0,01	-0,01	0,00	0,00	0,01

ANNEXE 62

Calcul statistique d'ANOVA et détermination la significativité de la variation de l'absorption à pH 5,5 à 60 minutes

Project1:1way ANOVA of 60min:Tabular results - Thu May 13 11:16:19 2004

Parameter		A	B	C	D
		Value	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	60min				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	0.2109			
5	P value summary	ns			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
7	Number of groups	3			
8	F	2.734			
9	R squared	0.6457			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	0.0004217	2	0.0002108	
13	Residual (within columns)	0.0002314	3	0.00007713	
14	Total	0.0006530	5		
15					
16	No post tests. P > 0.05				

Calcul statistique d'ANOVA et détermination la significativité de la variation de l'absorption à pH 5,5 à 30 minutes

Project1:1way ANOVA of 30min:Tabular results - Thu May 13 11:16:10 2004

Parameter		A	B	C	D
		Value	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	30min				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	0.0384			
5	P value summary	*			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	3			
8	F	11.67			
9	R squared	0.8861			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	0.0002699	2	0.0001350	
13	Residual (within columns)	0.00003469	3	0.00001156	
14	Total	0.0003046	5		
15					
16					

Etude de l'absorption de la quercétine sur les Cacos-2

Droite d'étalonnage			Equation de la droite		
Volume prélevé pour les vials (ml)			0,2	Pente de droite	
Conc (µM)			67,771		
Qté (nmol)	AUC				
0	0	0			
5	1	94,396			
10	2	108,63			
20	4	267,444			
30	6	399,01			
40	8	556,424			
50	10	807,766			
0	0				
Calcul des paramètres de passage					
Donneur (ml)	0,5	Receveur (ml)	1,5	Coeff de compartiment	
Conc donneur(µM)	100	mg/insert (mg)	8,42E-02	Qté donneur (nmol/mg)	
				7,5	
				5,94E+02	
Résultats expérimentaux					
temps (min)	AUC	nmol/vial	nmol/insert	nmol/mg	% absorbe
0	0	0	0	0,00E+00	0
30	15,12	0,223104278	1,67328208	1,99E+01	3,346564165
60	29,734	0,438742235	3,29056676	3,91E+01	6,581133523
90	82,02	1,210252173	9,0768913	1,08E+02	18,15378259
120	50,915	0,751280046	5,63460035	6,69E+01	11,26920069

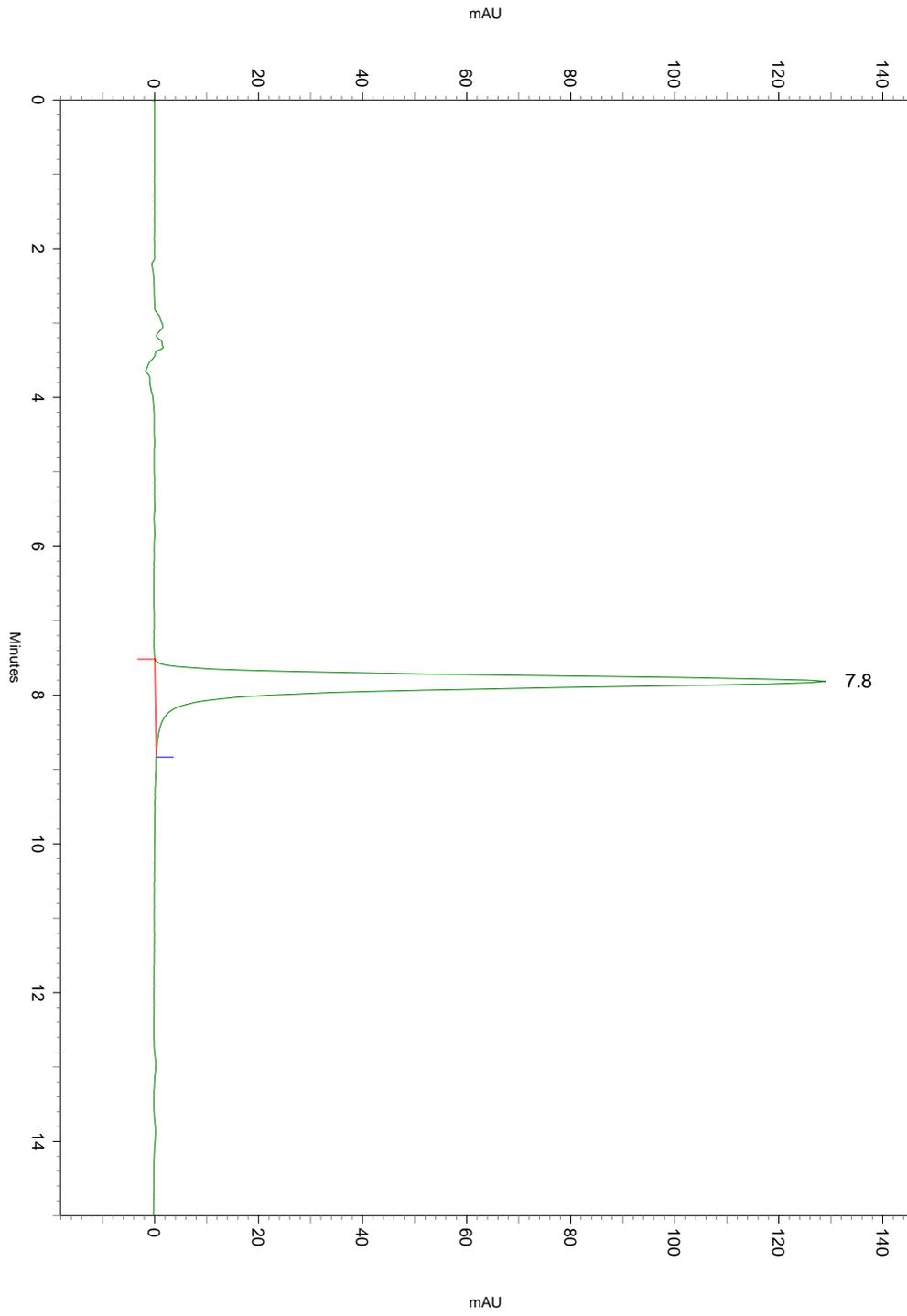
Comparaison entre l'absorption intestinale du sel disodiques de quercétine et celui de la quercétine

disel de quercétine / quercétine

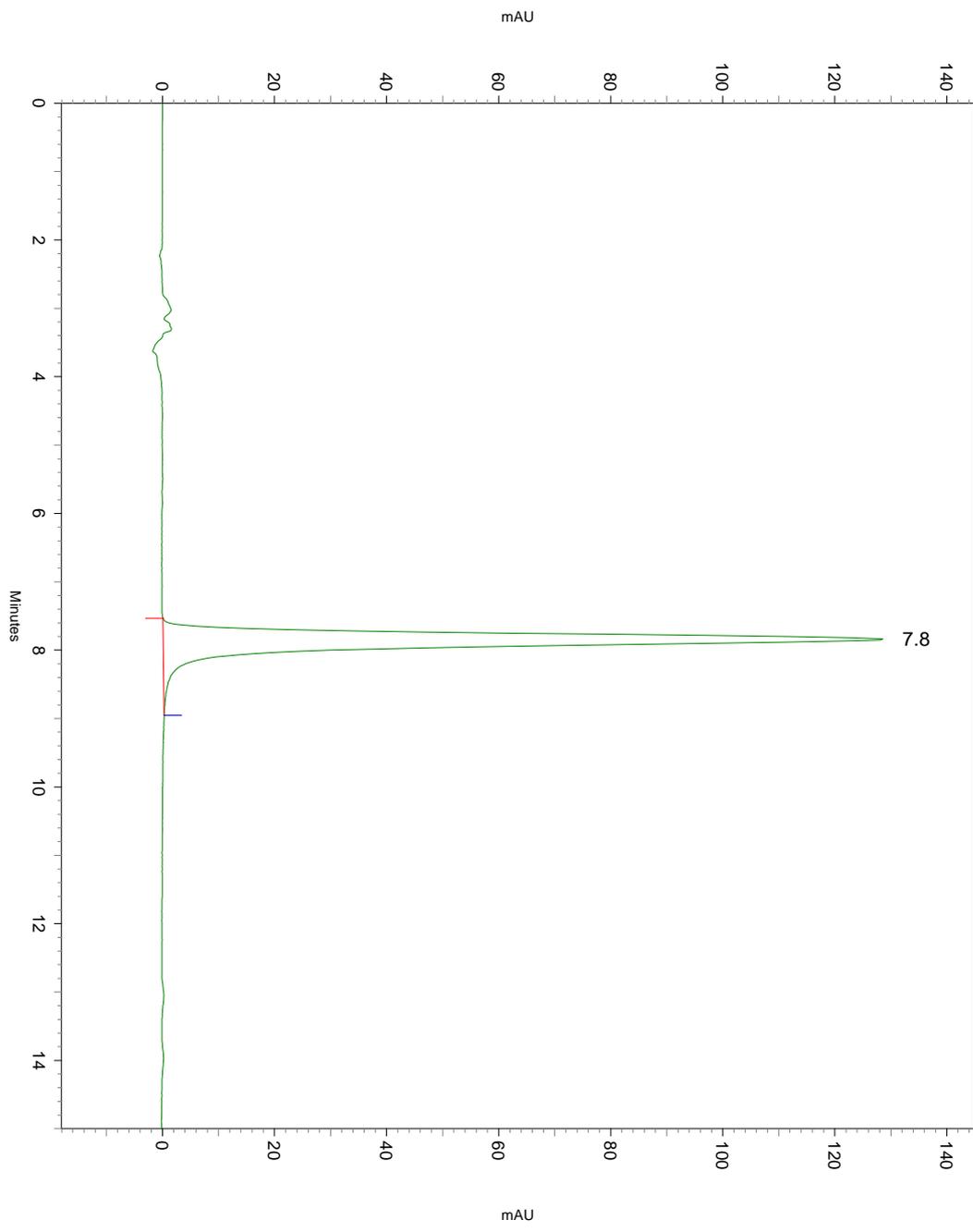
A vers B disel de quercétine				Quantité en µmoles/mg de protéines			
temps min	1ère	2ème	3ème	4ème	5ème	Moyenne	Ecart type
30	0,06	0,00	0,06	0,0552	0,066	0,06	0,01
60	0,12	0,14	0,12	0,11	0,14	0,12	0,01
90	0,21	0,27	0,18	0,16	0,20	0,19	0,02
120	0,24	0,39	0,21	0,22	0,25	0,23	0,02

A vers B Quercétine				
temps min	1ère	2ème	Moyen	Ecart type
30	0,02	0,02	0,02	0,00
60	0,04	0,05	0,04	0,01
90	0,11	0,09	0,10	0,01
120	0,07	0,10	0,08	0,02

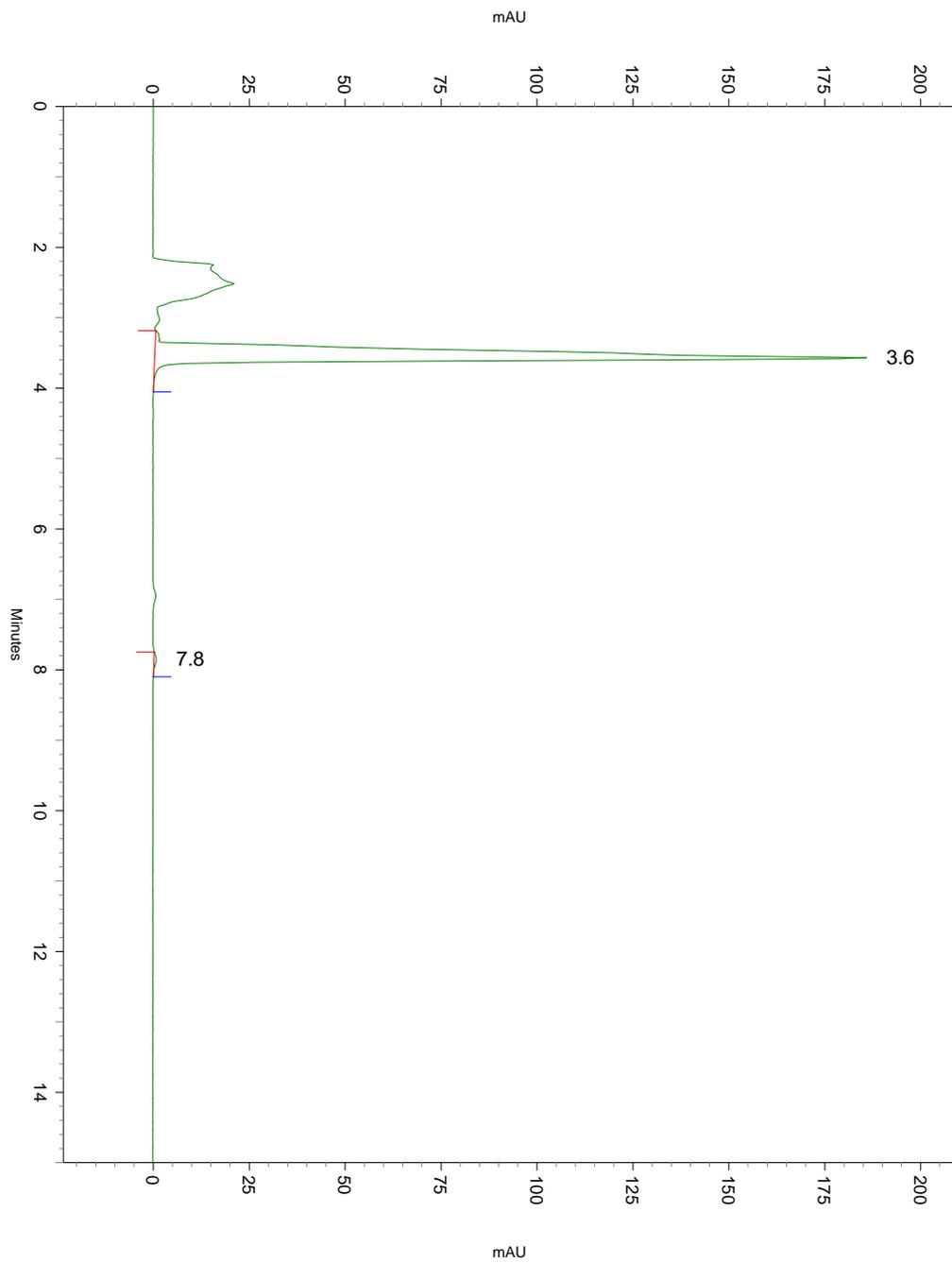
Chromatogrammes à pH 2,3



Quercétine

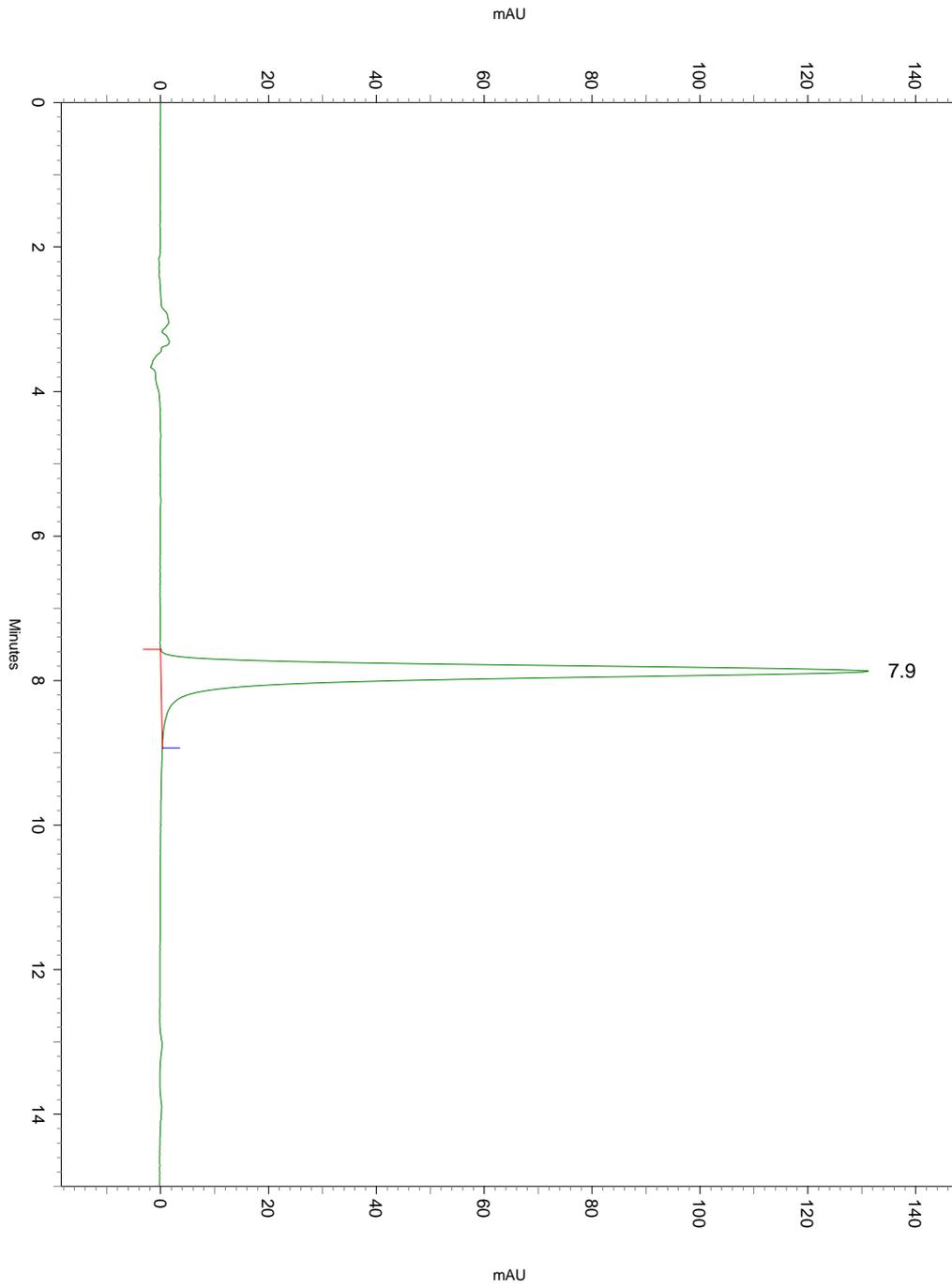


Sel Monosodique de quercétine

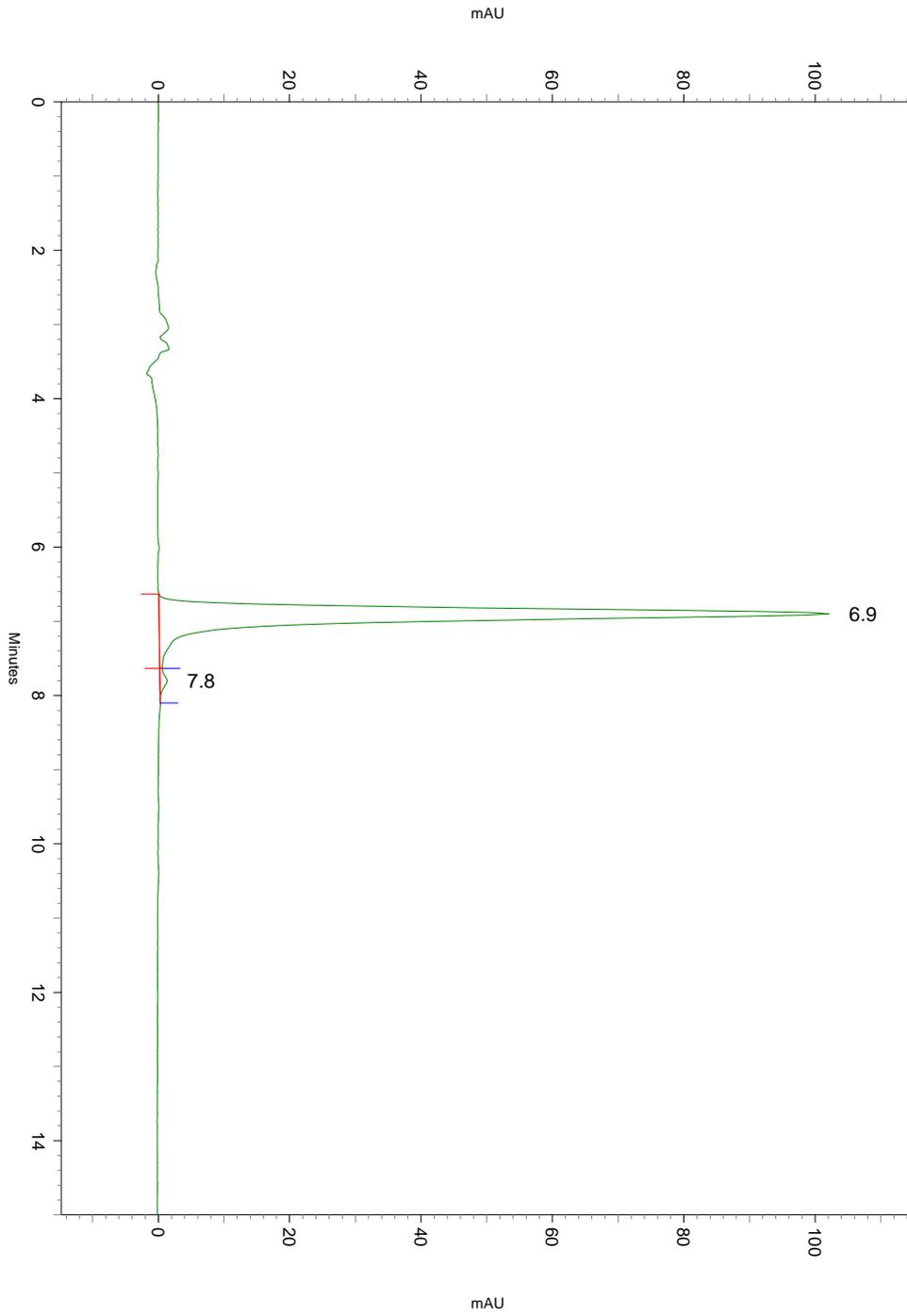


Sel disodique de quercétine

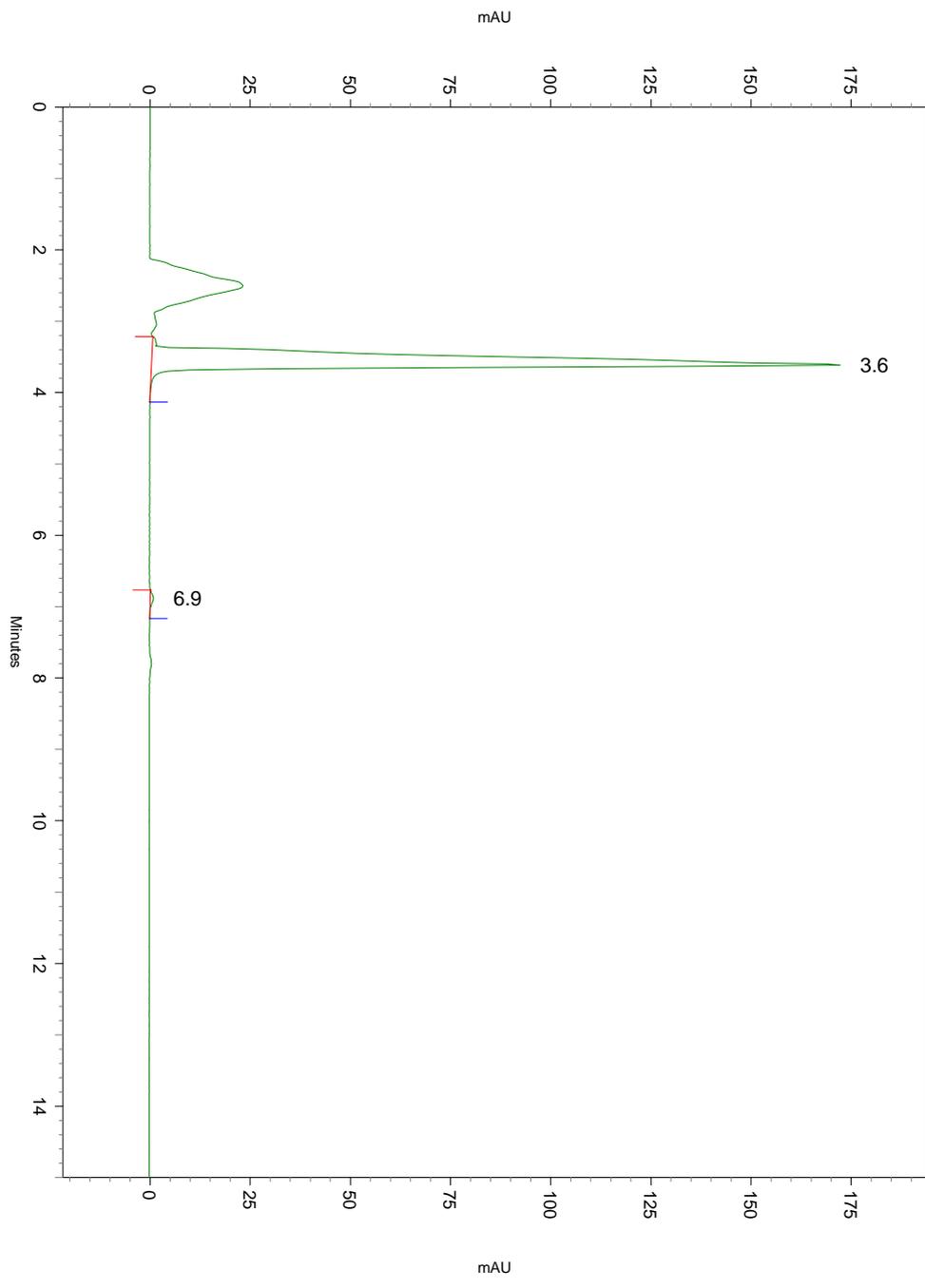
Chromatogrammes à pH 7,4



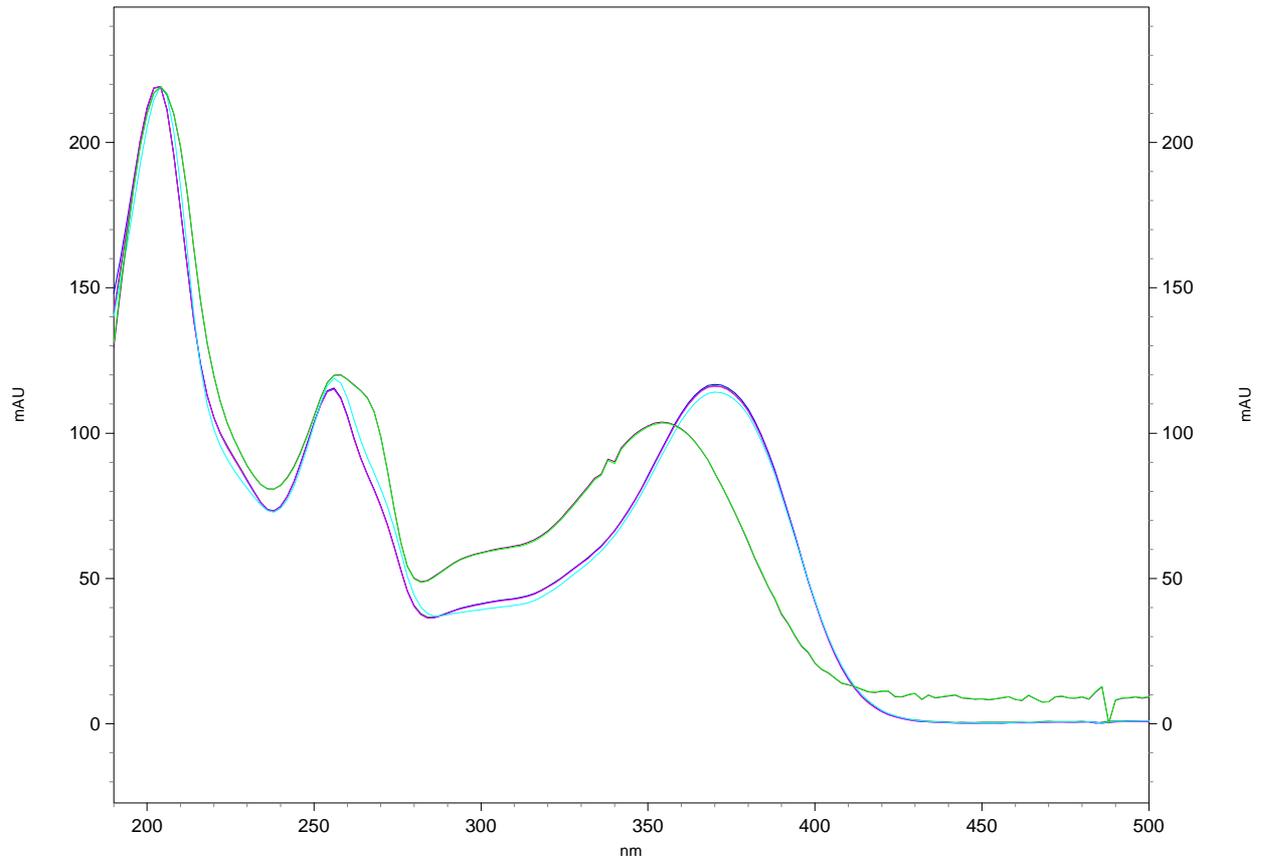
Quercétine



Sel Monosodique de quercétine



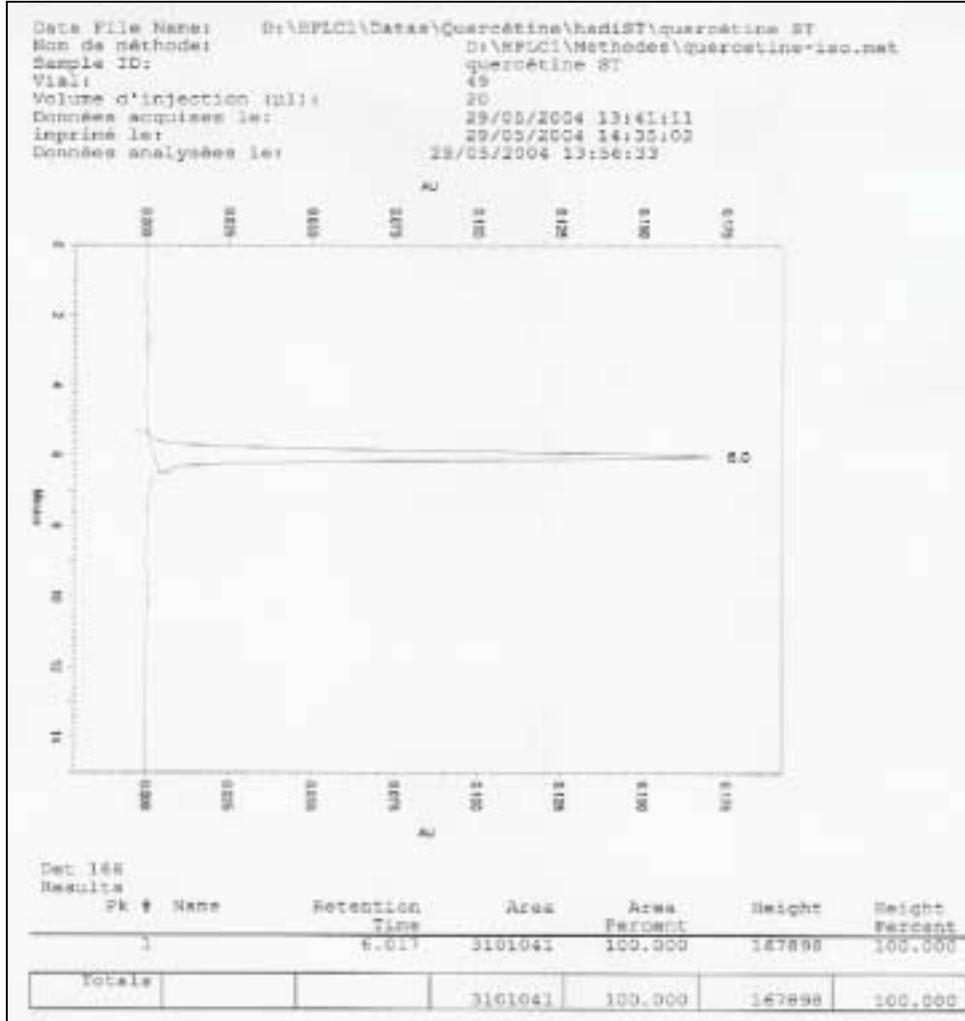
Sel Disodique de quercétine

Spectres d'absorption des différents pics

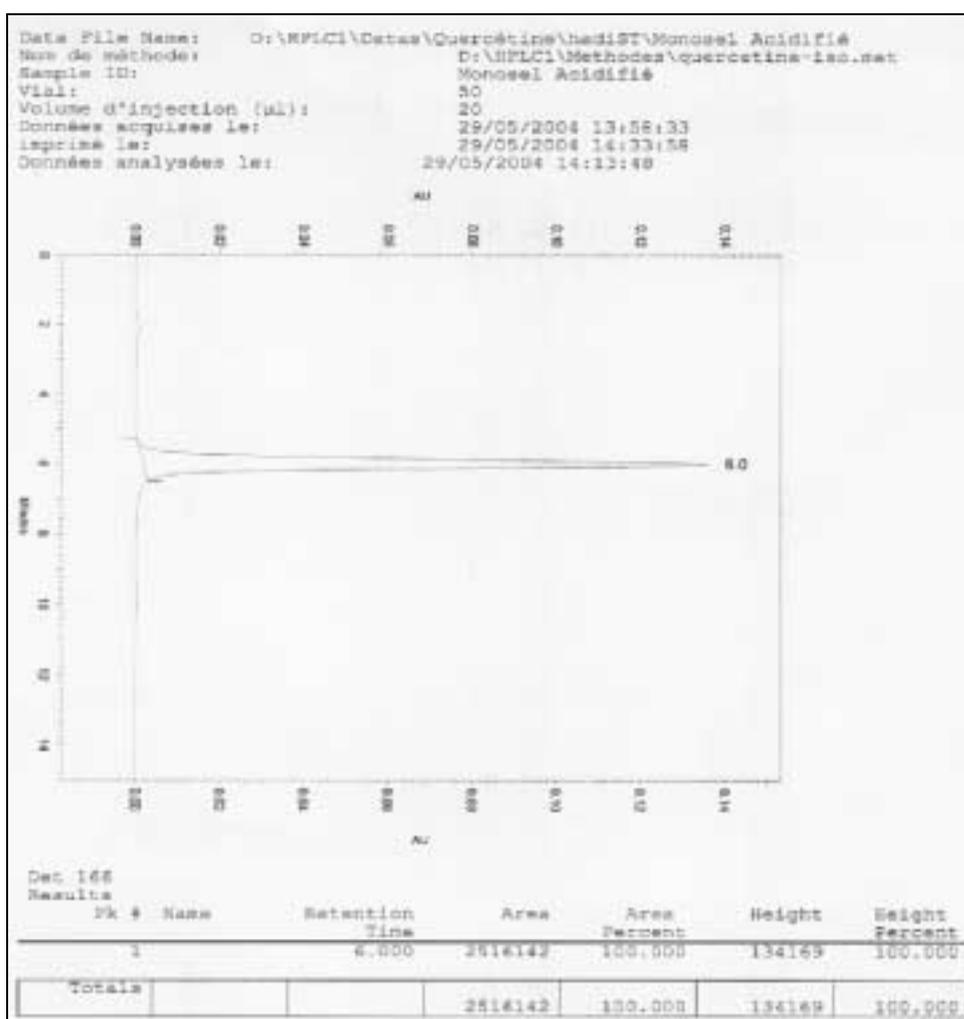
Les spectres représentant un maximum à 350 nm correspondent au pic de temps de rétention 3,6 min à pH 7,4 et 2,3(sel disodique de quercétine).

Les spectres représentant un maximum à 370 nm correspondent au pic de temps de rétention 6,9 et 7,8 min (sel monosodique de quercétine et la quercétine elle-même).

Chromatogrammes après acidification des différents sels

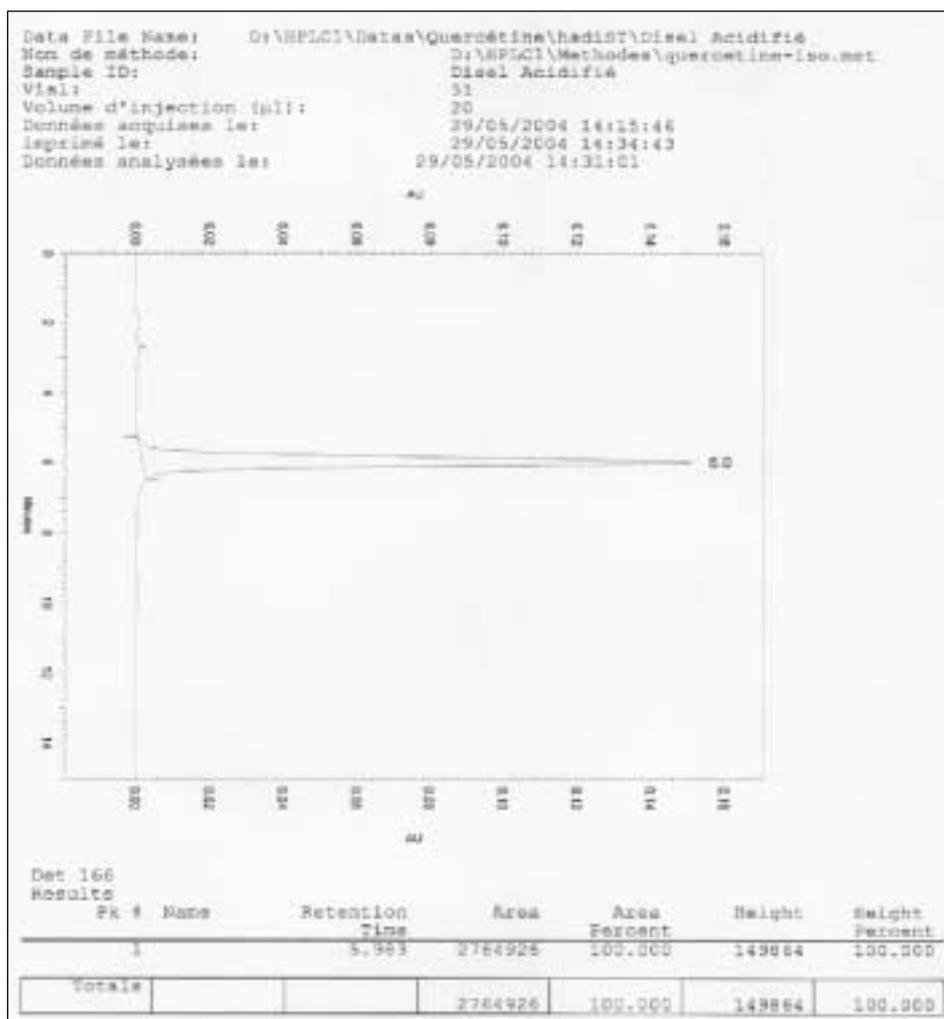


Chromatographie liquide de la quercétine de référence (produit sec) 0,1 µmole/mL



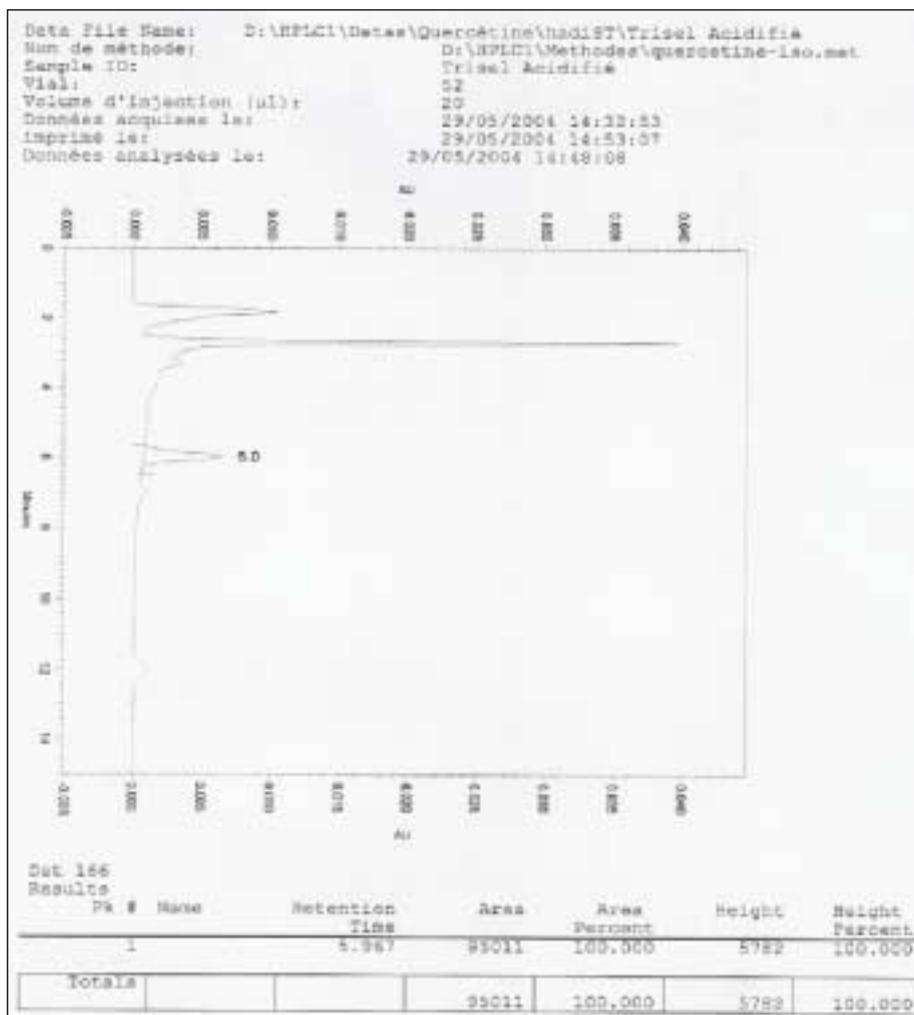
Chromatographie liquide du sel monosodique de quercétine 0,089 µmole/mL

Le sel monosodique (0,089 µmole/mL) conduit à la formation de 0,081 µmole/mL de quercétine ce qui correspond à 91,01 %. Or le sel peut contenir de l'eau résiduelle. La perte à la dessiccation a été réalisée par chauffage à 120°C durant deux heures ; elle est de 4,7 %. La concentration de la quercétine est donc de 95,7 % sur produit sec.



Chromatographie liquide du sel disodique de quercétine 0,095 µmole/mL

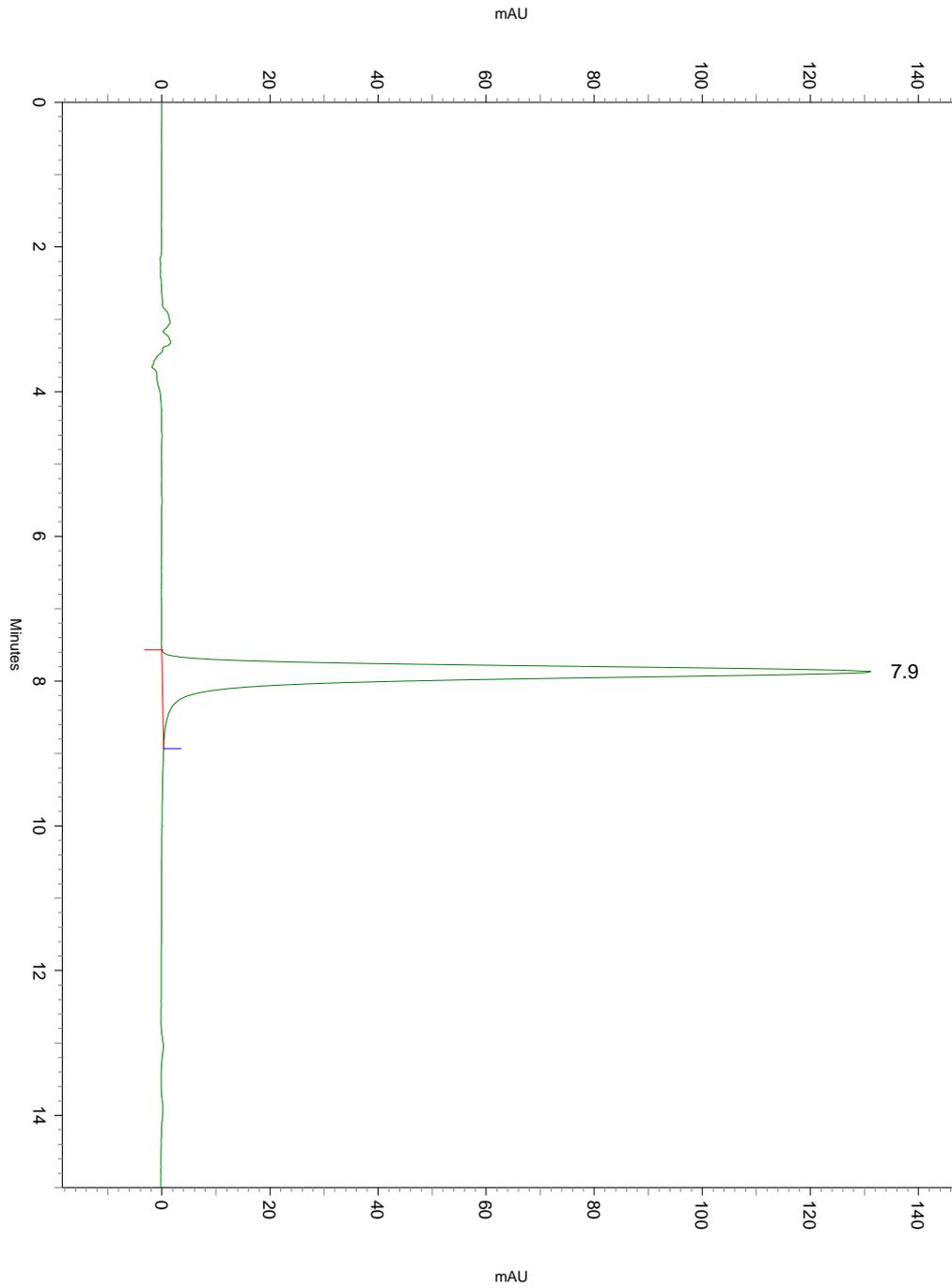
Le sel disodique (0,095 µmole/mL) conduit à la formation de 0,089 µmole/mL de quercétine ce qui correspond à 93,36 %. Or le sel peut contenir de l'eau résiduelle. La perte à la dessiccation a été réalisée par chauffage à 120°C durant deux heures ; elle est de 4,3 %. La concentration de la quercétine est donc de 97,7 % sur produit sec.



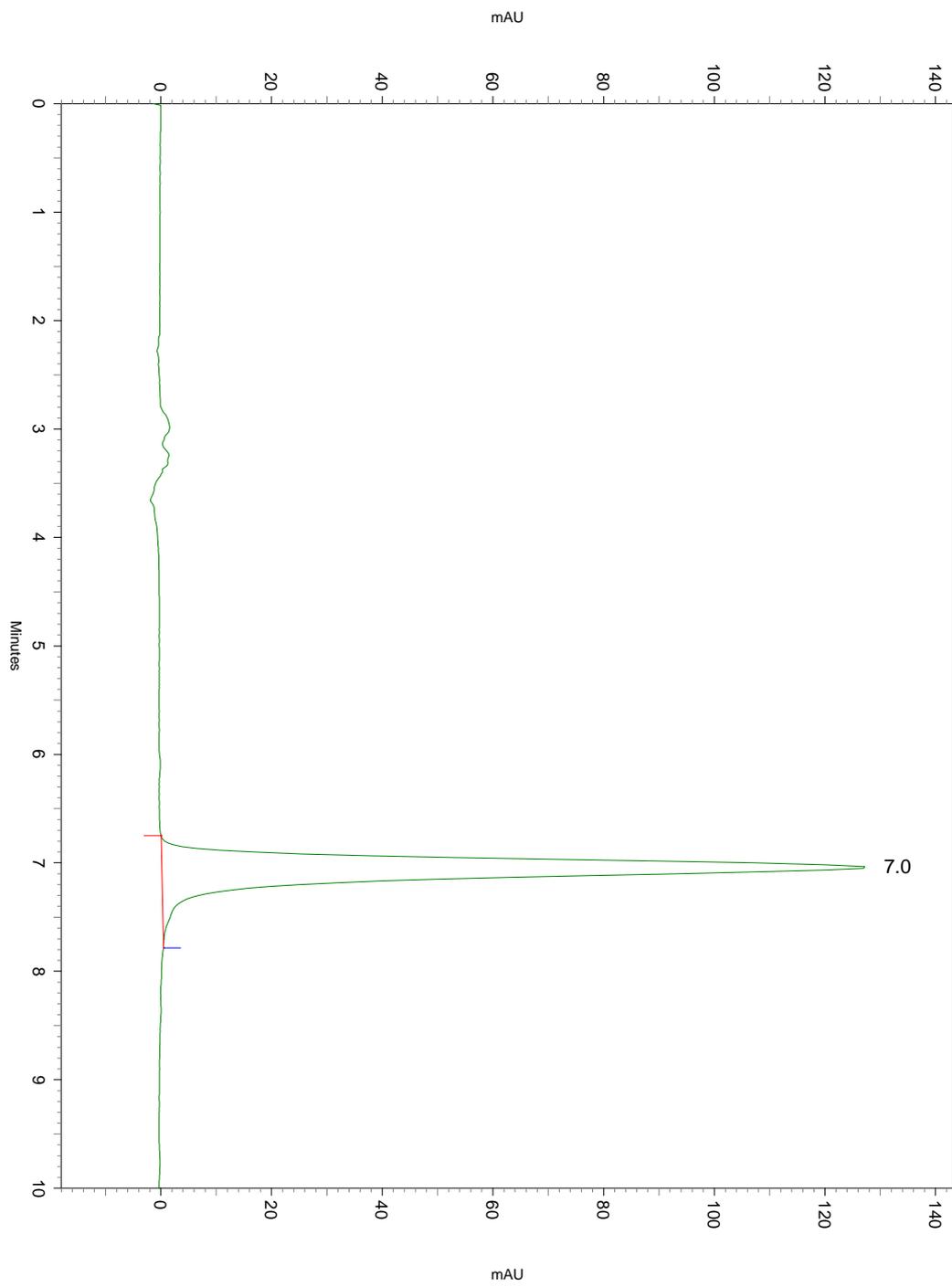
Chromatographie liquide du sel trisodique de quercétine 0,089 µmole/mL

Le sel trisodique (0,089 µmole/mL) conduit à la formation de 0,031 µmole/mL de quercétine ce qui correspond à 34,80 %. Or le sel peut contenir de l'eau résiduelle. La perte à la dessiccation a été réalisée par chauffage à 120°C durant deux heures ; elle est de 9 %. La concentration de la quercétine est donc de 43,80 % sur produit sec.

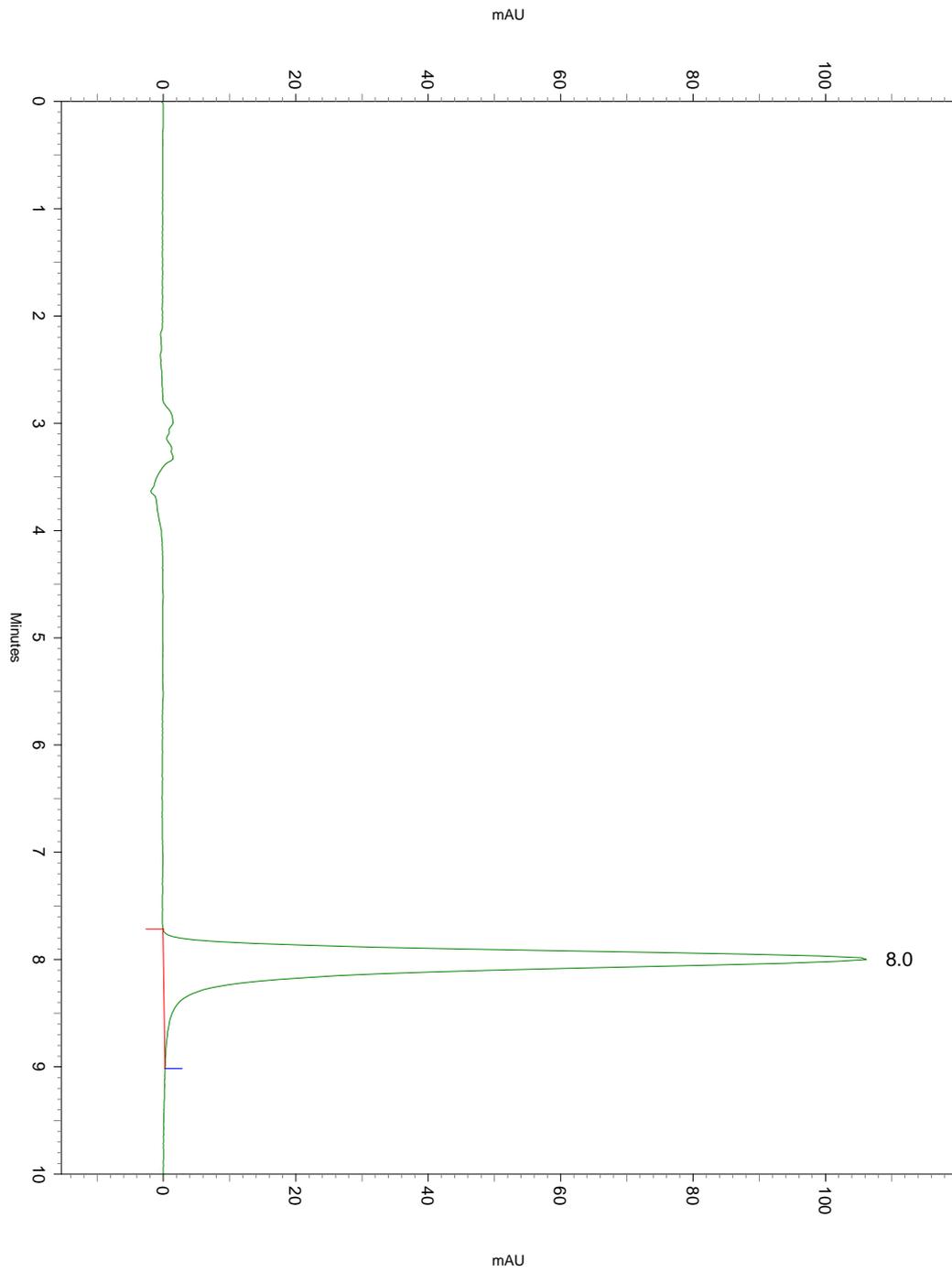
Chromatogrammes après 24 h dans tampon phosphate de la quercétine et son sel disodique



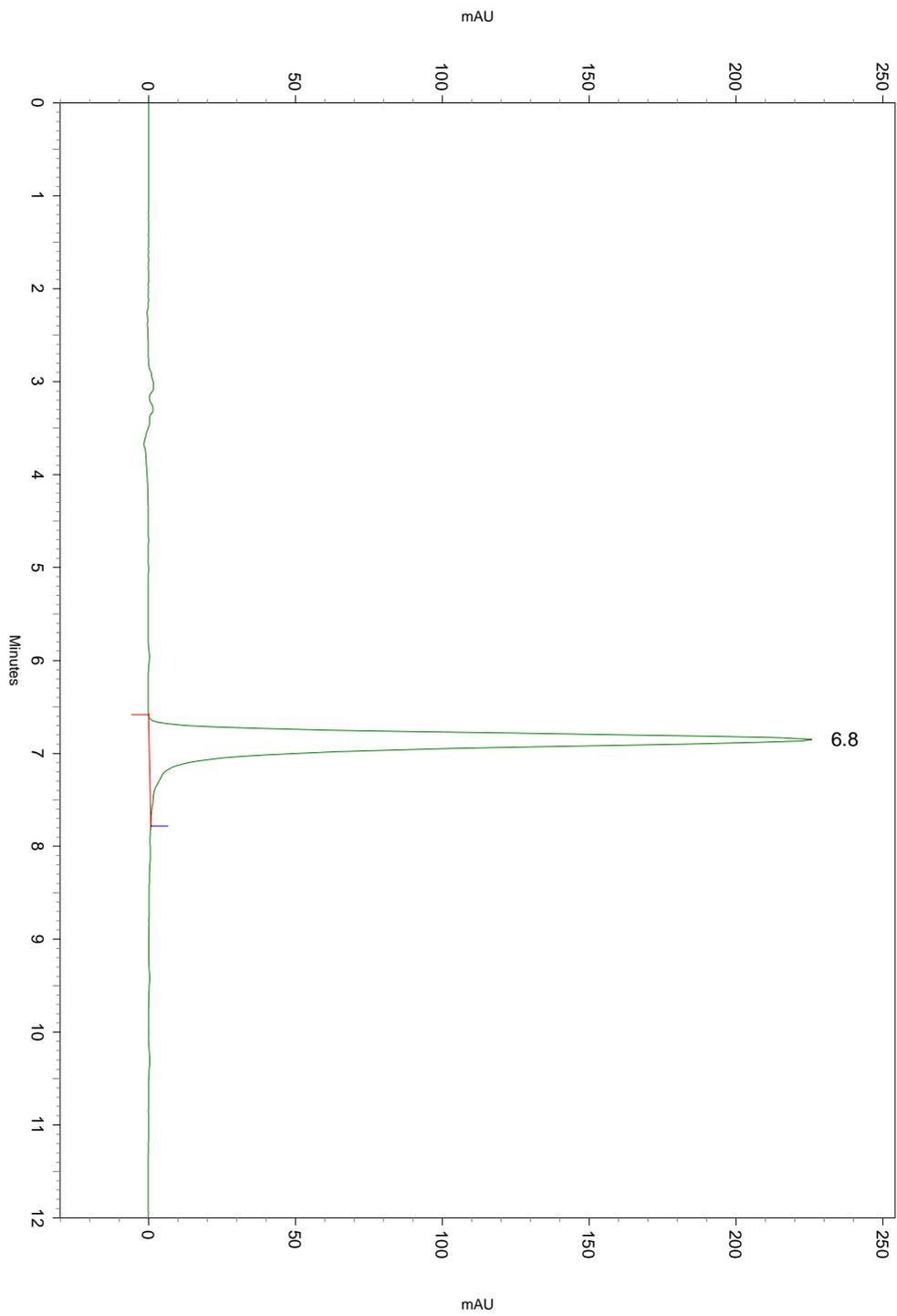
Quercétine à pH 2,3 ou solution aqueuse après 24h



Quercétine à pH 7,4 après 24 h

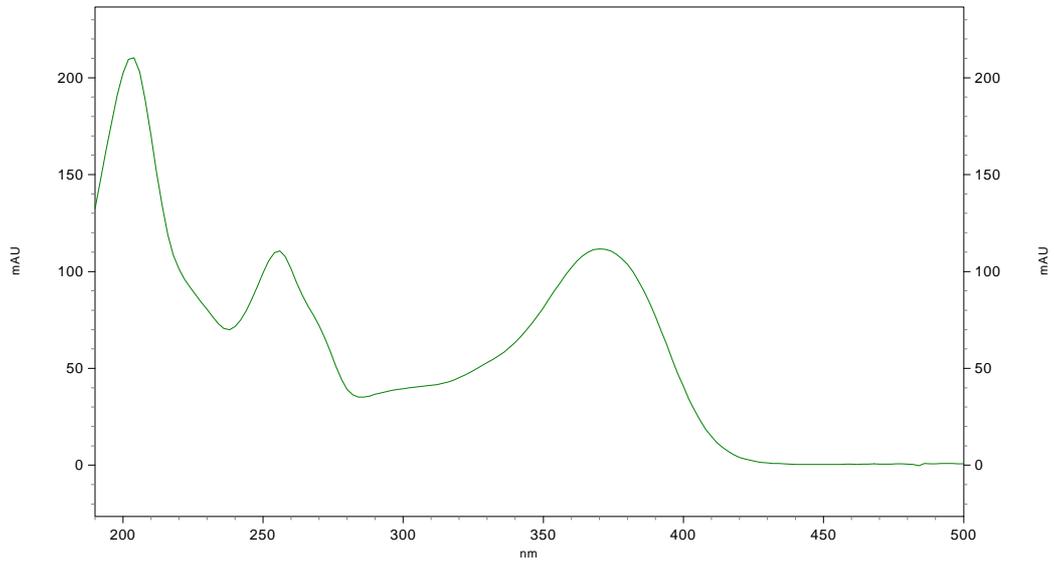


Sel disodique de quercétine après 24 h à pH 2,3

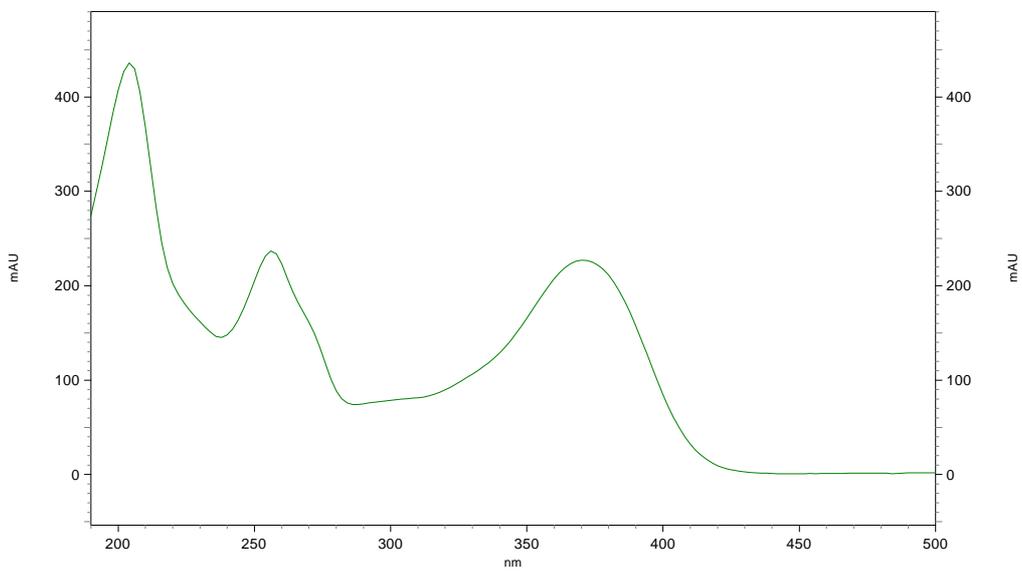


Sel disodique de quercétine après 24 h à pH 7,4

Spectres d'absorption après 24 h dans tampon phosphate de la quercétine et son sel disodique

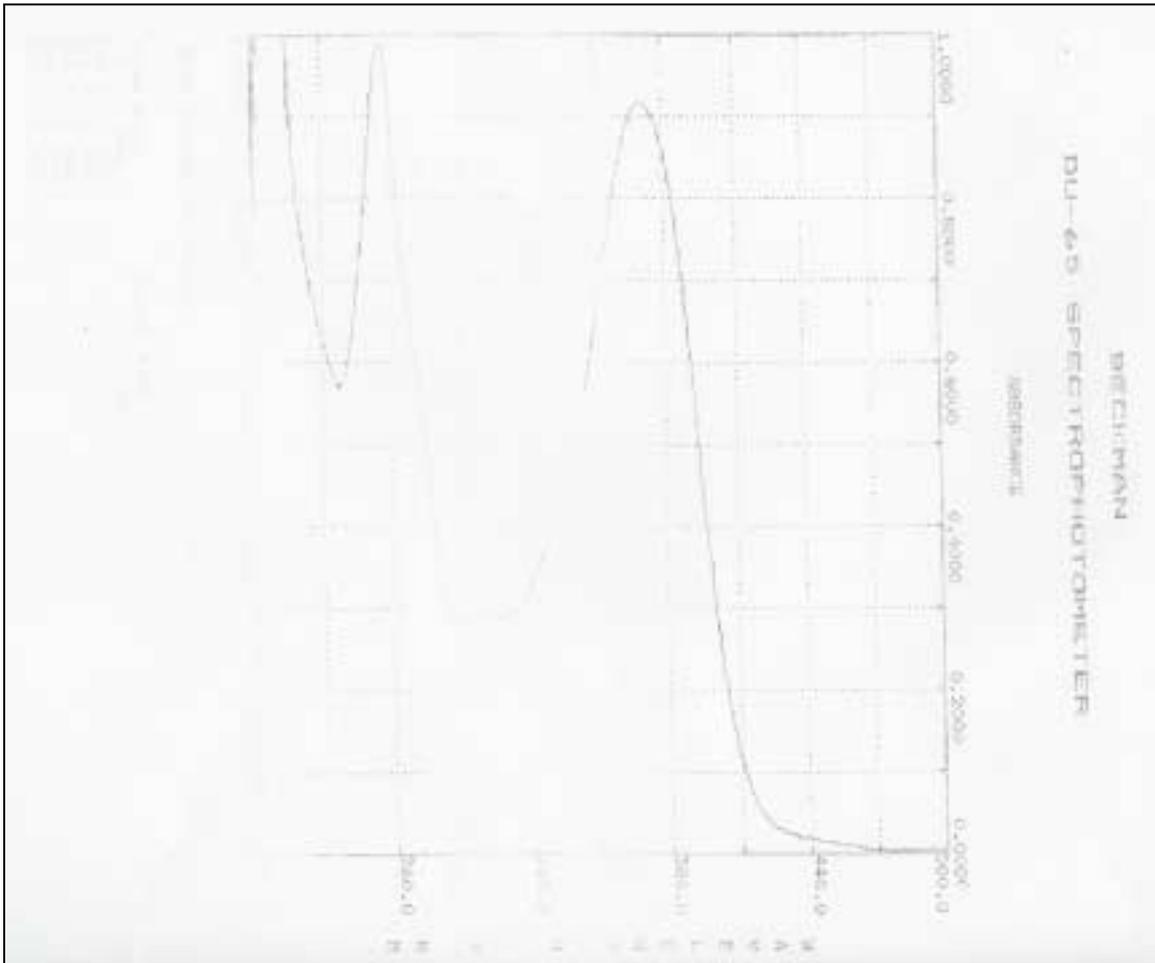


Quercétine

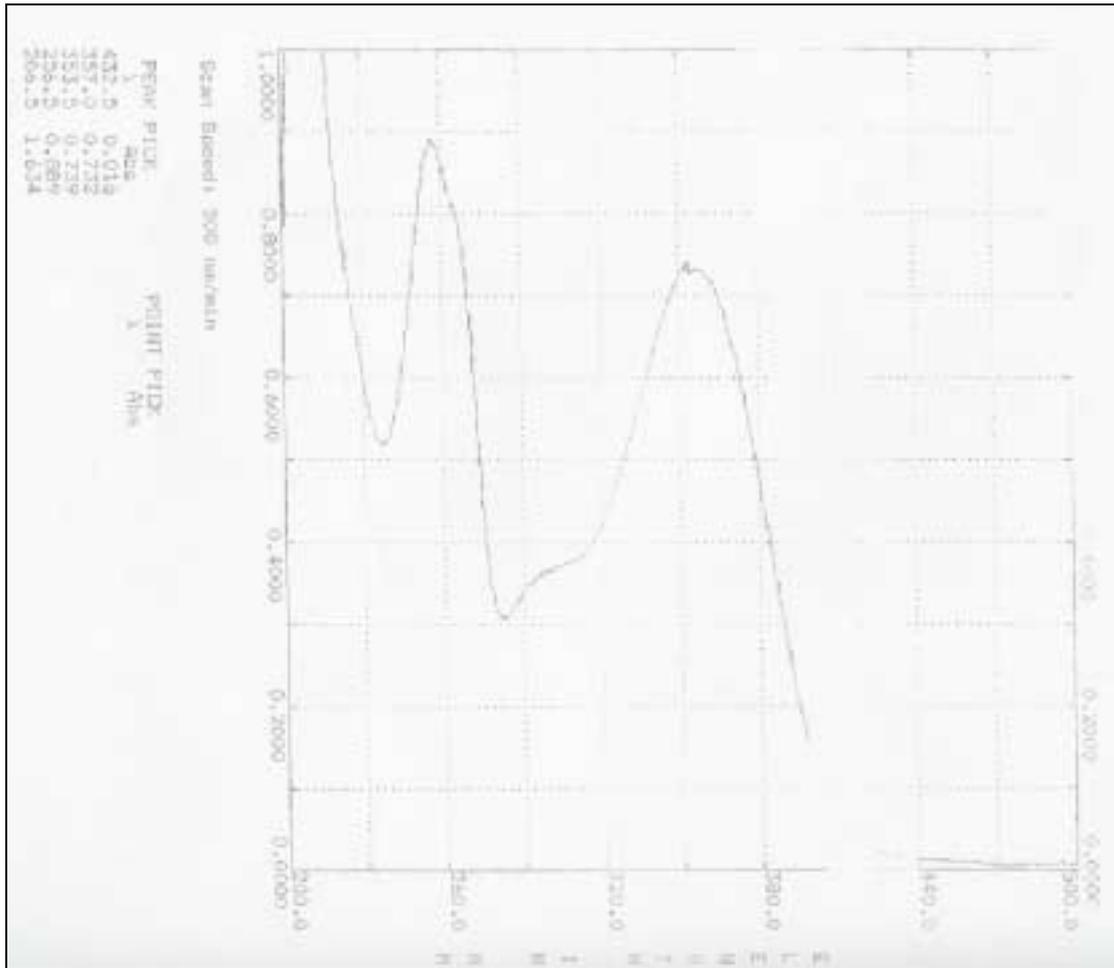


Sel disodique de quercétine

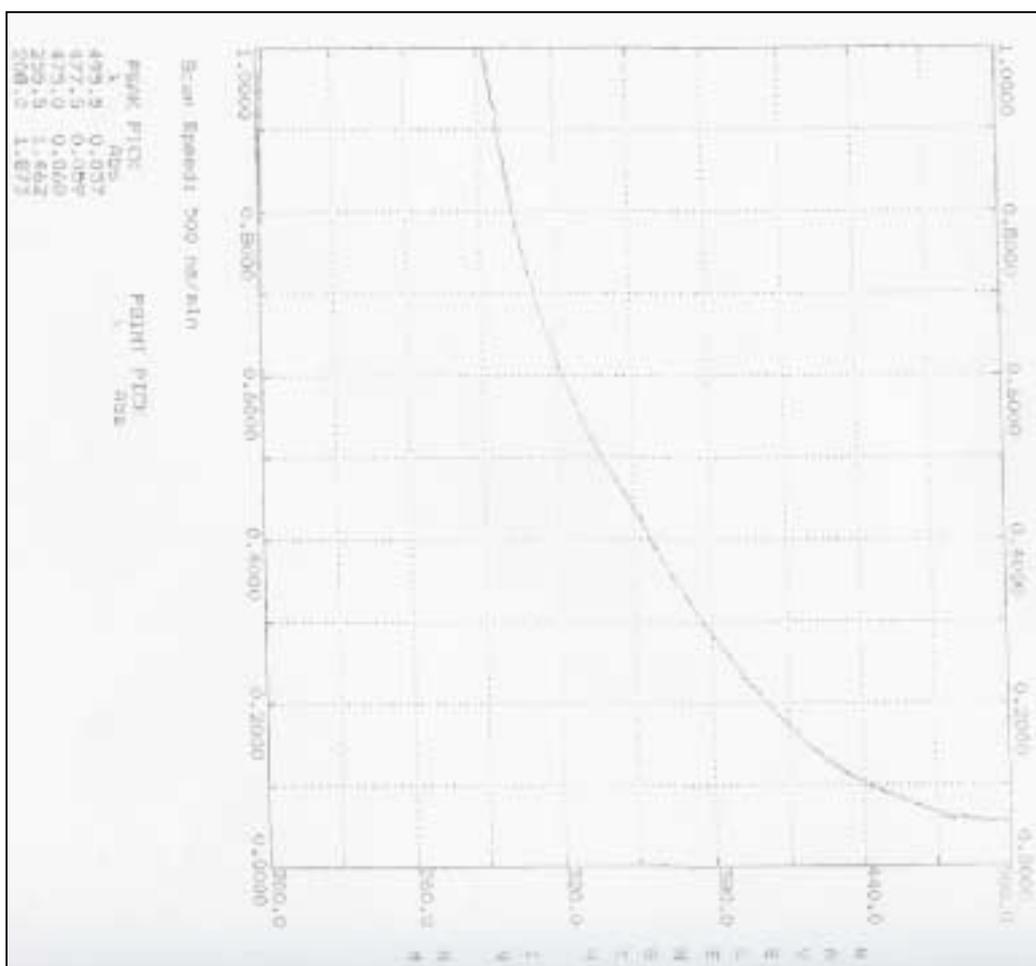
Spectres d'absorption de la quercétine et ses sels isolés



Spectre d'absorption du sel monosodique de la quercétine : maximum à 371 nm et 256 nm

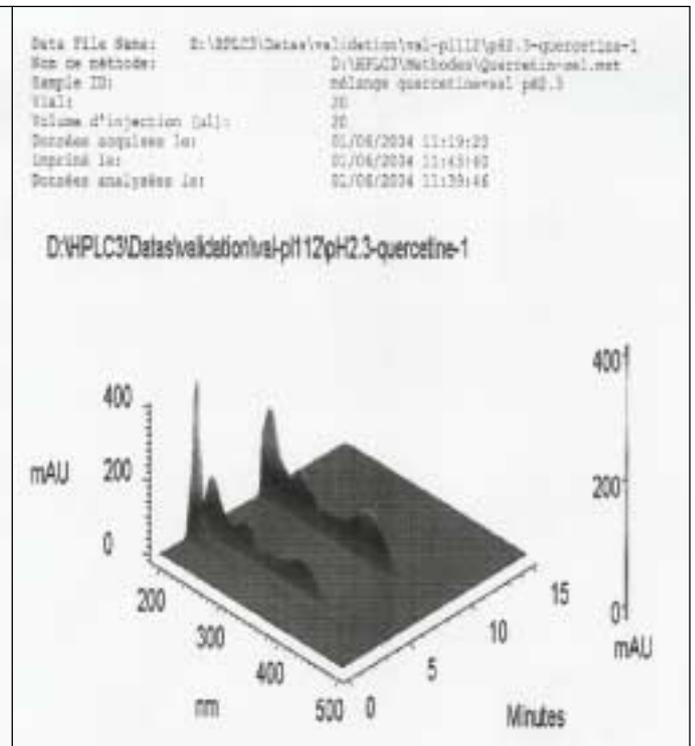
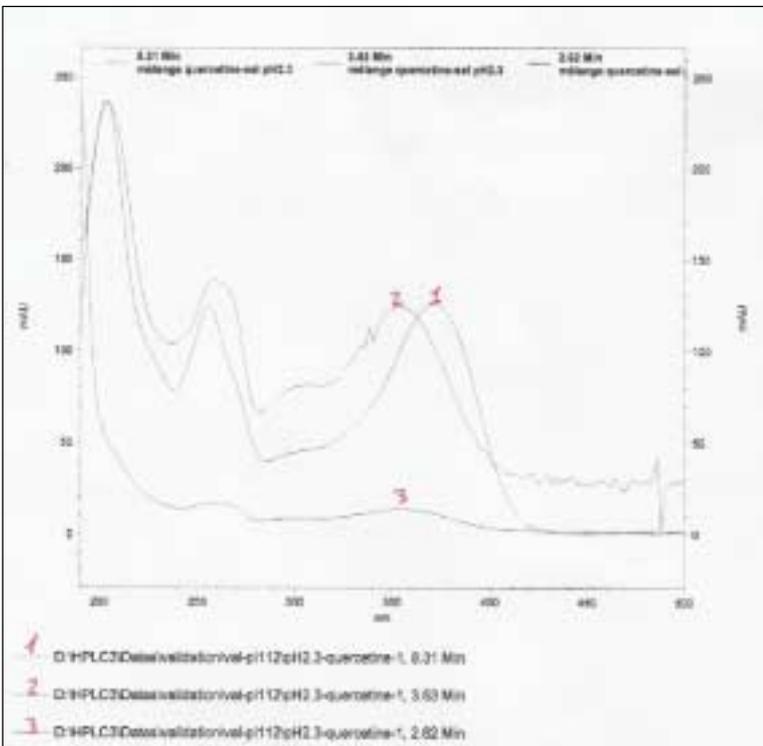
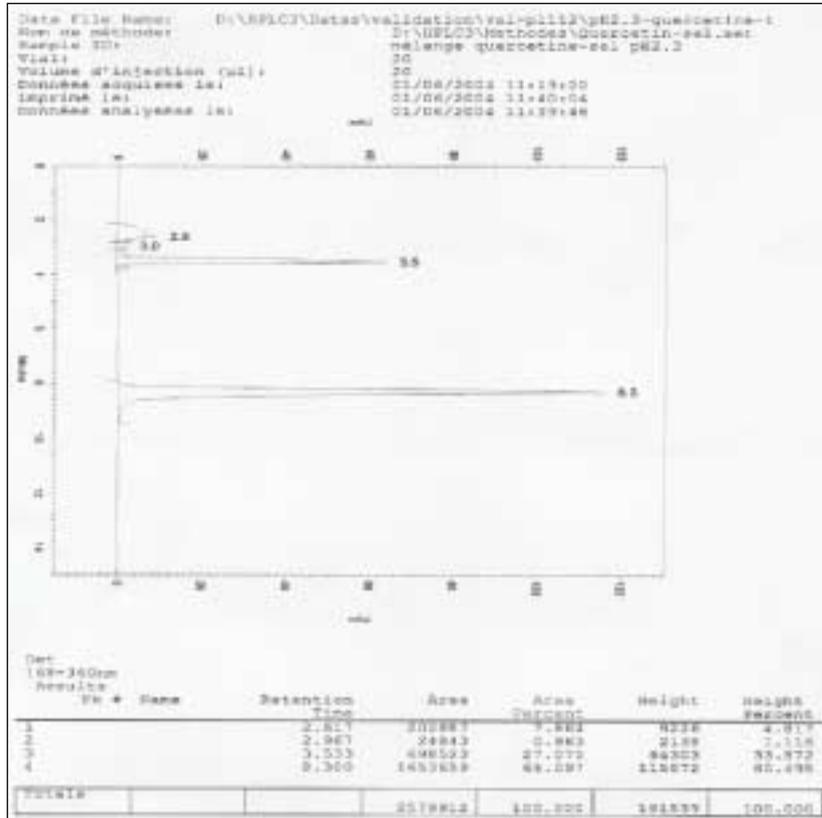


Spectre d'absorption du sel disodique de la quercétine : maximum à 353 nm et 252 nm

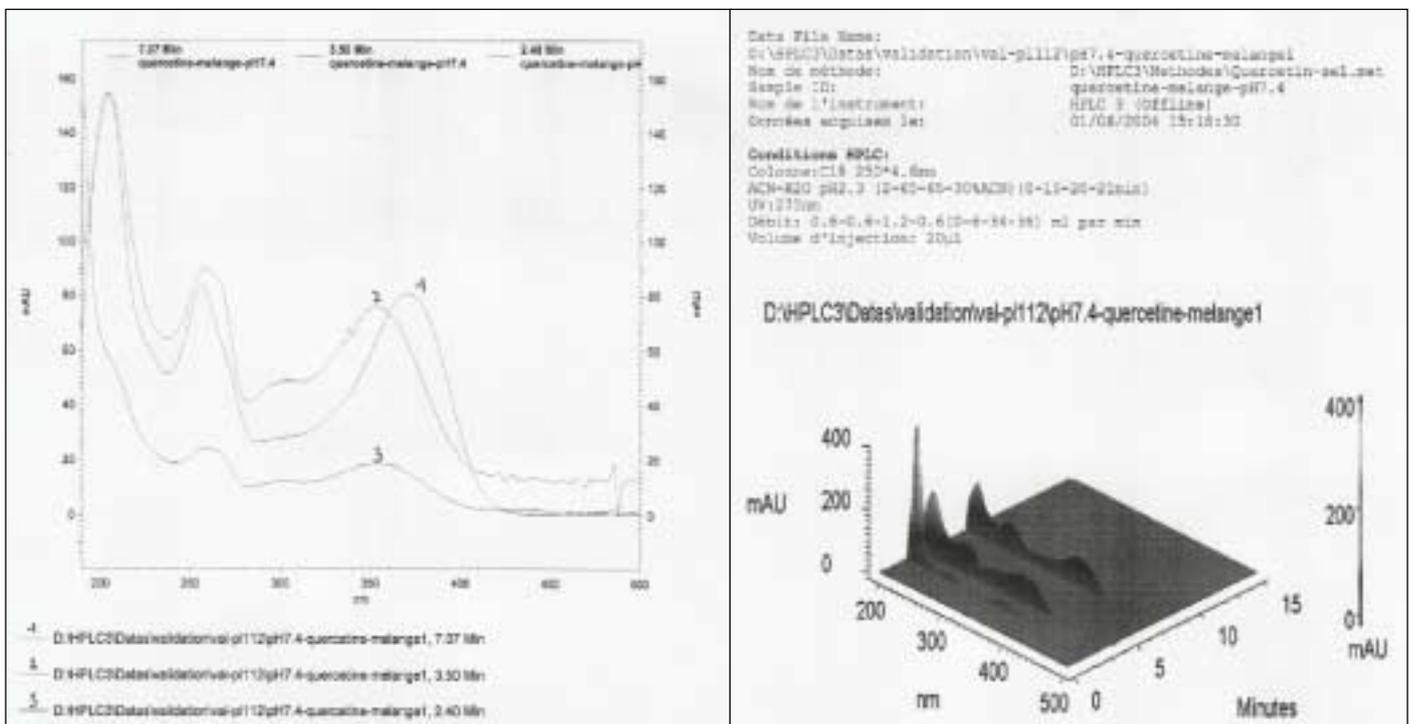
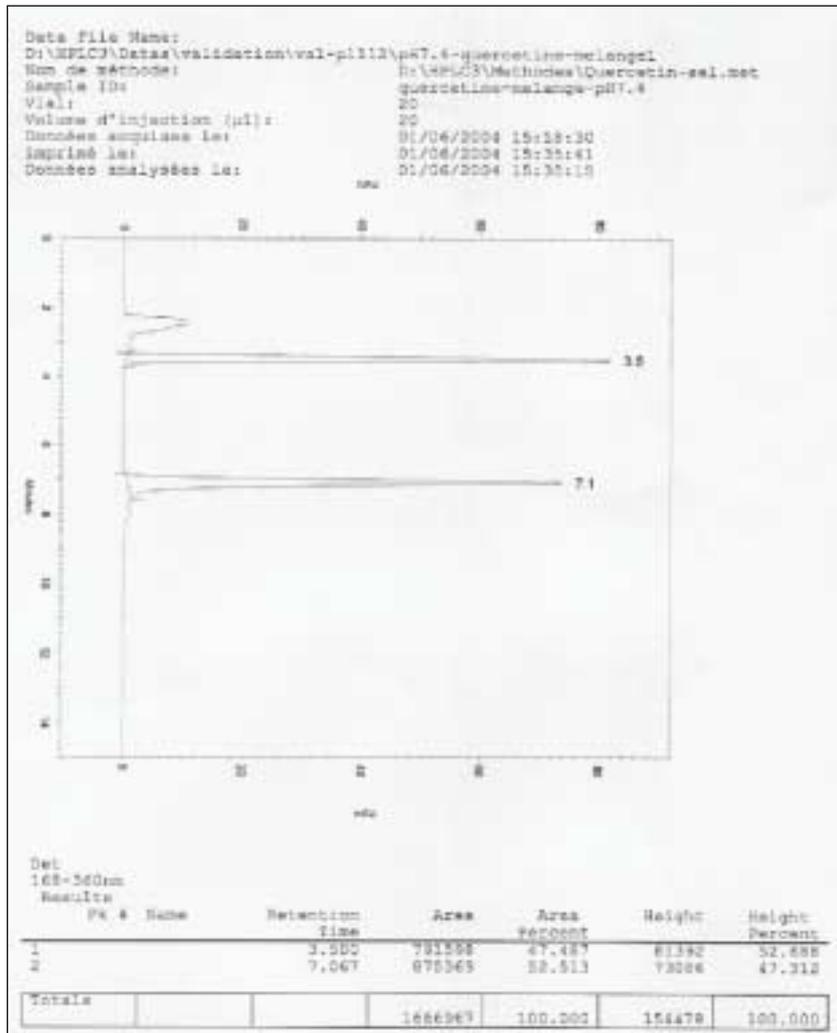


Spectre d'absorption du sel trisodique de la quercétine : épaulement vers 350 nm

Spectres d'absorption de la quercétine et ses formes ionisées

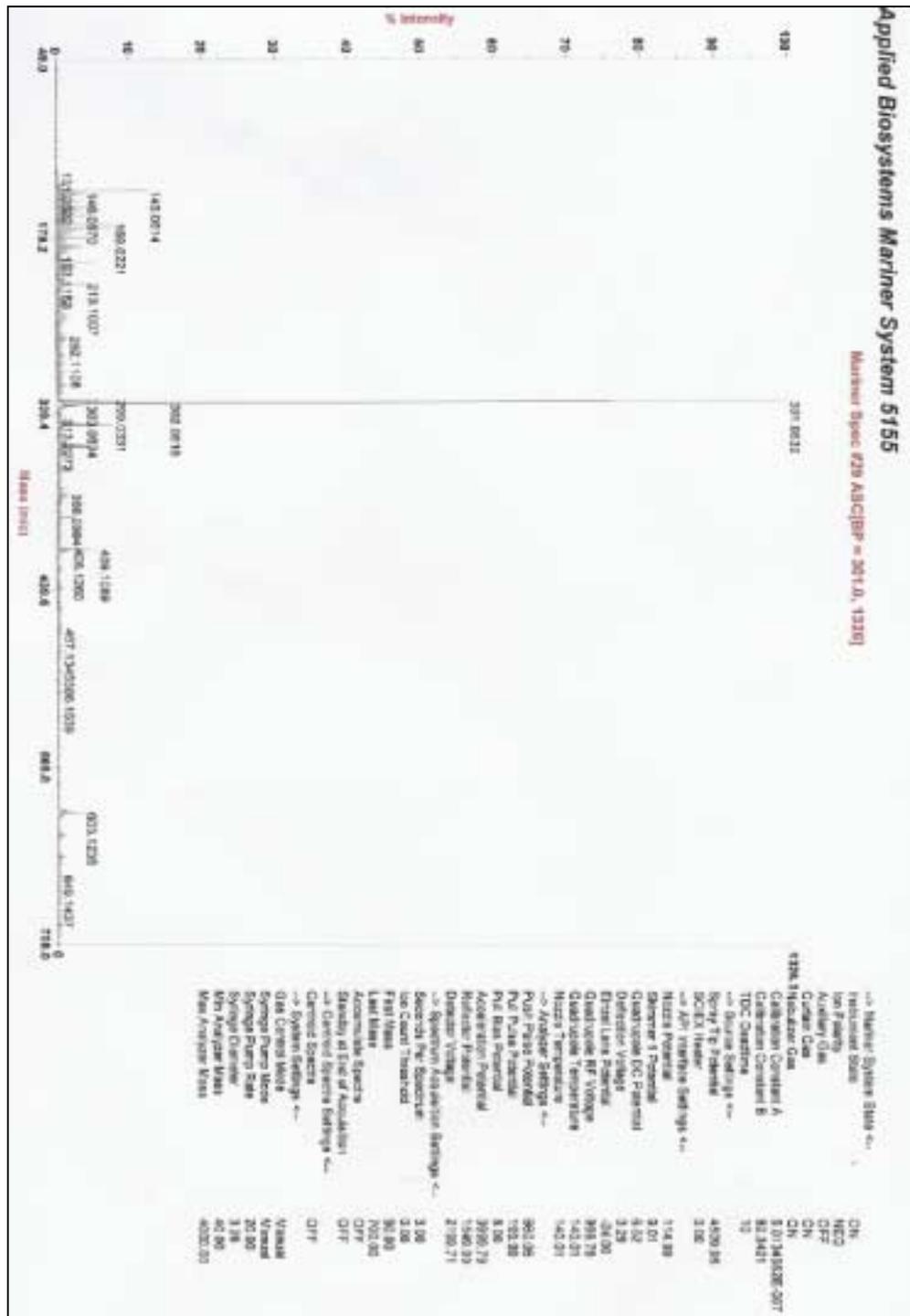


Chromatographie liquide d'une solution aqueuse de quercétine préparée à pH 10 et analysée avec une phase mobile à pH 2,3

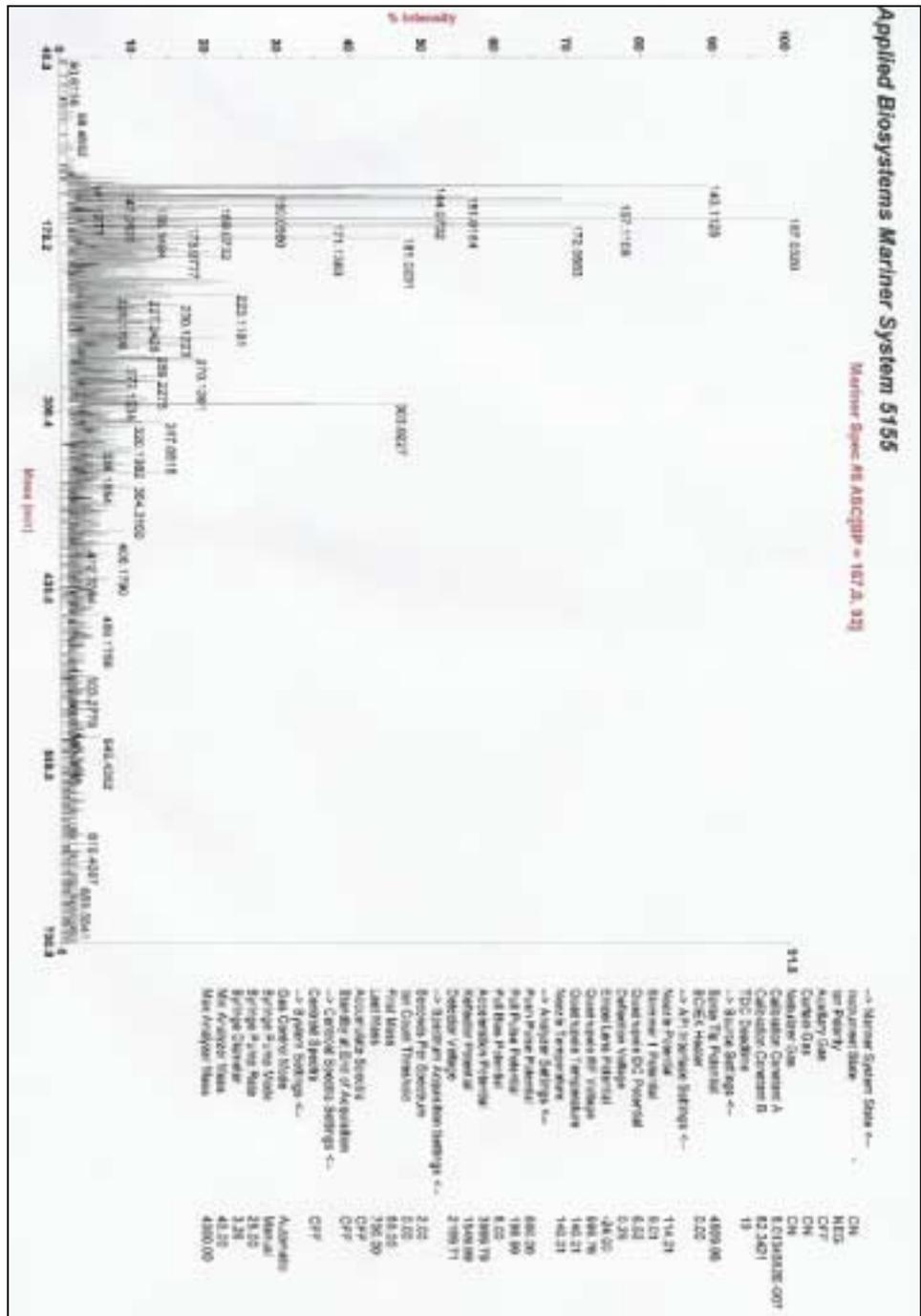


Chromatographie liquide d'une solution aqueuse de quercétine préparée à pH 10 et analysée avec une phase mobile à pH 7,4

Spectres de masse des différents sels isolés

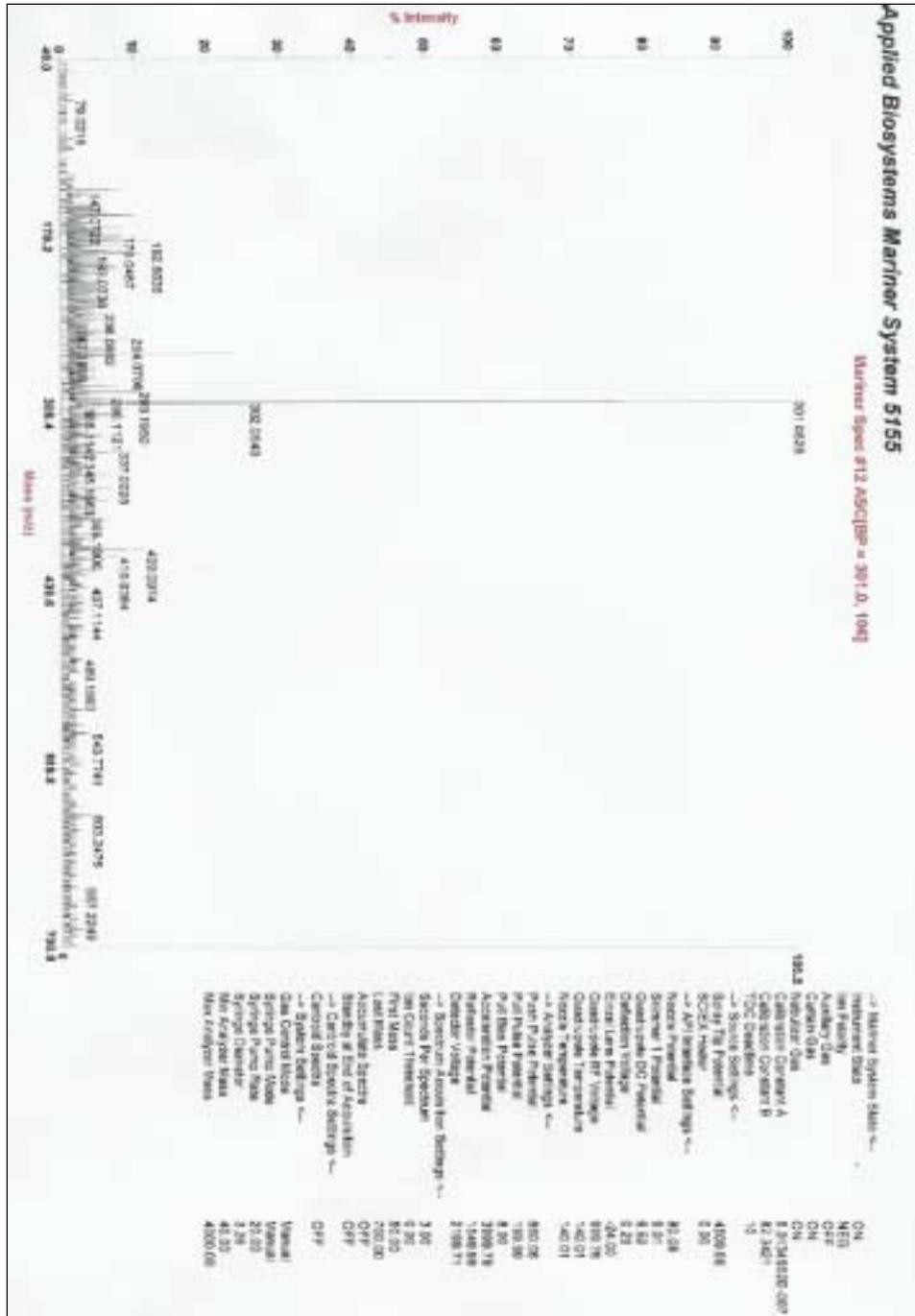


Spectre de masse du sel monosodique de la quercétine : m/z = 301

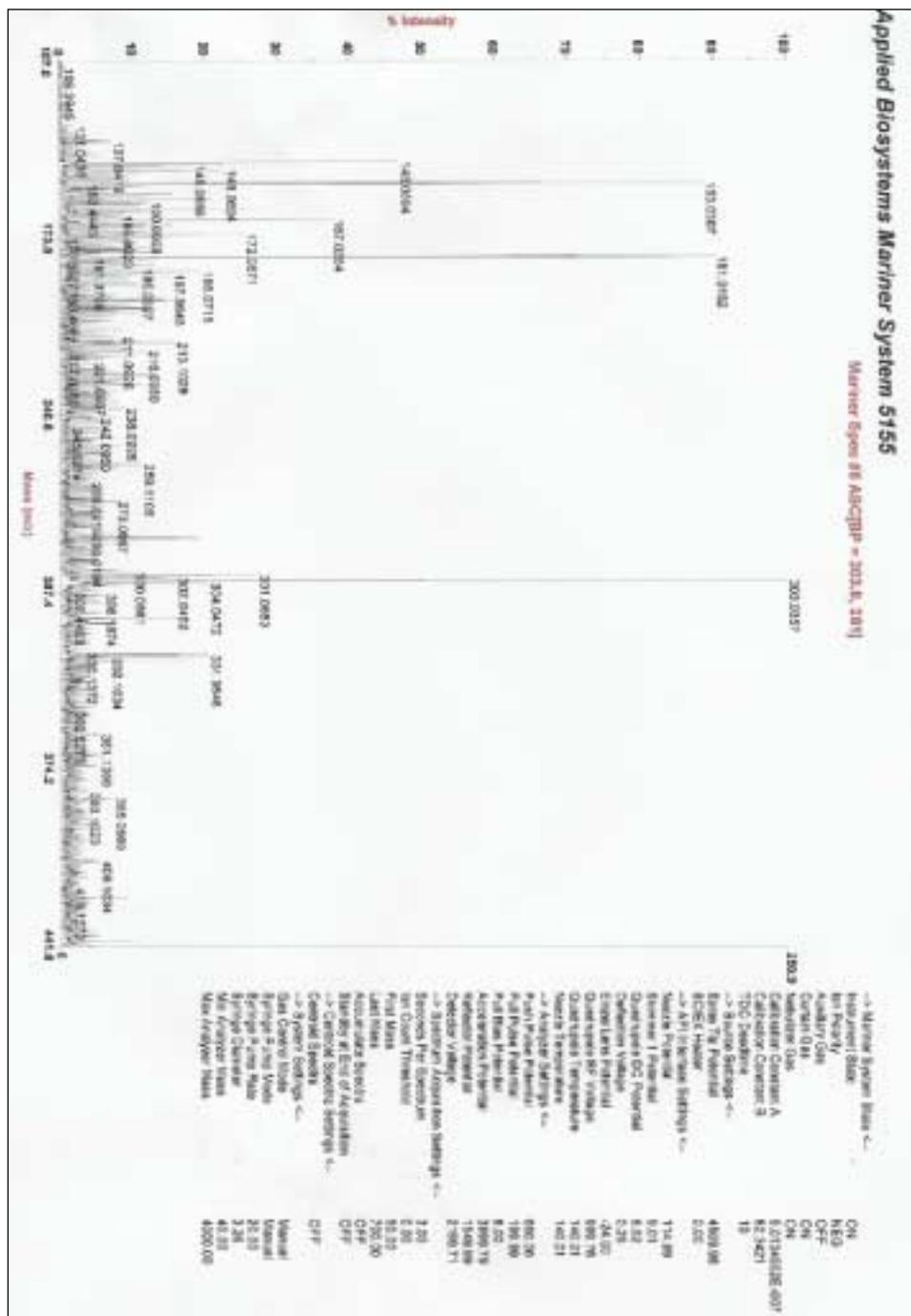


Spectre de masse du sel trisodique de la quercétine : $m/z = 303$, et nombreux fragments vers 150

Spectres de masse des différents sels isolés après acidification



Spectre de masse de la quercétine de référence en milieu acétonitrile/eau (90/10) en présence de 0,1% d'acide chlorhydrique : la quercétine est caractérisée par m/z : 301



Spectre de masse du sel trisodique de quercétine en milieu acétonitrile/eau (90/10) en présence de 0,1% d'acide chlorhydrique ; dans le mélange on constate la présence de quercétine formée, m/z : 301 ainsi que d'autres impuretés non identifiées (m/z : 153, 181, 303, 331) qui existent déjà dans le spectre de masse du sel trisodique de quercétine de départ.