

Année 2009



UNIVERSITÉ CADI AYYAD - FACULTÉ DES SCIENCES  
SEMLALIA – MARRAKECH  
UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE  
ECOLE DOCTORALE 306 – SPSA, MONTPELLIER

N° d'ordre :



## THÈSE EN CO-TUTELLE

Laboratoires d'accueil :

- a) Laboratoire, Sciences des Aliments, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech
- b) UMR A 408 UAPV-INRA, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Avignon

Présentée à la Faculté des Sciences Semlalia pour l'obtention du

### Diplôme de Doctorat

**Spécialité: Sciences des Aliments**

## **Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant**

Par

Ez-zohra NKHILI

DESA : Génie de l'environnement

*Présentée et soutenue publiquement le 23 Mars 2009 devant la commission d'examen :*

Président	M. Ahmed BENHARRAF	PES	Université Cadi Ayyad	Marrakech
Examineurs	M. Paul-Henri DUCROT	DR	Institut National des recherches Agronomiques	Versailles
	M. Jamal BRIGUI	PES	Université Abdel Malek Es-Saadi	Tanger
	M. Es-saddik EL BOUSTANI	PES	Université Cadi Ayyad	Marrakech
	M. Olivier DANGLES	PES	Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Avignon
	Mme Hakima ELHAJJI	PES	Université Cadi Ayyad	Marrakech

## **Remerciements**

*Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés grâce à la collaboration des laboratoires de Chimie des Antioxydants de la faculté des Sciences de l'Université d'Avignon-France, de Chimie Bio-organique et Macromoléculaire de la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech-Université Cadi Ayyad et des Sciences des Aliments de la faculté des Sciences Semlalia-Université Cadi Ayyad-Marrakech.*

*Ce travail a été soutenu par le comité mixte d'Action Intégrée Franco-Marocaine PAI-03/85. Je tiens à les remercier pour leur soutien financier qui m'a beaucoup facilité la réalisation de ce travail.*

*Ces travaux de recherche ont été effectués sous la direction de Madame Hakima El Hajji (Maroc) et Monsieur Olivier Dangles (France). Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour leur encadrement de qualité et pour m'avoir accordé leur confiance. Merci pour avoir toujours été disponibles et pour avoir été à mon écoute, pour m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix. Merci tout particulièrement pour leur soutien scientifique mais aussi humain dans la dernière ligne droite de la rédaction qui a été particulièrement difficile. A mes deux co-directeurs Monsieur Es-saddik El boustani (Maroc) et Madame Valérie Tomao (France), j'adresse mes plus vifs remerciements pour leur aide, leur gentillesse au quotidien, tous leur encouragements et leur soutien dans les moments difficiles, merci pour votre amitié. Je tiens également à exprimer à l'ensemble de mes encadrants, mes sincères remerciements pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent travail.*

*Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche : Monsieur Paul-Henri DUCROT (rapporteur), Monsieur Jamal BRIGUI (rapporteur) et Monsieur Ahmed BENHARRAF (rapporteur).*

*Je remercie vivement le Pr. Farid Chemat de l'Université d'Avignon pour sa participation active à la préparation des extraits de polyphénols du thé vert par micro-ondes, ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité.*

*À tous les membres de l'équipe « Chimie des antioxydants » de l'université d'Avignon, Stéphanie Galland, Njara Rakotomanomana, Natalie Mora-Soumille, Mattieu Virot, Maryline Vian, Emmanuel Petitcolas, je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire. J'adresse également mes remerciements à Michel Carail responsable du centre HPLC-masse de l'INRA d'Avignon pour l'aide apportée à la réalisation des chromatogrammes HPLCmasse.*

*Merci à tous les membres du Département de Chimie de la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, Abdel Kader Bendahou, Adil Sbiai, Bouchra sillahi pour leur encouragement, leur bonne humeur et leur gentillesse.*

*Que vous dire, mes chers parents, vous étiez toujours là pour m'écoutez, me soutenir, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute....Tous les mots ne suffiraient pas...Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour.  
Merci à mes proches notamment mes trois frères, mes deux sœurs, ma belle sœur et mes amis pour votre soutien et votre présence à mes cotés.*

## Table des matières

<b>Introduction-Présentation du sujet.....</b>	<b>1</b>
<b>Première Partie. Etude Bibliographique .....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre 1. Les Polyphénols, Structures, Stabilités et Propriétés.....</b>	<b>5</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>6</b>
<b>1-1 Présentation générale sur les polyphénols .....</b>	<b>7</b>
1-1-1 Classification des polyphénols .....	7
1-1-1-1 Polyphénols monomériques .....	9
1-1-1-2 Polyphénols sous forme de polymères.....	17
<b>1-2 Propriétés chimiques des polyphénols .....</b>	<b>17</b>
1-2-1 Nucléophilie .....	18
1-2-2 Propriétés réductrices .....	18
1-2-3 Polarisabilité.....	19
1-2-4 Liaison hydrogène .....	20
1-2-5 Acidité .....	21
<b>1-3 Stabilité des polyphénols .....</b>	<b>21</b>
1-3-1 Autoxydation.....	21
1-3-2 Mécanismes d'oxydation .....	23
<b>1-4 Rôle des polyphénols dans les plantes .....</b>	<b>30</b>
<b>1-5 Importance nutritionnelle des polyphénols .....</b>	<b>30</b>
1-5-1 Stress oxydant- Espèces oxygénées réactives .....	31
1-5-2 Les polyphénols comme antioxydants .....	33
1-5-2-1 Inhibition enzymatique .....	34
1-5-2-2 Chélation des ions métalliques .....	36
1-5-2-3 Piégeage des radicaux libres .....	37
<b>1-6 Propriétés thérapeutiques des polyphénols .....</b>	<b>46</b>
1-6-1 Etudes épidémiologiques et propriétés biologiques in vitro .....	46
1-6-2 Effet antiallergique .....	47
1-6-3 Effet anti-inflammatoire.....	47
1-6-4 Effet anti-ulcère.....	48
1-6-5 Effet anti-cancer .....	48
1-6-6 Autres activités biologiques .....	49
<b>1-7 Propriétés pro-oxydantes des polyphénols .....</b>	<b>49</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>51</b>
<b>Chapitre 2. Thé vert, consommation, composition et propriétés biologiques .....</b>	<b>54</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>55</b>
<b>2-1 Généralités .....</b>	<b>55</b>
2-1-1 Historique du thé au Maroc .....	55
2-1-2 Description botanique .....	56
2-1-3 Fabrication et consommation du thé .....	56
<b>2-2 Composition chimique du thé vert .....</b>	<b>58</b>
<b>2-3 Biosynthèse des catéchines de thé vert .....</b>	<b>61</b>
<b>2-4 Activité thérapeutique du thé vert.....</b>	<b>64</b>
2-4-1 Mécanisme moléculaire de l'effet bénéfique de thé vert' .....	64

2-4-2 Prévention des maladies cardiovasculaires”	65
2-4-3 Prévention du cancer” ” ”	65
2-4-4 Activité antioxydante”	66
2-4-5 Activité antimicrobienne	66
2-4-6 Activité cognitive	66
2-4-7 Contre les maladies de Parkinson et d’Alzheimer	67
2-4-8 Toxicité	67
<b>2-5 Usage traditionnel et industriel de thé vert</b>	<b>67</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>69</b>

**Deuxième partie. Interactions de Polyphénols de l’alimentation avec les Ions du fer et du cuivre, conséquences sur leur oxydation à l’air et leur pouvoir antioxydant. .... 72**

<b>Chapitre 1. Matériels &amp; Méthodes</b>	<b>73</b>
<b>I- 1 Réactifs</b>	<b>74</b>
<b>I -2 Analyses</b>	<b>75</b>
I-2-1 Complexation , oxydation et activité antioxydante	75
I-2-2 Dosage de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75
I-2-3 Dosage de Fe <sup>II</sup>	76
I-2-4 Dosage de Cu <sup>I</sup>	76
I-2-5 Procédures d’ajustement de courbes (curve fitting)	76
I-2-6 Analyses CLHP-SM	77
I-2-7 Inhibition de la peroxydation de l’acide linoléique par les polyphénols	78
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>79</b>

<b>Chapitre 2. Interactions de Polyphénols avec les ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation</b>	<b>80</b>
<b>Résumé</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre 2-1 Généralités</b>	<b>82</b>
<b>2-1-1 Les métaux de transition</b>	<b>82</b>
<b>2-1-2 Régulation du fer et du cuivre dans les cellules</b>	<b>82</b>
<b>2-1-3 Interaction des polyphénols par des métaux de transition d’importance biologique (Fe, Cu)</b>	<b>83</b>
<b>2-1-4 Données bibliographiques sur la complexation des flavonoïdes avec du fer et du cuivre</b>	<b>85</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>94</b>
<b>Chapitre 2-2 Interactions de la Quercétine avec les Ions du Cuivre et du Fer :Complexation, Oxydation</b>	<b>96</b>
<b>2-2-1 Interaction de la quercétine avec des ions du fer et du cuivre : Complexation</b>	<b>97</b>
2-2-1-1 Complexation Quercétine-Fer à pH 5	97
2-2-1-2 Complexation Quercétine-Fer à pH 7,4	101
2-2-1-3 Complexation quercétine-cuivre à pH 7,4	104
<b>2-2-2 Interaction de la quercétine avec des ions du fer et du cuivre: Oxydation</b>	<b>109</b>
2-2-2-1 Autoxydation de la quercétine en absence de métal	109
2-2-2-2 Autoxydation de la quercétine initiée par les ions du fer à pH 7,4	113

2-2-2-3 Autoxydation de la quercétine initiée par les ions du cuivre à pH 7,4 .....	126
<b>2-2-3 Oxydation de la quercétine par Fe<sup>III</sup> à pH fortement acide .....</b>	<b>136</b>
<b>2-2-4 Conclusion .....</b>	<b>139</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>140</b>
<b>Chapitre 2-3 Interactions de la Rutine avec les Ions du Cuivre et du Fer : Complexation, Oxydation .....</b>	<b>141</b>
<b>2-3-1 Stabilité de la rutine à p H 7.4, 37°C.....</b>	<b>144</b>
<b>2-3-2 Interaction de la rutine avec des ions du fer et du cuivre : Complexation.....</b>	<b>145</b>
2-3-2-1 Complexation rutine-Fer à pH 7,4 .....	145
2-3-2-2 Complexation rutine-cuivre à pH 7,4 .....	153
2-3-2-3 Conclusion .....	158
<b>2-3-3 Interaction de la rutine avec des ions du fer et du cuivre: Oxydation.....</b>	<b>160</b>
2-3-3-1 Autoxydation de la rutine initiée par les ions du fer.....	160
2-3-3-2 Autoxydation de la rutine catalysée par les ions du cuivre.....	165
<b>2-3-4 Conclusion .....</b>	<b>174</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>175</b>
<b>Chapitre 2-4 Interactions de l'Acide Caféique avec des Ions du Cuivre et du Fer : Complexation, Oxydation .....</b>	<b>177</b>
<b>2-4-1 Stabilité de l'acide caféique dans un tampon phosphate à pH 7,4 et 37°C .....</b>	<b>179</b>
<b>2-4-2 Interaction de l'acide caféique avec les ions du fer et du cuivre : Complexation.....</b>	<b>183</b>
2-4-2-1 Complexation des ions du fer par l'acide caféique.....	183
2-4-2-2 Complexation des ions du cuivre par l'acide caféique .....	192
<b>2-4-3 Interaction de l'acide caféique avec des ions du fer et du cuivre: autoxydation .</b>	<b>197</b>
2-4-3-1 Autoxydation de l'acide caféique initiée par les ions du fer.....	197
2-4-3-2 Autoxydation de l'acide caféique catalysée par les ions du cuivre .....	201
<b>2-4-4 Conclusion .....</b>	<b>208</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>209</b>
<b>Chapitre 2-5 Interactions de l'Acide Gallique et la Catéchine avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation .....</b>	<b>210</b>
<b>2-5-1 Stabilité de l'acide gallique et de la catéchine dans le tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C .....</b>	<b>213</b>
<b>2-5-2 Interaction de l'acide gallique avec les ions du fer et du cuivre: complexation et autoxydation .....</b>	<b>218</b>
2-5-2-1 Complexation.....	218
2-5-2-2 Autoxydation de l'acide gallique initiée par les ions du fer et du cuivre .....	228
<b>2-5-3 Interaction de la catéchine avec les ions du fer et du cuivre: complexation et autoxydation .....</b>	<b>239</b>
2-5-3-1 Complexation.....	239
2-5-3-2 Autoxydation de la catéchine initiée par Fe <sup>II</sup> /Fe <sup>III</sup> et Cu <sup>I</sup> /Cu <sup>II</sup> .....	244
<b>2-5-4 Conclusion .....</b>	<b>252</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>253</b>
<b>Chapitre 2-6 Discussion et Conclusion .....</b>	<b>255</b>

<b>Chapitre 3. Interactions des polyphénols avec les ions du Cuivre :Pouvoir antioxydant.....</b>	<b>262</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>263</b>
<b>3-1 Mécanisme d'oxydation et d'inhibition de la peroxydation des lipides .....</b>	<b>265</b>
3-1-1 Mécanisme de peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) .....	265
3-1-2 Mécanisme général d'action des antioxydants phénoliques .....	267

<b>3-2 Etude d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Cu<sup>II</sup></b> .....	<b>269</b>
3-2-1 Inhibition par les flavonoïdes .....	269
3-2-2 Inhibition par les acides phénoliques .....	275
<b>3-3 Conclusion</b> .....	<b>278</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>280</b>

**Troisième partie: Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel .....** **282**

<b>Chapitre 1. Matériels &amp; Méthodes</b> .....	<b>283</b>
<b>1-1 Réactifs et solvants</b> .....	<b>284</b>
<b>1-2 Matériels</b> .....	<b>284</b>
<b>1-3 Méthodes expérimentales</b> .....	<b>285</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>289</b>
<b>Chapitre 2. Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel</b> .....	<b>290</b>
<b>2-1 Généralité sur les Micro-ondes</b> .....	<b>292</b>
2-1-1 Définition .....	292
2-1-2 Equipement d'un four micro-ondes .....	292
2-1-3 Chauffage par four micro-ondes .....	293
2-1-4 Interactions micro-ondes- matière.....	294
2-1-5 Etude bibliographique sur l'extraction assistée par micro-ondes des polyphénols du thé vert .....	295
<b>2-2 Extraction des polyphénols du thé vert assistée par micro-ondes à différentes températures : Analyse et Caractérisation</b> .....	<b>296</b>
2-2-1 Extraction à l'eau par chauffage micro-ondes à différentes températures .....	296
2-2-2 Etude cinétique de l'extraction par UV-Visible .....	297
2-2-3 Dosage des phénols totaux .....	298
<b>2-3 Caractérisation des extraits du thé Caravane préparé par MAE et CAE: analyse quantitative et qualitative par CLHP-UV-MS</b> .....	<b>299</b>
2-3-1 Analyse quantitative et qualitative par CLHP-UV-MS .....	299
<b>2-4 Activité antioxydante par inhibition de la peroxydation lipidique</b> .....	<b>305</b>
<b>2-5 Conclusion</b> .....	<b>307</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>309</b>

<b>Conclusion générale- Perspectives</b> .....	<b>310</b>
<b>listes des tableaux</b> .....	<b>312</b>
<b>listes des figures</b> .....	<b>316</b>
<b>listes des abréviations</b> .....	<b>324</b>
<b>Publications et participations aux congrès</b> .....	<b>326</b>

<b>Publications</b> .....	<b>328</b>
---------------------------	------------

## **Introduction - Présentation du sujet**

---

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les polyphénols (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante. Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et légumes mais également les produits transformés comme le chocolat, le thé et le vin rouge. Le régime méditerranéen, caractérisé par une consommation élevée et variée de légumes et de fruits, est associé à un allongement de l'espérance de vie. De récentes études épidémiologiques suggèrent que la protection qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, serait due aux microconstituants des fruits et légumes dont les polyphénols sont les principaux représentants.

L'interaction des polyphénols avec les ions de métaux de transition tels que le fer et le cuivre, est un phénomène de grand intérêt biologique. Il pourrait jouer un rôle important dans le pouvoir antioxydant des polyphénols. En effet, les ions du fer et du cuivre sont susceptibles d'entrer dans des cycles redox, qui dans des conditions aérobies, produisent des espèces oxygénées réactives ou EOR (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, espèces  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  etc...). Les polyphénols sont susceptibles d'inhiber ce stress oxydant, non seulement en piégeant les EOR par réduction, mais aussi en formant avec les ions du fer et du cuivre des complexes inertes. Ainsi, les polyphénols sont capables de protéger les lipides polyinsaturés contre les phénomènes d'oxydation générateurs de radicaux et aldéhydes lipidiques responsables du développement des maladies évoquées plus haut.

Cependant, la complexation métallique des polyphénols peut limiter l'absorption intestinale du fer (effet antinutritionnel) et ainsi favoriser les désordres liés à une carence en fer. Ce phénomène est assez significatif dans les populations des pays en voie de

développement dont l'alimentation est pauvre en fer. Vraisemblablement, les complexes fer-polyphénols formés au cours de la digestion ne sont pas capables de traverser la barrière des cellules intestinales.

Les ions du fer ou du cuivre sont susceptibles d'initier l'oxydation à l'air des polyphénols. Ce processus, appelé autoxydation, est mal connu et dépend a priori de multiples paramètres : la concentration et la nature des polyphénols et de l'ion métallique, la présence d'agents complexants capables d'entrer en compétition avec les polyphénols, le pH, la température.... Si la réduction des EOR par les polyphénols est effectivement un mécanisme d'action antioxydante, l'autoxydation des polyphénols, potentiellement génératrice EOR, peut être une source de toxicité (effet pro-oxydant). En outre, l'autoxydation peut être une voie majeure de dégradation des polyphénols au sein d'extrait naturels et de préparations alimentaires, particulièrement au cours de traitements thermiques (procédés technologiques, cuisson).

Actuellement, grâce au développement des méthodes d'extraction et des techniques d'analyses physico-chimiques et biologiques, une meilleure connaissance de la composition des plantes d'importance alimentaire et des aliments qui en dérivent, du devenir de leurs principaux micronutriments après ingestion (biodisponibilité) et des effets nutritionnels qui en découlent, est devenue possible. La recherche d'extraits végétaux riches en molécules à fort pouvoir antioxydant et la mesure de l'activité antioxydante dans différents milieux restent des domaines de recherche importants.

La qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé. Les techniques conventionnelles d'extraction des polyphénols impliquent différents solvants et divers procédés : macération, soxhlet, chauffage conventionnel, infusion... Cependant, ces méthodes impliquent une durée d'extraction qui peut être trop longue et au cours de laquelle des problèmes de dégradation de l'extrait peuvent survenir. La diminution du temps d'extraction par augmentation de la température n'est pas satisfaisante car la dégradation des polyphénols par autoxydation et/ou hydrolyse est accélérée par le chauffage.

A l'heure où l'efficacité est devenue une des caractéristiques principales d'une bonne technique d'extraction, l'extraction des polyphénols assistée par micro-ondes constitue une alternative très intéressante qui peut permettre des durées d'extraction courtes tout en maintenant des rendements élevés.

C'est dans ce contexte de l'étude de l'extraction et de la stabilité des polyphénols que notre travail a pris naissance. Le programme de recherche s'articule autour de deux axes principaux:

- le premier axe porte sur l'étude des conséquences des interactions des polyphénols avec les ions du fer et du cuivre sur la stabilité et le pouvoir antioxydant des polyphénols. Des études cinétiques ont été réalisées sur les polyphénols les plus abondants dans l'alimentation et représentatifs des principales classes: l'acide caféique (3,4-dihydroxycinnamique), l'acide gallique (3,4,5-trihydroxybenzoïque), la catéchine (flavanol ou tanin monomérique), la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) et la rutine (un glycoside de la quercétine). Tous présentent un noyau catéchol (1,2-dihydroxybenzène), principal déterminant structural de l'activité antioxydante et complexante.
- Le second axe est focalisé sur l'extraction des polyphénols assistée par micro-ondes par comparaison avec un chauffage conventionnel. Le thé vert est la boisson la plus populaire dans l'alimentation marocaine. Il est riche en polyphénols, particulièrement en flavanols à fort pouvoir antioxydant. C'est donc des extraits de thé vert qui seront élaborés dans ce travail.

La première partie de ce mémoire est une synthèse bibliographique sur la structure, la stabilité et les propriétés chimiques et biologiques des polyphénols en général (premier chapitre) et des polyphénols du thé vert en particulier (deuxième chapitre).

La seconde partie étudie les conséquences des interactions des polyphénols sélectionnés avec les ions du fer et du cuivre sur la stabilité (second chapitre après le chapitre sur les matériels et méthodes utilisés) et le pouvoir antioxydant (troisième chapitre) de ces composés.

Enfin, l'extraction des polyphénols du thé vert sous irradiation par les micro-ondes (en comparaison avec un chauffage conventionnel) fait l'objet de la troisième partie.

**PREMIERE PARTIE**  
**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

*CHAPITRE 1*

*Les Polyphénols, Structures, Stabilités et  
Propriétés*

---

## Chapitre 1. Les Polyphénols, Structures, Stabilités et Propriétés

**Résumé** – Les **polyphénols** sont considérés comme des composés quasi-universels des végétaux. Structurellement, ils se répartissent en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique (ex.: acide gallique) à des composés polymériques complexes comme les tanins.

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit.

*In vitro*, les polyphénols présentent des activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) et superoxyde ( $\text{O}_2^\bullet$ ) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons les différentes classes de polyphénols ainsi que leurs propriétés chimiques et les réactions qui peuvent influencer sur leur stabilité. Ceci sera suivi, dans une deuxième partie, par un rappel bibliographique de leur activité antioxydante (piégeurs des radicaux libres) mais aussi de leur activité pro-oxydante éventuelle.

## 1-1 Présentation générale sur les polyphénols

Les **polyphénols** constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production.<sup>1, 2</sup>

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.<sup>3</sup> Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique.

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière.

### 1-1-1 Classification des polyphénols

Une classification de ces substances a été proposée par HARBORNE en 1980 (**Tableau 1**).<sup>4</sup> On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Deux principales classes sont largement répandues :

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines

Plus rares, les coumarines, les stilbènes ne seront pas décrit en détail ici.

---

<sup>1</sup> Fleuriet A, 1982. *Thèse Doc. Etat*, Montpellier.

<sup>2</sup> Yusuf Y., 2006. *Trends Food Sci. Tech*, 17, 64-71.

<sup>3</sup> Bloor S. J., 2001. *Method. Enzymol*, 335, 3-14.

<sup>4</sup> Harborne J.B., 1980. *Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, 8, 329-402.

**Tableau 1.** Principales classes de composés phénoliques.<sup>5</sup>

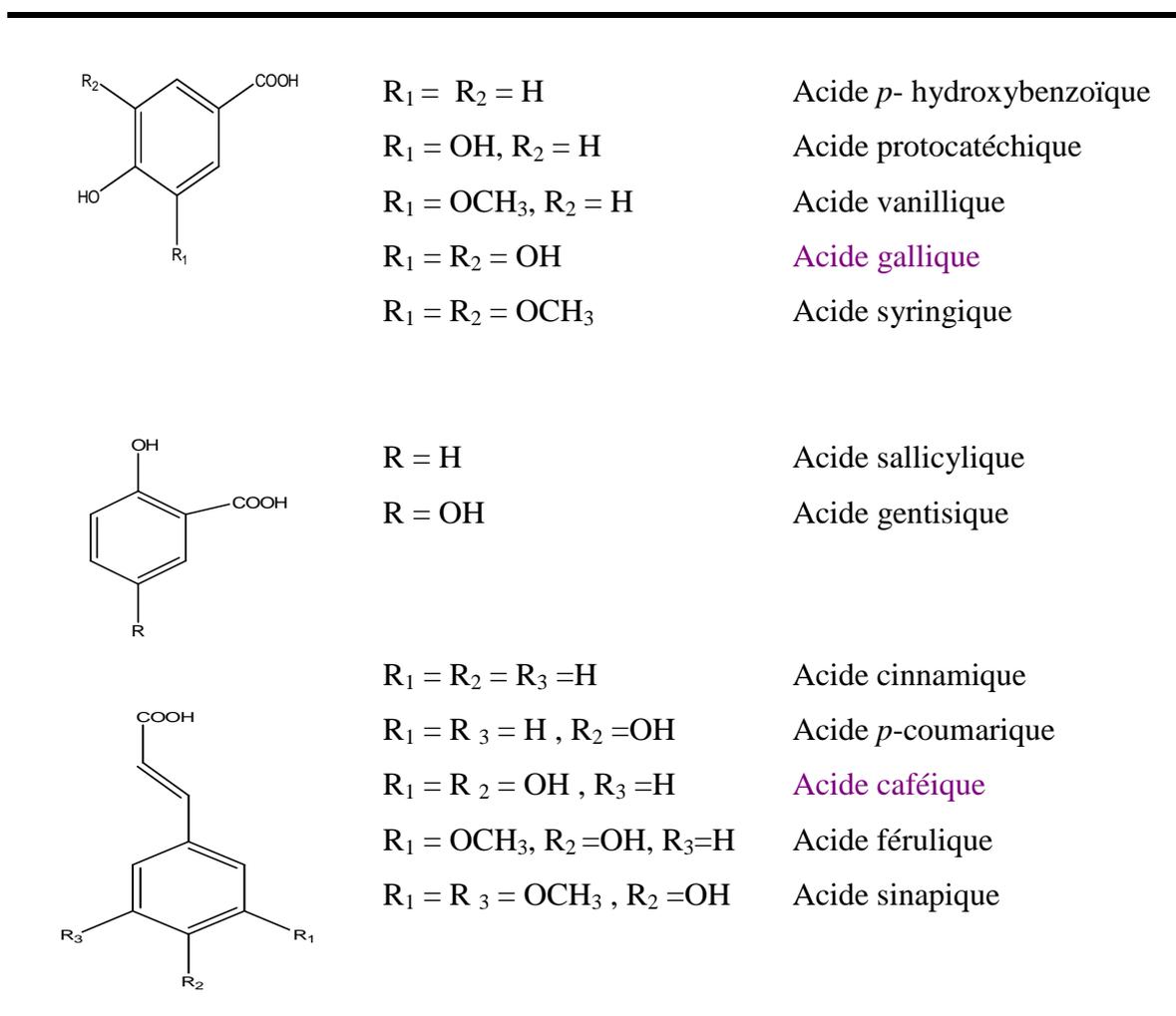
Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Coumarines	Myristicin, eugénol	
	Isocoumarines	Scopolétine	
	Chromones	Myristicine, eugénol	
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones polyphénols	Eugenine	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Juglone, plumbagine	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Mangiferine	
	Anthraquinones	Resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Anthraquinones	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Quercétine, cyanidine, daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
	Neolignanes	Pinorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides	Eusiderine	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines	Amentoflavone	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins condensés		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki

<sup>5</sup> Macheix *et coll.*, 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier* 1-28

**1-1-1-1 Polyphénols monomériques****a- Acides phénoliques**

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués (**Figure 1**) :

- Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique,
- Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique.



**Figure 1.** Exemples d'acide phénoliques

Les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous deux formes diastéréoisomères (présence de la double liaison de la chaîne latérale): cis (Z) et trans (E). Les formes trans sont les plus abondantes, car thermodynamiquement plus stables.

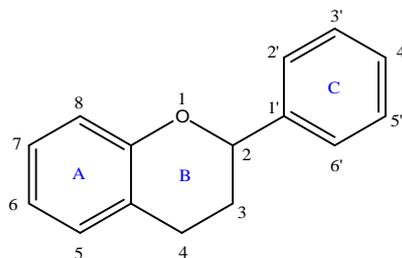
Les acides hydroxycinnamiques sont naturellement présents associés avec diverses molécules provenant de voies métaboliques différentes. On les trouve sous forme :

- d'esters avec des acides-alcools, dont le plus commun est l'acide quinique. L'acide 5-caféoylquinique est l'acide chlorogénique, composé très répandu dans le règne végétal et l'alimentation;
- d'esters glycosidiques (sucres liés à la fonction acide);
- d'hétérosides (sucres liés à la fonction phénolique).

### b- Les flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

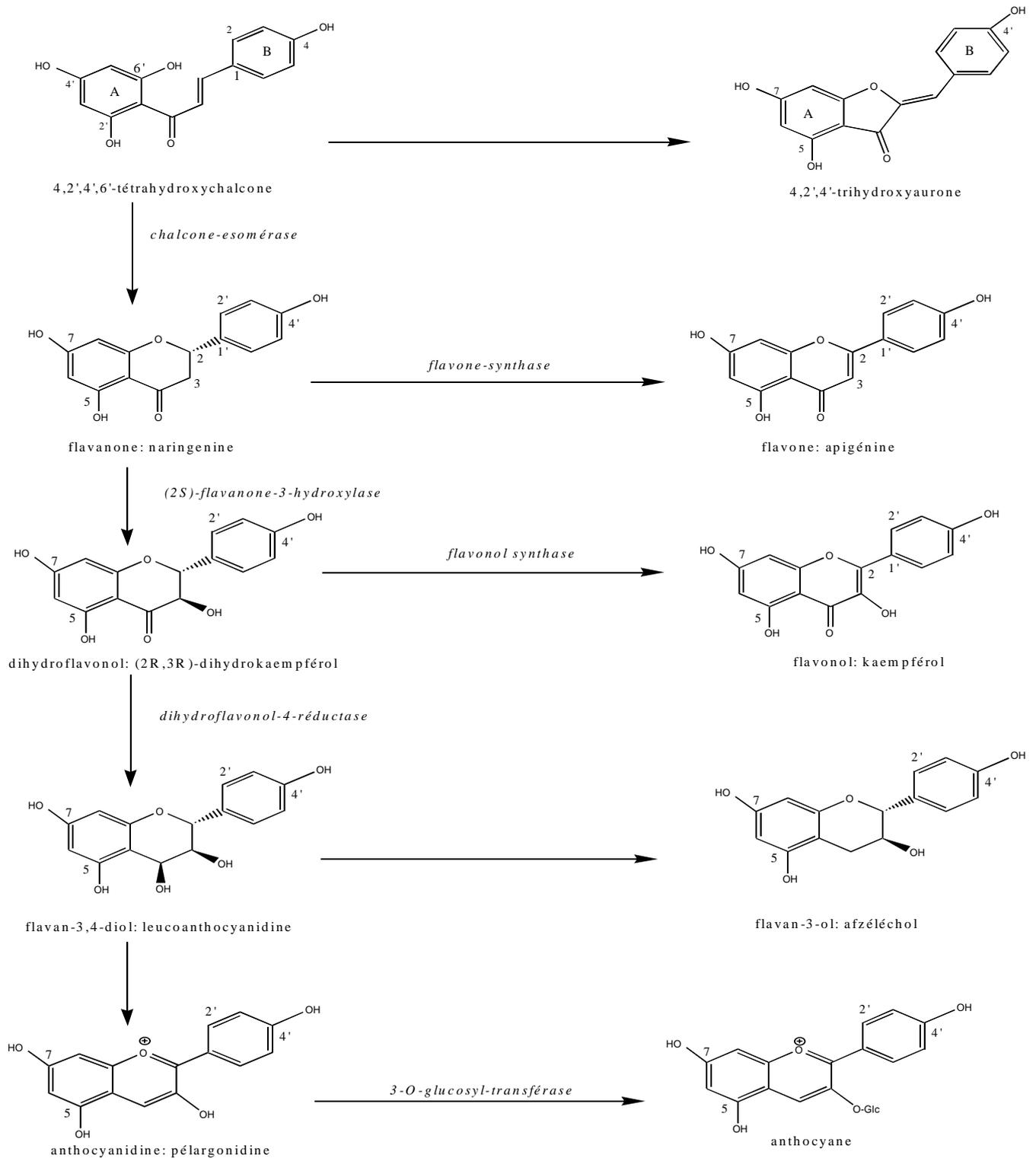
Plusieurs milliers des molécules ont été identifiées à ce jour. Ainsi nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones « **2-phényl-1-benzopyrane** », constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C<sub>6</sub> (A et B), reliés par un cycle pyranique central (**Figure 2**).



**Figure 2.** Structure de base des flavonoïdes

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (**Figure 3**).



**Figure 3.** Biosynthèse des flavonoïdes <sup>6</sup>

<sup>6</sup> Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème éd.). Editions Tec & Doc Lavoisier, 1120p.

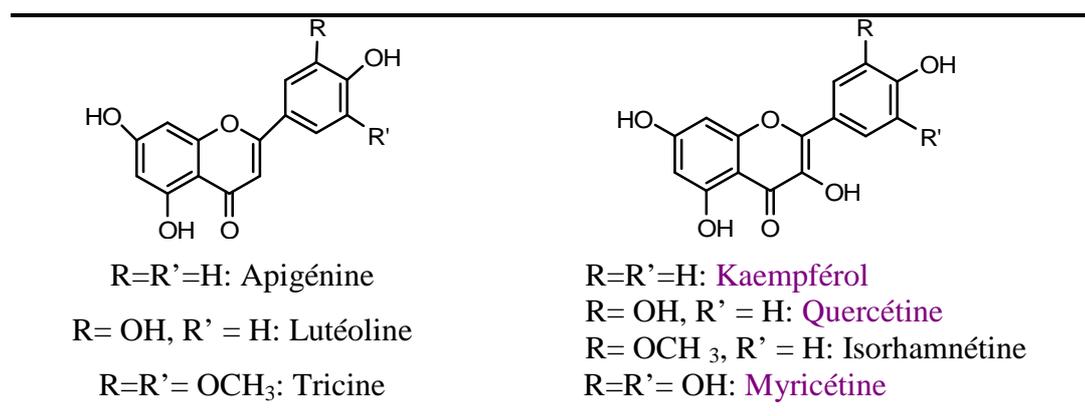
### Flavones et flavonols

Comme nous l'avons signalé plus haut, tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4, 2',4',6'-tétrahydrochalcone et par conséquent, possèdent généralement trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (**Figure 4**).

Dans plus de 90% des cas, le **noyau A** des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables : les groupements hydroxyles peuvent être libres ou méthylés, ou impliqués dans une liaison glycosidique.

Le **noyau B** est monosubstitué dans 80% des cas en position 4', ou disubstitué en positions 3' et 4', ou trisubstitué (moins fréquemment) en positions 3', 4' et 5'. Ces substituants peuvent être des groupes OH ou OMe. Les positions 2' et 6' ne sont qu'exceptionnellement substituées.

Le **noyau C** peut être substitué par un groupement OH, OMe ou O-Gly.

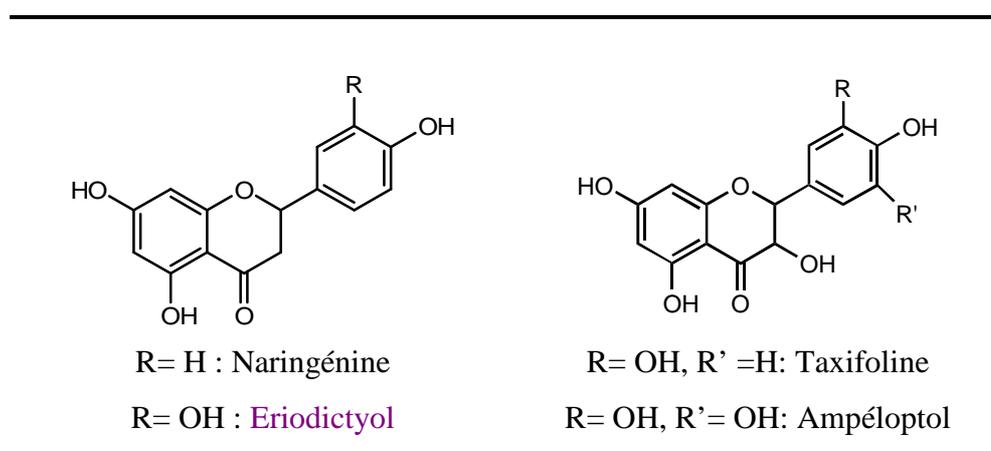


**Figure 4.** Structures chimiques des flavones et des flavonols

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C-3 (**Figure 4**). Ces composés constituent le groupe le plus hydroxylé de la famille des flavonoïdes. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses : D-glucose, D-galactose, L-rhamnose et L-arabinose.

### Flavanones et flavanonols

Les flavanones et les flavanonols (dihydroflavonols) sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence d'un carbone asymétrique en C2, voire en C3. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et flavonols. Les flavanonols (encore appelés dihydroflavonols) se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé regroupant les flavones et flavonols. Sur la **figure 5** sont représentés des exemples de molécules appartenant à ce groupe de flavonoïdes.



**Figure 5.** Structures chimiques des flavanones et flavanonols

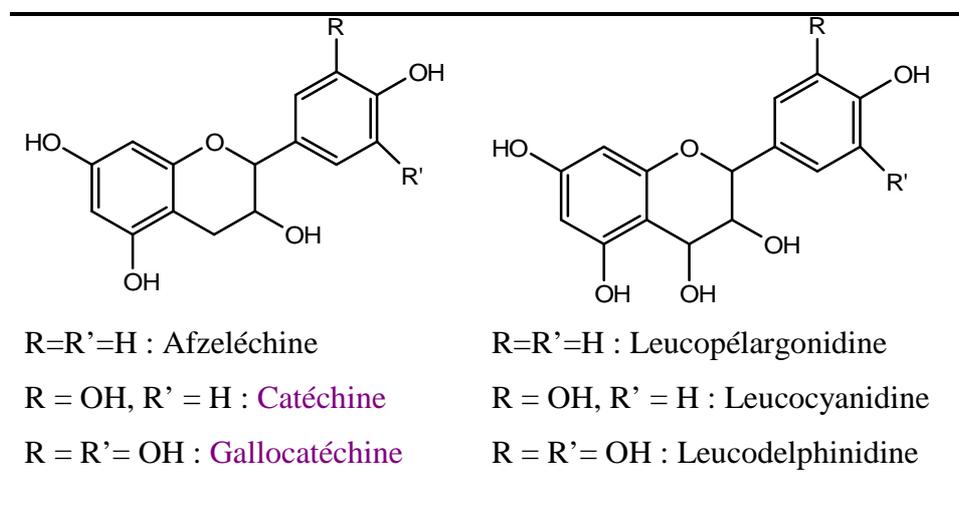
### Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols

À la différence des flavanones et des flavanonols, ces deux groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4 (**Figure 6**).

Les flavan-3-ols (appelés aussi les catéchines) possèdent deux atomes asymétriques en C2 et C3. Chaque composé peut alors exister sous forme de quatre stéréoisomères optiquement actifs : (+)-catéchine, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine, (-)-épicatéchine. Le premier et le quatrième sont les formes les plus répandues.

Les flavan-3,4-diols se distinguent des catéchines par la présence du OH en position 4 (**Figure 6**). Ils possèdent trois atomes de carbones asymétriques, et peuvent, théoriquement, exister sous forme de huit stéréoisomères optiquement actifs, mais ces entités n'ont pu être

isolées à l'état individuel stable. Ces composés réactifs sont les précurseurs des procyanidines oligomériques.<sup>7</sup>

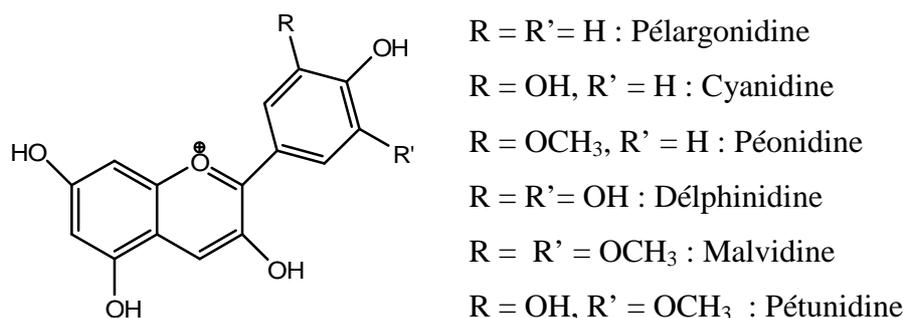


**Figure 6.** Structures chimiques des flavan-3-ols et flavan-3,4-diols

### Anthocyanes

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, virant au bleu en milieu alcalin ; ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits.

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués d'où l'absorption de lumière visible.<sup>8</sup>



**Figure 7.** Structures chimiques des anthocyanes

<sup>7</sup> Radi M., 2004. Thèse. Doc. Marrakech

<sup>8</sup> Brouillard R., 1986. *Bull. Liaison groupe Polyphénols*, 13, 76-94

Dans la nature, ces pigments n'existent pas sous forme aglycone, mais sous forme d'hétérosides. Les sucres sont liés au chromophore en position 3, mais aussi en position 5 et plus rarement en position 7.<sup>8</sup>

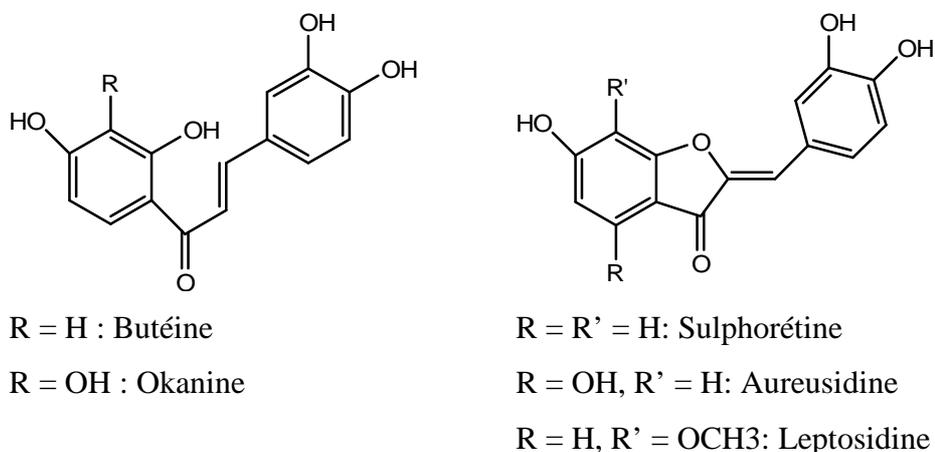
### Chalcones et aurones

Les chalcones sont différentes des autres types des flavonoïdes cités ci-dessus. De par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique,  $\alpha,\beta$ -insaturée (**Figure 8**). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont identiques à celles des autres flavonoïdes.

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

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (**Figure 3**).

Ces composés sont extrêmement fréquents dans les fleurs sous forme de pigments contribuant à la couleur jaune.



**Figure 8.** Structures chimiques des chalcones et aurones

### **1-1-1-2 Polyphénols sous forme de polymères**

#### **a- Tanins<sup>9</sup>**

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leurs structures chimiques sont en effet variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes.

De ce fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire. Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés.

- Tanins hydrolysables : ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

- Tanins condensés : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides.

#### **b- Lignines**

Ces composés de haut poids moléculaires contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques.

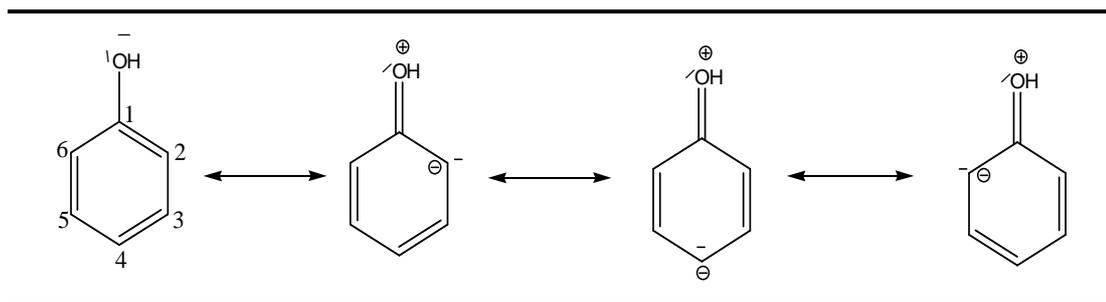
### **1-2 Propriétés chimiques des polyphénols**

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques<sup>10</sup>, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (- M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome O avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6. L'effet (+M) peut être représenté par quatre formes mésomères.

---

<sup>9</sup> Edwin Haslam, 1996. *J. Nat. Prod.*, 59, 205-215

<sup>10</sup> Dangles O, 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, 29-50



**Figure 9.** Formes mésomères du phénol

De ces caractères de base découlent les différentes propriétés physico-chimiques suivantes :

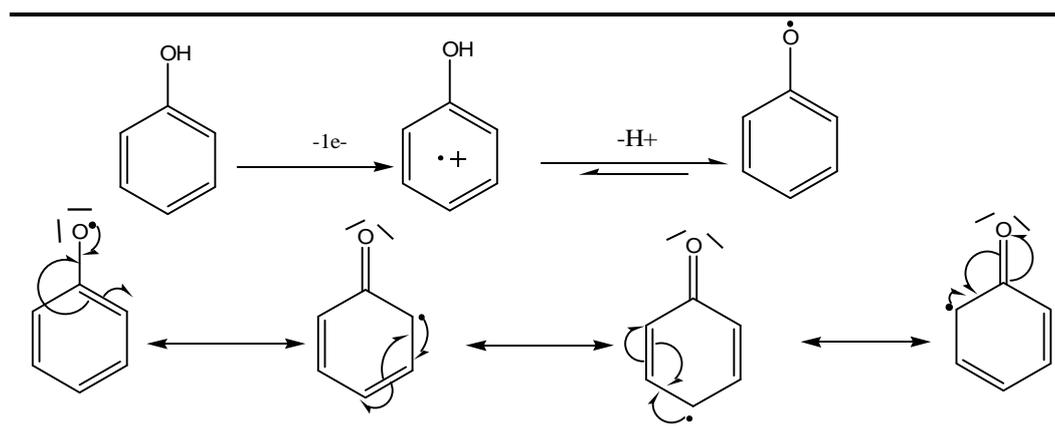
### 1-2 -1 Nucléophilie

La nucléophilie des composés phénoliques est portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para du groupement OH (suite à l'effet (+M)). Cette propriété est à l'origine des réactions de substituants électrophiles aromatique (alkylation, acylation, etc.) régiosélectives des positions ortho et para. Les substituants de type 1,3-dihydroxy (résorcinol) et 1,3,5-trihydroxy (phloroglucinol) permettent une accumulation de densité électronique sur les sommets C2, C4 et C6 (tous *ortho* ou *para* des groupements OH), accentuant ainsi le caractère nucléophile.

Le cycle A des flavanols possède deux centres C6 et C8 fortement nucléophiles car en *ortho* et en *para* de trois groupements OH ou OR à effet (+M). Le noyau A est également activé par le groupement carboné saturé en C4. Cette nucléophilie permet des réactions de substitutions électrophiles aromatiques qui peuvent par exemple intervenir lors de la production du thé noir.

### 1-2 -2 Propriétés réductrices

Le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule est l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. Dans le cas d'un phénol ArOH, le radical-cation formé est un acide fort qui se déprotonne aussitôt pour conduire à un radical phénoxy ou aryloxy ArO $\cdot$ .<sup>10</sup>



**Figure 10.** Oxydation mono-électronique d'un phénol et formes mésomères du radical aryloxy formé.

Le radical aryloxy ( $\text{ArO}^\bullet$ ) peut être formé directement par transfert d'hydrogène phénolique vers un radical de haute énergie tels que les radicaux oxyl ( $\text{RO}^\bullet$ ) et peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) formés par exemple au cours de l'autoxydation des lipides.

Ces réactions de transfert d'atome H et/ou d'électrons avec conversion d'un radical très réactif en radical aryloxy stabilisé par résonance sont l'un des principaux mécanismes d'action antioxydantes des phénols. La capacité du phénol à céder un atome H peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (*bond dissociation energy*, *BDE*). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus fort est son caractère donneur d'hydrogène.

### 1-2 -3 Polarisabilité

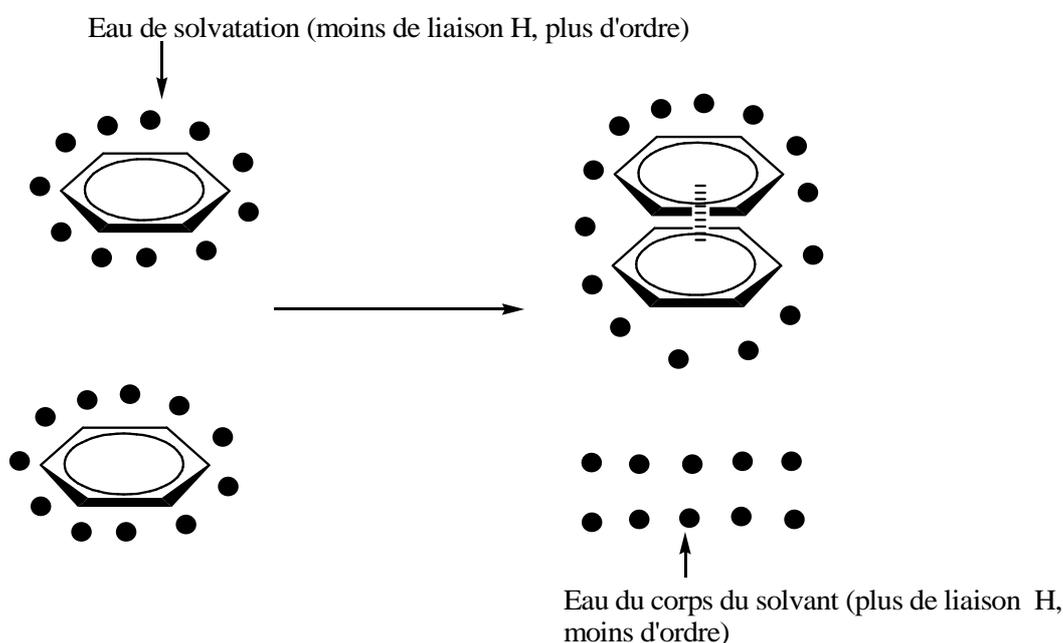
La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Vander Waals) avec autres composés polarisables. Ce phénomène résulte du couplage entre les fluctuations électroniques de deux molécules voisines. Ainsi, en solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable telle qu'un second cycle aromatique est favorisée par l'effet hydrophobe (**Figure 11**).

Les molécules d'eau de solvation s'organisent de manière à maintenir entre elles autant de liaison hydrogène que possible, et de ce fait, l'empilement de deux noyaux benzéniques dans l'eau a deux conséquences avantageuses :

- Le développement de forte interaction de dispersion entre les deux noyaux ;
- Le relargage d'une partie des molécules d'eau de solvation dans le corps du solvant.

Ce dernier phénomène, appelé « Effet hydrophobe » puisqu'il minimise la surface de contact entre les deux solutés et l'eau, se traduit par une augmentation du nombre de liaison hydrogène entre noyau et molécule d'eau ( $\Delta H < 0$ ) et une relative désorganisation ( $\Delta S > 0$ ) qui tendent à stabiliser le complexe moléculaire formé entre deux molécules empilées.

La combinaison des interactions de dispersion et de l'effet hydrophobe constitue la principale force motrice pour la complexation moléculaire des phénols dans l'eau.



**Figure 11.** Effet hydrophobe

#### 1-2 -4 Liaison hydrogène

Les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. En fait, seule la paire libre de l'atome O qui n'est pas conjuguée avec le cycle est capable d'accepter une liaison H en provenance d'un donneur. Ainsi, un phénol est capable de donner une liaison H et d'en recevoir une seulement. Notons que ces liaisons H se renforcent mutuellement (coopérativité). Par exemple, en donnant une liaison H, le phénol allonge sa liaison OH. Cet état de prédissociation accentue la densité électronique sur le centre O et donc son caractère accepteur de liaison H.

## 1-2 -5 Acidité

La coupure hétérolytique de la liaison OH (déprotonation) entraîne la formation d'un ion phénate dans lequel la délocalisation électronique de l'atome O vers le cycle (effet +M) est fortement augmentée (**Figure 9**). Ce phénomène et la forte solvatation de l'anion phénate par formation de liaison H avec l'eau permettent d'expliquer les propriétés acides faibles des phénols dans l'eau. Les propriétés caractéristiques des phénols (nucléophilie, caractère réducteur, polarisabilité) sont amplifiées lors de la formation des anions phénates correspondants.

Les groupements OH en position para et ortho des noyaux phénoliques de polyphénols présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au moins partielle à pH neutre. Cette exaltation de l'acidité est due à la stabilisation de l'ion phénate correspondant par délocalisation de la densité électronique vers le groupement à effet (-M). Elle peut être traduite en termes de formes mésomères.

## 1-3 Stabilité des polyphénols

L'oxydation des polyphénols est susceptible d'intervenir :

- Par voie enzymatique (catalysée par la polyphénoloxydase dans des conditions d'aérobies ou par les peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène) au cours des procédés technologiques d'élaboration des aliments ou après ingestion (catabolisme oxydant).
- Par voie non enzymatique : autoxydation lors des traitements thermiques, oxydation conjointe à l'action antioxydante. Dans ce dernier cas, il s'agit typiquement de processus d'oxydation couplés à la peroxydation des lipides polyinsaturés et qui peuvent intervenir dans l'aliment ou chez l'homme après ingestion.

### 1-3-1 Autoxydation<sup>10</sup>

Si la capture des espèces oxygénées réactives (EOR) est effectivement un mécanisme d'action antioxydante, la réaction éventuelle des phénols avec le dioxygène de l'air (autoxydation) est une cause potentielle d'instabilité et de toxicité par production des EOR. Heureusement, ce phénomène est défavorable :

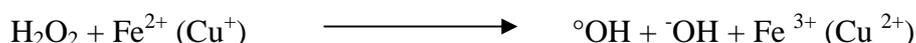
- d'un point de vue thermodynamique, car la réduction mono-électronique du dioxygène requiert des réducteurs forts :  $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\circ-}$ ,  $E^0 = - 0,16 \text{ V}$  pour  $c(O_2) = 1\text{M}$   
Seuls les polyphénols les plus réducteurs et en milieu fortement basique où ils sont sous forme de polyanions seraient susceptibles de transférer directement un électron vers  $O_2$ .

- D'un point de vue cinétique, car le dioxygène présente deux électrons célibataires (OM  $\pi^*$ ) dans l'état fondamental qui lui confèrent un spin total de 1 (biradical). La loi de conservation du spin total au cours d'une réaction chimique autorise la combinaison des radicaux organiques avec  $O_2$  mais interdit l'oxygénation directe des molécules organiques dont les électrons sont appariés. Cependant les ions de métaux de transition, particulièrement Fe(III), contaminant par exemple les sels utilisés dans la préparation de solutions tampons, et dont la concentration peut aisément atteindre  $1\mu\text{M}$ , peuvent catalyser efficacement l'autoxydation avec production de peroxyde d'hydrogène voire de superoxyde.

Pour un polyphénol à noyau catéchol ( $QH_2$ ), le bilan chimique de la réaction peut s'écrire :



La décomposition de  $H_2O_2$  par les traces métalliques (réaction de Fenton) conduit ensuite au radical  $HO^\circ$  très réactifs :



Ainsi, l'autoxydation de la quercétine en milieu faiblement basique s'accompagne de la consommation de  $O_2$  et de la formation du radical  $HO^\circ$  mis en évidence par résonance paramagnétique électronique (RPE) par détection du composé d'addition stable formé en présence d'un piègeur de spin (DPMO). Dans les mêmes conditions, la rutine, un b3-glycoside de la quercétine, et le kaempférol (analogue 3'-désoxy de la quercétine) ne sont pas oxydés. Même si le mécanisme de l'autoxydation des polyphénols demeure mal connu, il semble que l'étape-clé consiste en la réduction de  $Fe^{III}$  en  $Fe^{II}$  par le polyphénol. La production d'EOR procéderait alors par réduction du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène par  $Fe^{II}$  avec régénération de  $Fe^{III}$ . Notons que le phénomène semble très dépendant de la nature des ligands du fer. Ainsi, à pH neutre, les flavonoïdes fortement réducteurs tels que la quercétine seraient capables de réduire le complexe  $Fe^{III}$ -EDTA, favorisant ainsi la réaction de Fenton mais pas le complexe  $Fe^{III}$ -citrate.

L'autoxydation des polyphénols peut être responsable des effets pro-oxydants parfois observés, notamment lors de tests antioxydants impliquant des générateurs métalliques de stress oxydant.

### 1-3-2 Mécanismes d'oxydation <sup>10</sup>

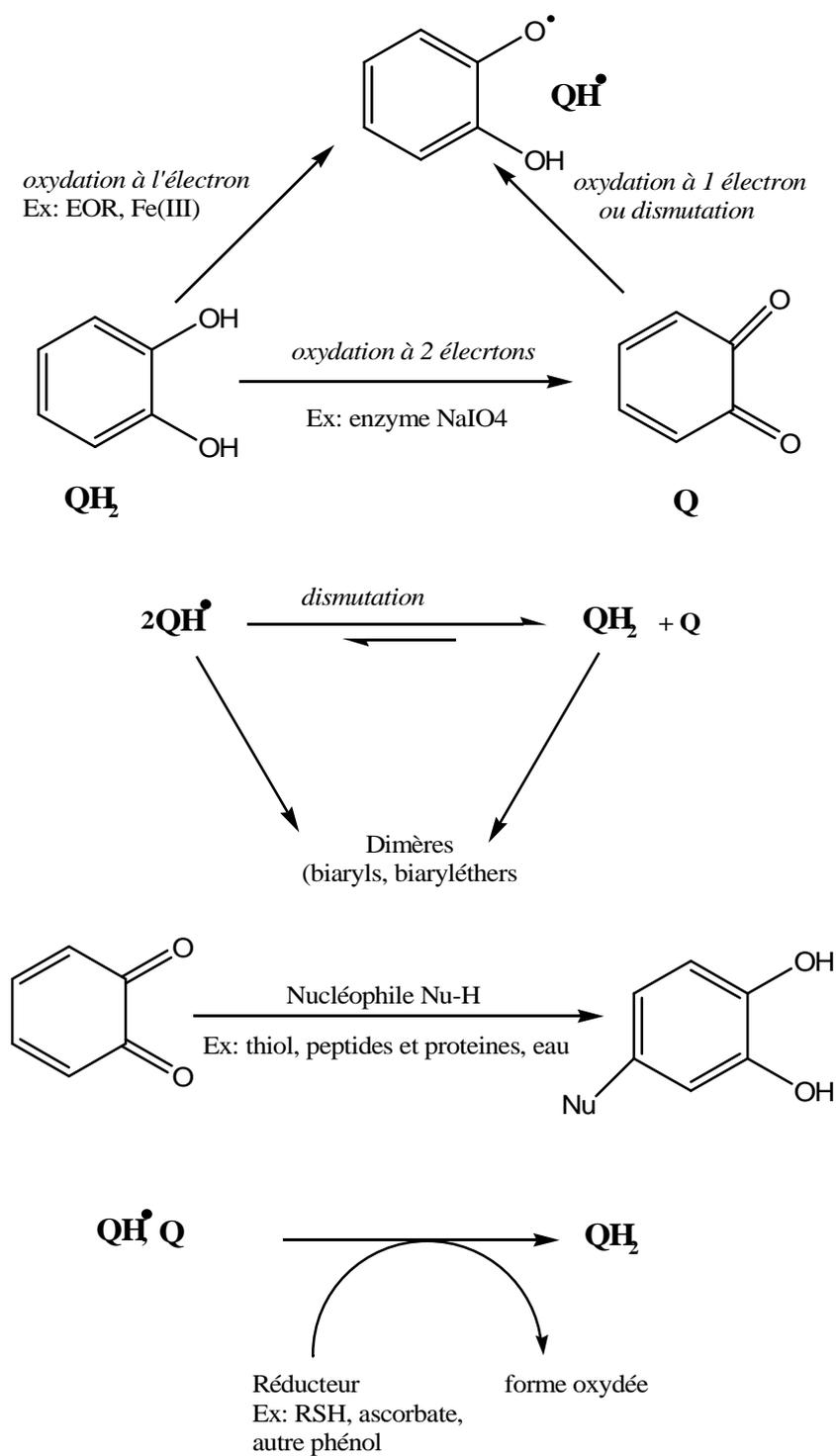
Il semble que, pour un polyphénol donné, la distribution de produit d'oxydation soit peu dépendante de la nature du système oxydant. Selon ce dernier, l'oxydation peut procéder par succession de transfert mono-électronique avec formation d'intermédiaires radicalaires (radicaux aryloxy) ou par oxydation bi-électronique. Malgré la forte délocalisation de leur électron  $\pi$ , les radicaux aryloxy dérivés des polyphénols sont des intermédiaires très instables qui ne sont détectable que par méthodes cinétiques rapides. Ils évoluent rapidement par dimérisation, dismutation voire réaction avec le dioxygène. Il semble que la plupart des radicaux dérivés de polyphénols suivent une cinétique de second ordre, ce qui suggère que la dimérisation, dismutation sont les voies privilégiées. Cette dernière voie requiert en générale un noyau catéchol (**Figure 12**) (voire pyrogallol ou 1,2,3-trihydroxybenzène) tels que la catéchine, la quercétine, l'acide gallique ou l'acide caféique. Elle s'accompagne alors de la formation d'une *ortho*-quinone avec régénération du polyphénol parant. La formation de radicaux semi-quinone à partir d'un polyphénol à noyau catéchol est représentée sur la **Figure 13** dans le cas de l'acide caféique. Le renforcement de la liaison H intramoléculaire au cours de la dissociation favorise le transfert d'atome H.

Dans le cas particulier des 3,4'-dihydroxyflavones (4'-hydroxyflavonols), la dismutation conduit à des *p*-méthylènequinones. Les *o*-quinones et *p*-méthylènequinones sont elles-mêmes des intermédiaires peu stables. Du fait de leur fort caractère électrophile, elles évoluent rapidement par diverses voies (**Figure 12**):

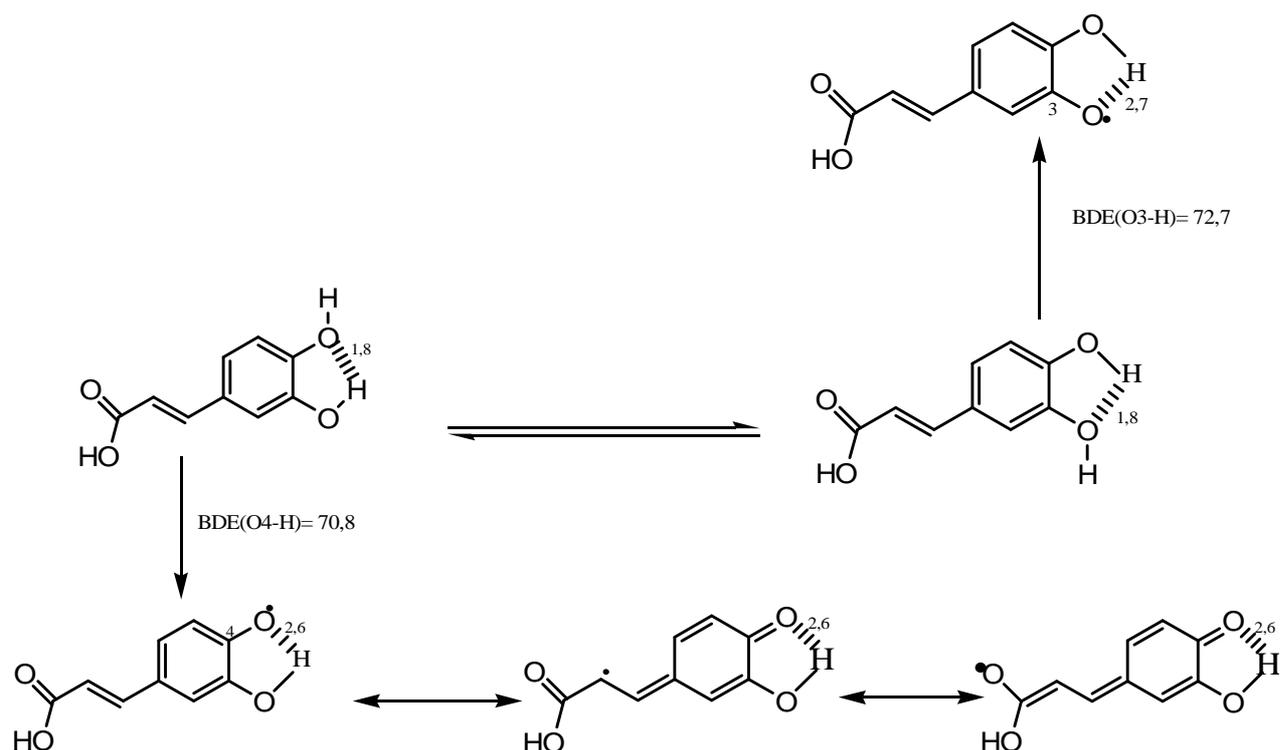
- Dimérisation, voire oligomérisation, cette voie semble prépondérante avec les quinones dérivées de l'acide caféique (**Figure 14**) et de la catéchine (**Figure 15**). La réaction peut procéder par addition nucléophile d'une molécule de polyphénol sur l'*o*-quinone correspondante ou par recombinaison de radicaux aryloxy. L'oxydation de la catéchine par la polyphénoloxydase conduit à une variété de dimères de types biaryle et biaryléther et dont la liaison entre deux unités catéchine implique le cycle A de l'une et le cycle B de l'autre. D'après ces structures, il semble que les deux mécanismes soient en compétition ;
- Addition de solvant (eau, alcool). Dans le cas de la quercétine, l'addition de solvant a lieu sur le centre C2 de la *p*-méthylènequinone, ce qui entraîne une déconjugaison du

cycle central (**Figure 16**). Dans le cas des anthocyanes, l'addition d'eau peut être suivie par l'élimination du cycle B avec formation de coumarines ;

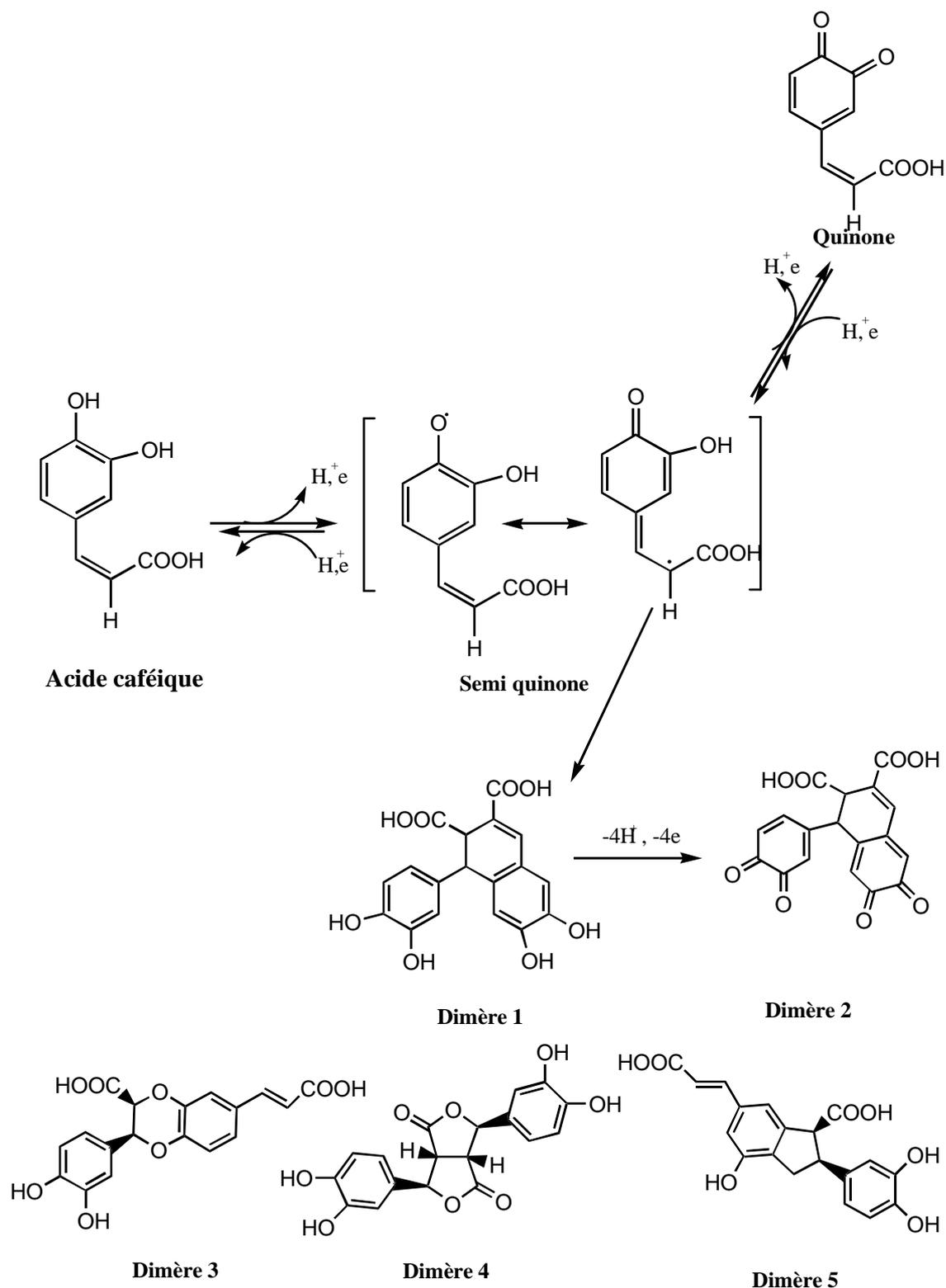
- Addition d'un bon nucléophile présent dans le milieu tel que le résidu Cys du tripeptide glutathion voire un autre polyphénol. Notons que le couplage des quinones à des résidus nucléophiles de protéines et d'acide nucléiques est un phénomène à répercussion biologique potentielle.



**Figure 12.** Oxydation des polyphénols présentant un noyau catéchol et principales formes oxydées (o-quinones et semi-quinones)

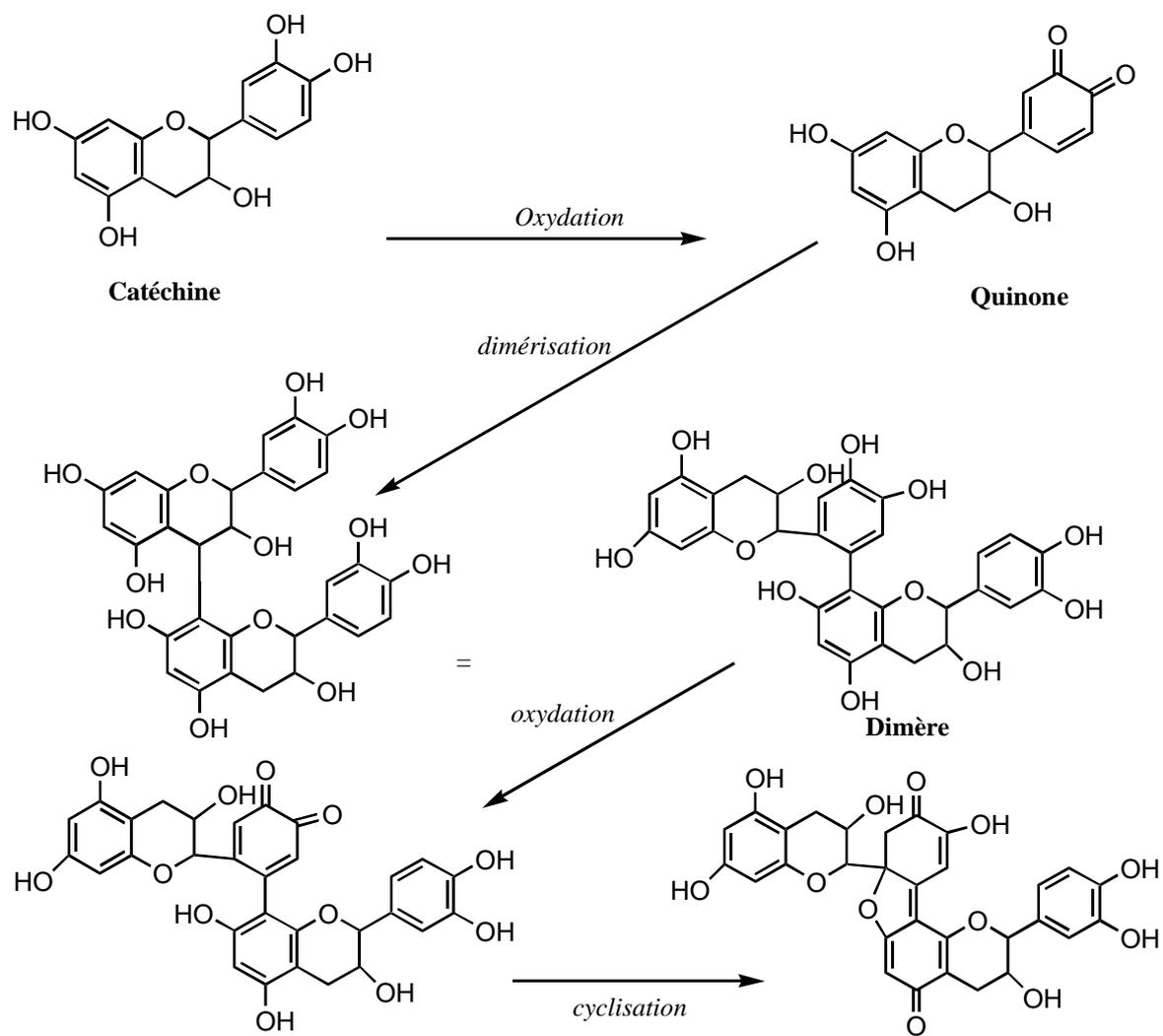


**Figure 13.** Réaction de transfert d'atome H depuis l'acide caféique, (En Kcal mol<sup>-1</sup>, BDE = bond dissociation energy : capacité du phénol à céder un hydrogène)



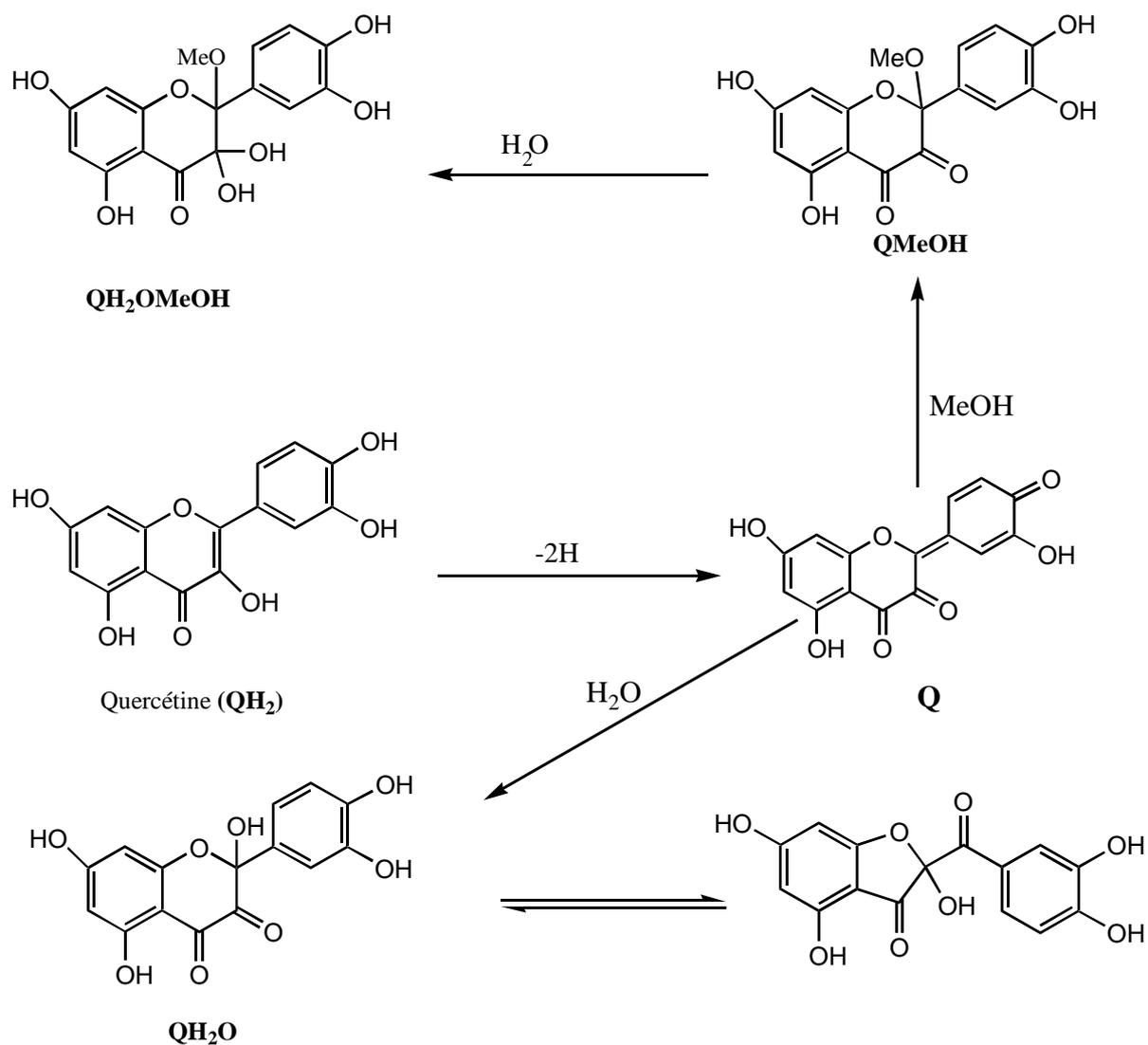
**Figure 14.** Produits d'oxydation de l'acide caféique par voie de dimérisation<sup>11</sup>

<sup>11</sup> Ryuichi A. et coll., 2004. *Am. Soc. Mass Spectrometry*, 15, 1228-1236



**Figure 15.** Produits d'oxydation de la catéchine par voie de dimérisation<sup>12</sup>

<sup>12</sup> Guyot S. et coll., 1995. *Phytochemistry*, 42, 1279-1288



**Figure 16.** Produits d'oxydation de la quercétine.<sup>13</sup>

En outre, le caractère oxydant des *o*-quinones et des radicaux aryloxy permet la co-oxydation de substrats réducteurs tels que l'ion ascorbate, le glutathion et d'autres phénols.

Enfin, signalons que les dimères et produits d'addition présentent également des noyaux phénoliques et sont donc à leurs tours oxydables de sorte que les mélanges réactionnels obtenus dans les réactions d'oxydation des polyphénols sont souvent complexes à analyser. Au cours de l'action antioxydante, ces cascades réactionnelles permettent la capture de plusieurs équivalents d'EOR par mole d'antioxydant, particulièrement lorsque ce dernier

<sup>13</sup> El Hajji H. et coll., 2006. *Free Radical Res.*, 303-320.

présente un noyau catéchol. En plus de la rapidité des réactions de capture des EOR, c'est un avantage important pour l'activité antioxydante des polyphénols.

#### **1-4 Rôle des polyphénols dans les plantes**

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne.<sup>14</sup> Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme.<sup>15</sup>

#### **1-5 Importance nutritionnelle des polyphénols**

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle.

L'intérêt thérapeutique potentiel des polyphénols date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel 1937), chercheur à l'Université Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou du jus de citron, riche en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de mot perméabilité). Malgré ces premiers résultats encourageants, les recherches ne permirent par ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols d'origine végétale. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les polyphénols dont les propriétés antioxydants sont remarquables.

---

<sup>14</sup> Maillard M. N., 1996. *Thèse Doct.*, E.N.S.I.A., Paris, 148p.

<sup>15</sup> Fukai K. *et coll.*, 1991. *J. Agric. Biol. Chem.*, 55, 1895-1897.

### 1-5-1 Stress oxydant- Espèces oxygénées réactives

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOR, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...). Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires, il est actuellement admis que les EOR sont de véritables messagers secondaires impliqués dans l'expression et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies neurodégénératives ou vasculaires telles que l'athérosclérose ou l'hypertension.<sup>16</sup>

Les cellules génèrent divers types d'EOR de réactivités différentes<sup>17,18, 19</sup>

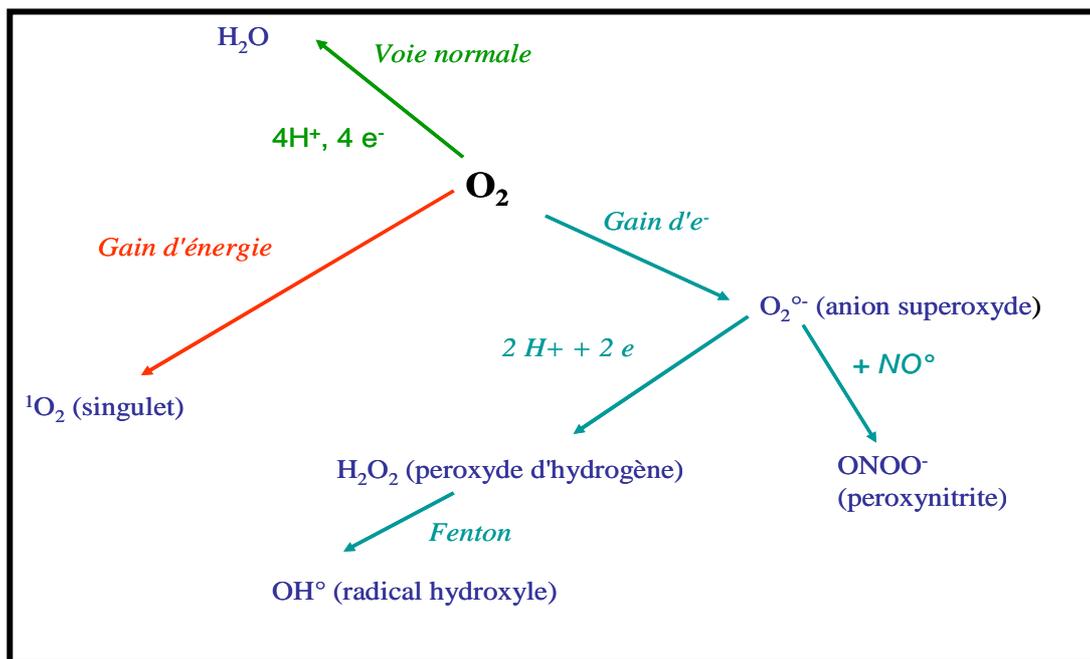
- L'ion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  représentent une classe peu active.  $O_2^{\bullet-}$  peut capter un  $H^+$  pour donner  $HO_2^{\bullet}$  ( $pK_a \approx 5$ ) qui serait la forme réactive de  $O_2^{\bullet-}$  capable d'initier la peroxydation lipidique.  $O_2^{\bullet-}$  peut se dismuter en  $H_2O_2$  et  $O_2$  (réaction spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase), réagir avec  $NO^{\bullet}$  pour former l'anion peroxynitrite  $ONOO^-$ , un oxydant puissant, ou réduire les ions de métaux de transition.  $O_2^{\bullet-}$  est produit notamment par réduction monoélectronique de  $O_2$  dans les mitochondries, par la NADPH oxydase, une enzyme des macrophages qui participe à la destruction des virus et bactéries, ou par la xanthine oxydase, une enzyme du métabolisme des purines.
- Le radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$  est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques.  $HO^{\bullet}$  est produit par réduction monoélectronique de  $H_2O_2$  par les ions métalliques de basse valence comme  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$ , libres ou complexés (hème) (réaction de Fenton).
- Le dioxygène singulet  $^1O_2$  peut être généré par excitation de  $^3O_2$  en présence de photosensibilisateurs mais aussi par des processus chimiques (par exemple, la réaction de  $H_2O_2$  avec  $ClO^-$ ).  $^1O_2$  est très réactif et peut par exemple s'additionner rapidement sur des doubles liaisons carbone-carbone. Les différents processus de formation des radicaux libres sont schématisés dans la **figure 17**.

<sup>16</sup> Dhalla NS. *et coll.* 2000. *J. Hypertens*, 18, 655-73.

<sup>17</sup> Griendling KK. *et coll.*, 2000. *Circ Res*, 86, 494-501.

<sup>18</sup> Yung-Zhong Fang. *et coll.*, 2002. *J. Nutr.*, 18, 872-879.

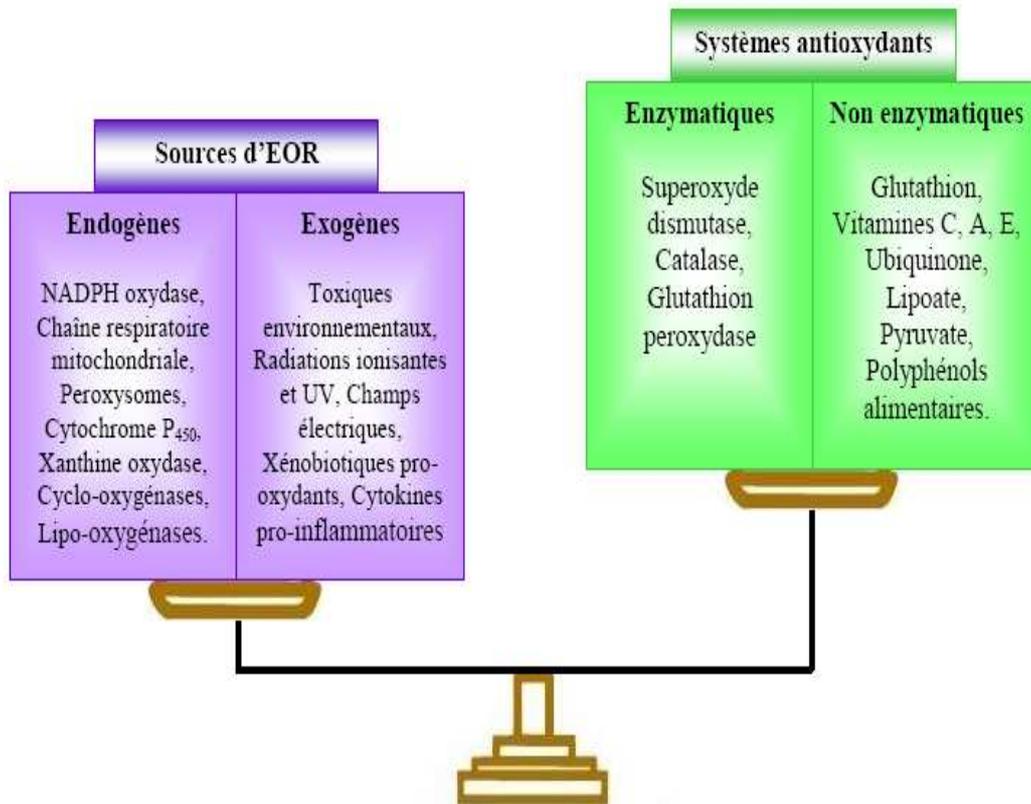
<sup>19</sup> Patel RP. *et coll.*, 2000. *Free Radical. Bio. Med.*, 28, 1780-1794.



**Figure 17.** Formation des espèces oxygénées activées (EOA)

Les EOR sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, la pollution (ex.: oxydes d'azote), l'absorption d'alcool ou de certains médicaments (ex.: catécholamines), l'exposition prolongée au soleil et le tabagisme sont d'autant de situations qui provoquent une surproduction d'EOR dans notre organisme, susceptibles de dépasser nos défenses antioxydantes naturelles (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et autres enzymes antioxydantes), provoquant ainsi des dégâts cellulaires. C'est le stress oxydant. En outre, l'alimentation actuelle n'est pas suffisamment riche en produits végétaux (fruits, légumes et produits dérivés) qui nous apportent une grande variété d'antioxydants (polyphénols, caroténoïdes, vitamines C et E...) qui peuvent agir en complément de nos défenses naturelles. Le stress oxydant peut être d'origine accidentelle comme des inflammations, exposition à des radiations et xénobiotique pro-oxydants, ou génétique (déficit dans l'expression d'enzymes de défense antioxydante). De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défenses (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (**Figure 18**).

L'exposition chronique au stress oxydant peut favoriser l'apparition de cancers et maladies cardiovasculaires.



**Figure 18.** Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant

### 1-5-2 Les polyphénols comme antioxydants

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante sont (Halliwell, 1994)<sup>20</sup> :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

Les polyphénols peuvent agir selon ces divers mécanismes.

<sup>20</sup> Halliwell B.1994. *Nutr. Rev.* ,52, 253- 265.

### 1-5-2 -1 Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes : inhibition d'une grande variété d'enzymes,<sup>21, 22</sup> modulation du fonctionnement de divers récepteurs ainsi que du processus de transcription de certains gènes (par interaction du cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs).

Outre les effets antioxydants, ces interactions, qui sont encore à valider *in vivo*, sont vraisemblablement à la base des effets bénéfiques des flavonoïdes. Par exemples, les acides hydroxycinnamiques sont des inhibiteurs de protéines de coagulation (la thrombine et le facteur Xa), et jouent ainsi un rôle d'anticoagulant.<sup>23</sup>

L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR.<sup>24, 25</sup> Cette double action est bien illustré par le cas de la xanthine oxydase, cet enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Hansaki et ses collaborateurs, dans une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent prévenir cette maladie en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains.<sup>26</sup> Cos et ses collaborateurs ont confirmé les résultats de Hansaki, et ont établi les relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité d'inhiber la formation de superoxyde par inhibition de la xanthine oxydase (formation de complexes enzyme-inhibiteur) et/ou par réduction du superoxyde produit (**Figure 19**).<sup>27</sup> Les résultats de cette étude sont les suivants :

- Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols (cycle C non plan) ne sont pas inhibiteurs de la xanthine oxydase ;
- Les flavonols et les flavones (cycle C plan et conjugué avec les cycles A et B) ont la capacité d'inhiber l'enzyme.

---

<sup>21</sup> Haslam E., 1996. *J. Nat. Prod.* ,59,205-215.

<sup>22</sup> Havesteen, 2002. *J. Pharmacol. Therap.* ,96, 67-202.

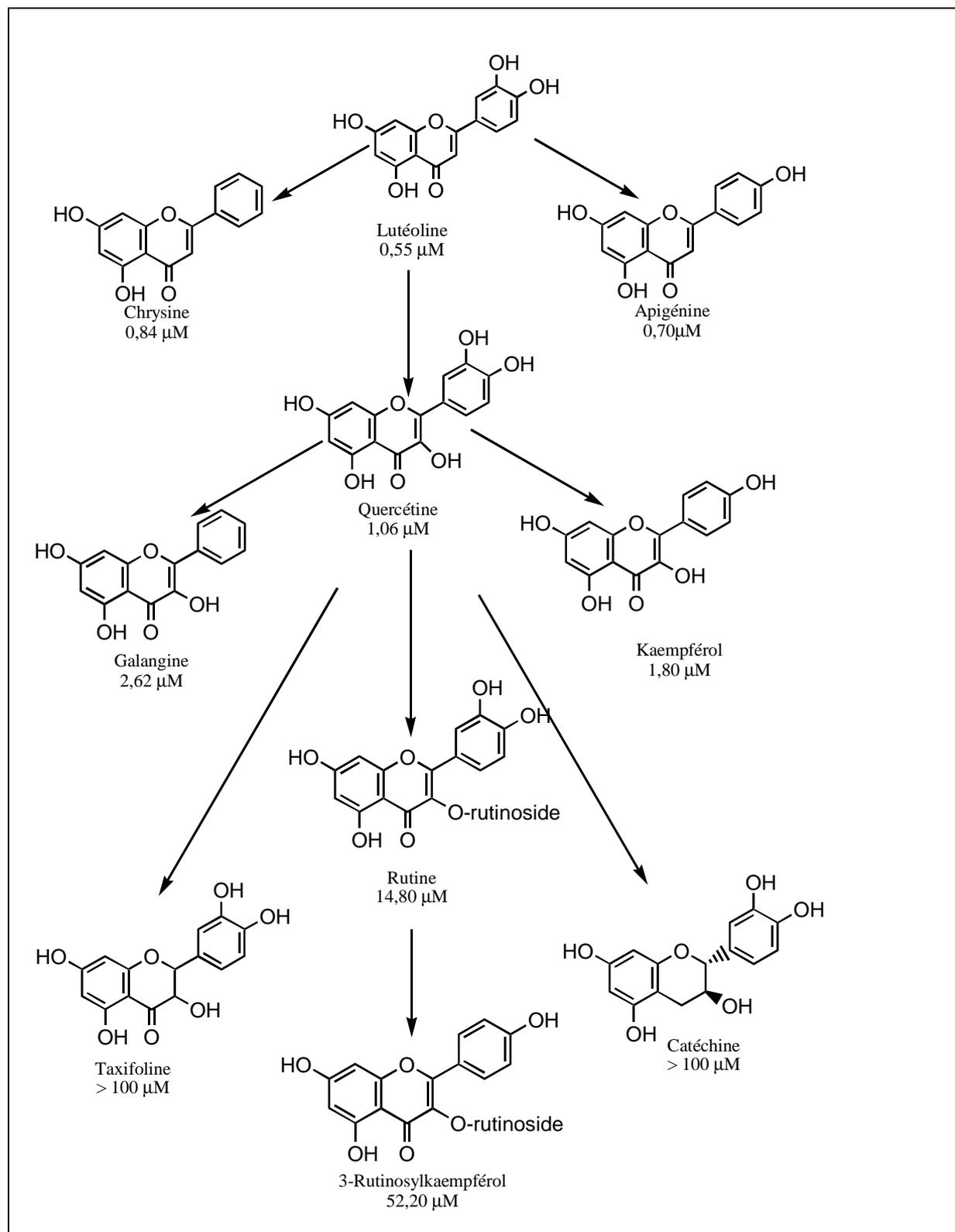
<sup>23</sup> Monien B.H. et coll., 2006. *J. Bioorg. Med. Chem.* ,14, 7988-7998.

<sup>24</sup> Dangles O., Dufour C., 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, Eds O. Andersen and K. Markham, CRC Press, Boca Raton. Chapter 9, p 443-469.

<sup>25</sup> Dangles O., Dufour C., 2008. *Recent advances in Polyphenol Research*. Chapter 3, 67-87.

<sup>26</sup> Hansaki et coll., 1994. *Free Radical. Biol. Med.* ,16, 845-850.

<sup>27</sup> Cos P. et coll., 1998. *J. Nat. Prod.* ,61,71-76,



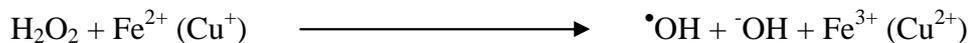
**Figure 19.** Relation structure-activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la xanthine oxydase (les valeurs sont les  $\text{IC}_{50}$ )<sup>27</sup>

- L'absence du groupe hydroxyle en C3 augmente légèrement l'activité inhibitrice. Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.
- Les flavonoïdes présentant un cycle B de type catéchol (*ortho*-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) sont de bons pièges à superoxyde en raison de la stabilité des radicaux semiquinones formés lors de la capture (voir plus loin).

De nombreux flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs des métalloenzymes tels que lipoxygénase.<sup>25</sup>

### 1-5-2 -2 Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ou du cuivre sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, les ions du fer pour la catalase, et ceux du cuivre pour le superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :



En outre, l'autoxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^+$  est une source de superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante.

Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques.<sup>28,29,30</sup> La complexation des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leurs bande d'absorption dans le domaine UV-Visible. Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (**Figure 20**) :<sup>31</sup>

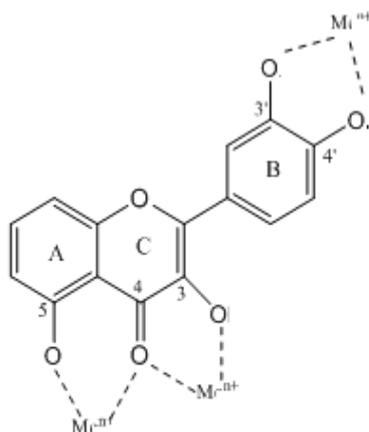
<sup>28</sup> Hider R. C et coll., 2001. *Method. in Enzymol.*, 335, 190-203

<sup>29</sup> Brown J. E. et coll., 1998. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.

<sup>30</sup> Morris C.J. et coll., 1995. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27,109-122.

<sup>31</sup> Van Acker S.A.B.E. et coll., 1996. *Free Radical. Biol. Med.*, 20, 331-342.

(i) les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxy. Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace.



**Figure 20.** Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $M^{n+}$ ).

### 1-5-2-3 Piégeage des radicaux libres

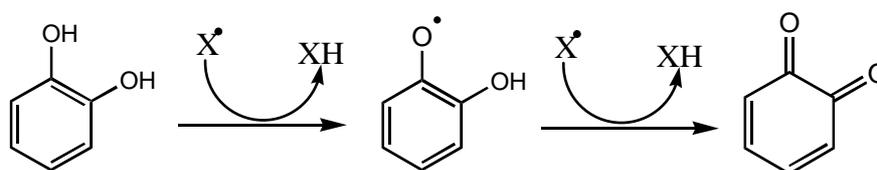
La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox,<sup>32</sup> les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes ( $ROO^\bullet$ ), alkoxydes ( $RO^\bullet$ ) et hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où  $X^\bullet$  représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus.

Le radical aryloxyde ( $\text{Fl-O}^\bullet$ ) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Figure 21**).

<sup>32</sup> Jovanovic S.V. et coll., 1994. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4846-4851.



**Figure 21.** Piégeage des EOR par les flavonoïdes

Eventuellement, le radical aryloxy peut réduire le dioxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant des flavonoïdes. Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple  $FI-O^\bullet/FI-OOH$  mais aussi de la réactivité du radical  $FI-O^\bullet$ .

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres.<sup>33,34,35,36,37</sup> Ainsi, Cuvelier et ses collaborateurs ont testé l'activité antioxydante des acides phénoliques et obtenu les résultats suivants:<sup>38</sup>

- Les acides cinnamiques ont une activité antiradicalaire supérieure à celle des acides benzoïques correspondants. Les acides caféique, sinapique, férulique et *p*-coumarique sont respectivement plus actifs que les acides protocatéchique, syringique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque. Ils sont plus actifs que les phénols simples: acide *p*-coumarique > phénol et acide caféique > pyrocatechol. Ainsi, le groupe  $CH=CH-COOH$  participe à la stabilisation du radical aryloxy par résonance.
- Les acides benzoïques sont, quant à eux, moins actifs que leurs homologues phénols, ce qui tend à démontrer le rôle négatif du  $COOH$  directement fixé sur le noyau benzénique.
- L'addition d'un second  $OH$  sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité antioxydante des acides phénoliques, particulièrement quand le second  $OH$  est en

<sup>33</sup> Pietta P. G., 2000. *J. Nat. Prod.*, 63,1035-1042.

<sup>34</sup> Rice-Evans C.A. et coll., 1996. *Free Radical. Biol. Med.*, 20,933-956.

<sup>35</sup> Dugas A.J. et coll., 2000. *J. Nat. Prod.*, 63,327-31.

<sup>36</sup> Bors W. et coll., 1997. *Biofactors.*, 6,343-355.

<sup>37</sup> Orsolya Farkas et coll., 2004. *Molecules*, 9, 1079-1088

<sup>38</sup> Cuvelier M-E., 1992. *Thèse des Sciences ENSIA de Massy.*

*ortho* ou *para* du premier: *ortho* = *para* > *méta*<sup>46</sup> ou *para* > *ortho* > *méta*.<sup>39</sup> Un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex: acide gallique).

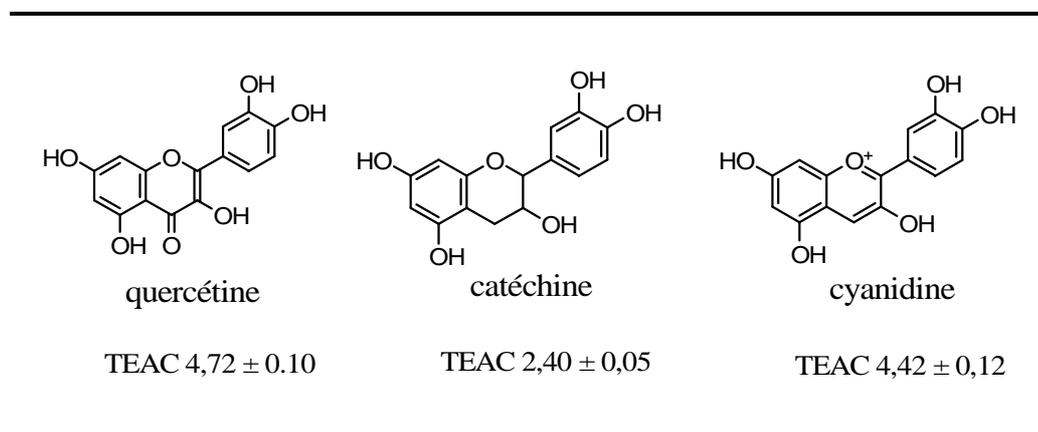
- Le groupement méthoxyle joue, dans une moindre mesure, le même rôle que les groupements OH.

La présence de plusieurs unités de type acide phénolique peut concourir à renforcer l'activité antioxydante.<sup>40</sup>

Les travaux sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical-cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS<sup>•+</sup>)<sup>41, 34</sup> en comparaison avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) permettent d'estimer le paramètre TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée, plus la molécule est active.

#### a) Comparaison de l'activité des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonoïdes

L'activité de la quercétine (4,72 mM) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (2,4 mM). La cyanidine a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine (**Figure 22**). Ces résultats démontrent l'importance de la présence d'un cycle central insaturé, qui permet la délocalisation des électrons dans le radical.



**Figure 22.** Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonoïdes. Les valeurs sont exprimées en mM.<sup>34</sup>

<sup>39</sup> Thumann VF. & Herrman K., 1980. *Deut Lebensm-Rundsch*, 76, 344-347.

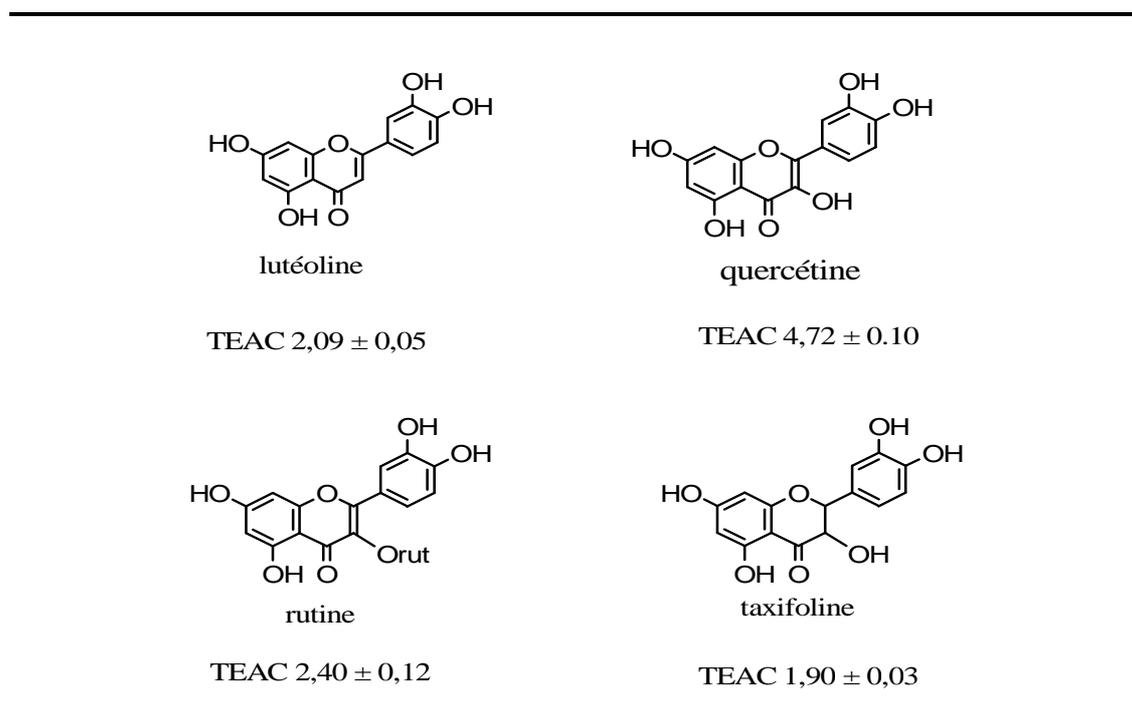
<sup>40</sup> Berset C., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier*. 29-50.

<sup>41</sup> Miller N.J. *et coll.*, 1993. *Clin. Sci*, 84, 407-412.

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

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) réduit l'activité antioxydante à 2,4 mM et 2,1 mM, respectivement (**Figure 23**). Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3 et à la fonction 4-oxo.

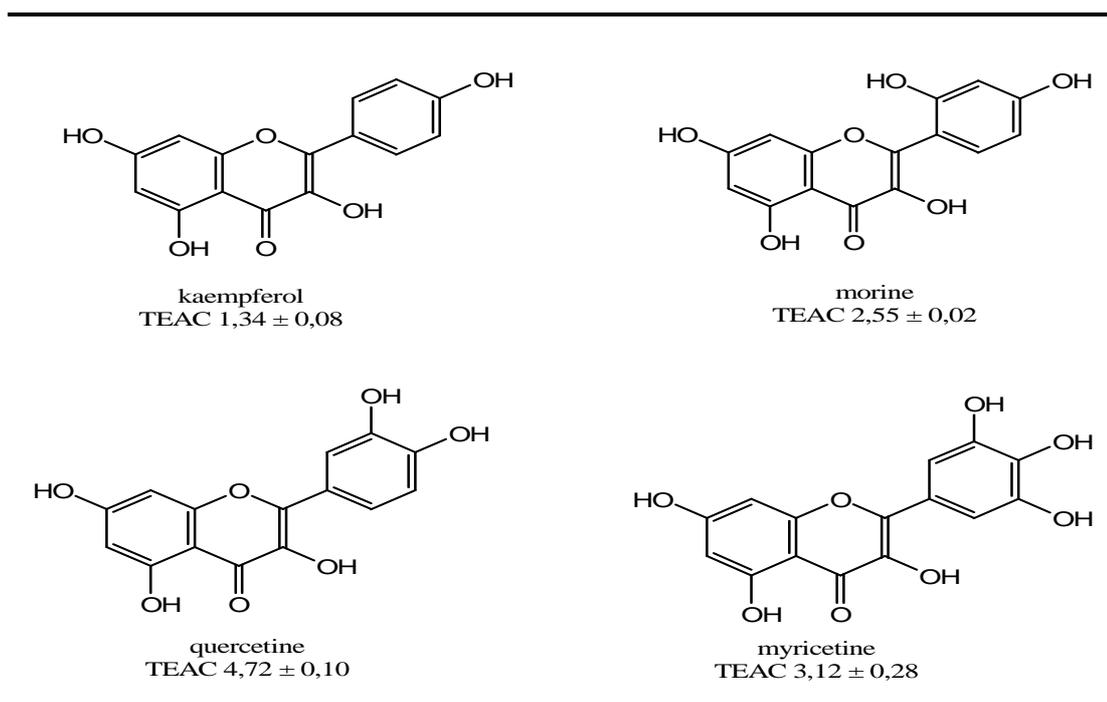
L'importance de la double liaison C2-C3 est confirmée en comparant l'activité de la quercétine avec celle de la taxifoline (dihydroflavonol), qui est deux fois moins active que son analogue flavonol, la quercétine (**Figure 23**).



**Figure 23.** Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3. Les valeurs sont exprimées en mM. <sup>34</sup>

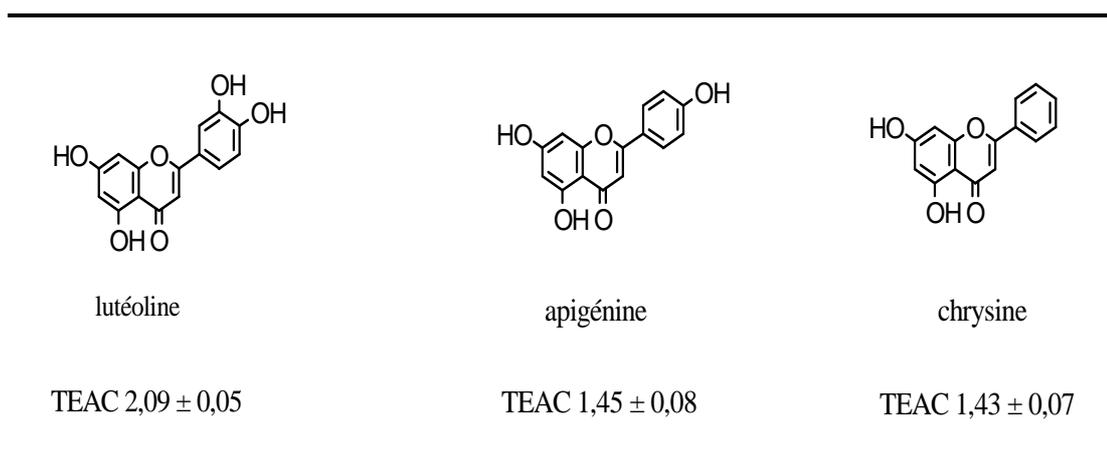
c) Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B

La morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyles en *ortho*) (**Figure 24**). Les résultats démontrent l'importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B. La présence d'un troisième groupe OH sur le cycle B (myricétine) diminue légèrement l'activité antioxydante, sans doute en raison de l'instabilité de ce flavonoïde (grande sensibilité à l'autoxydation).



**Figure 24.** Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol sur le cycle B pour l'activité antioxydante des flavones. Les valeurs sont exprimées en mM.<sup>34</sup>

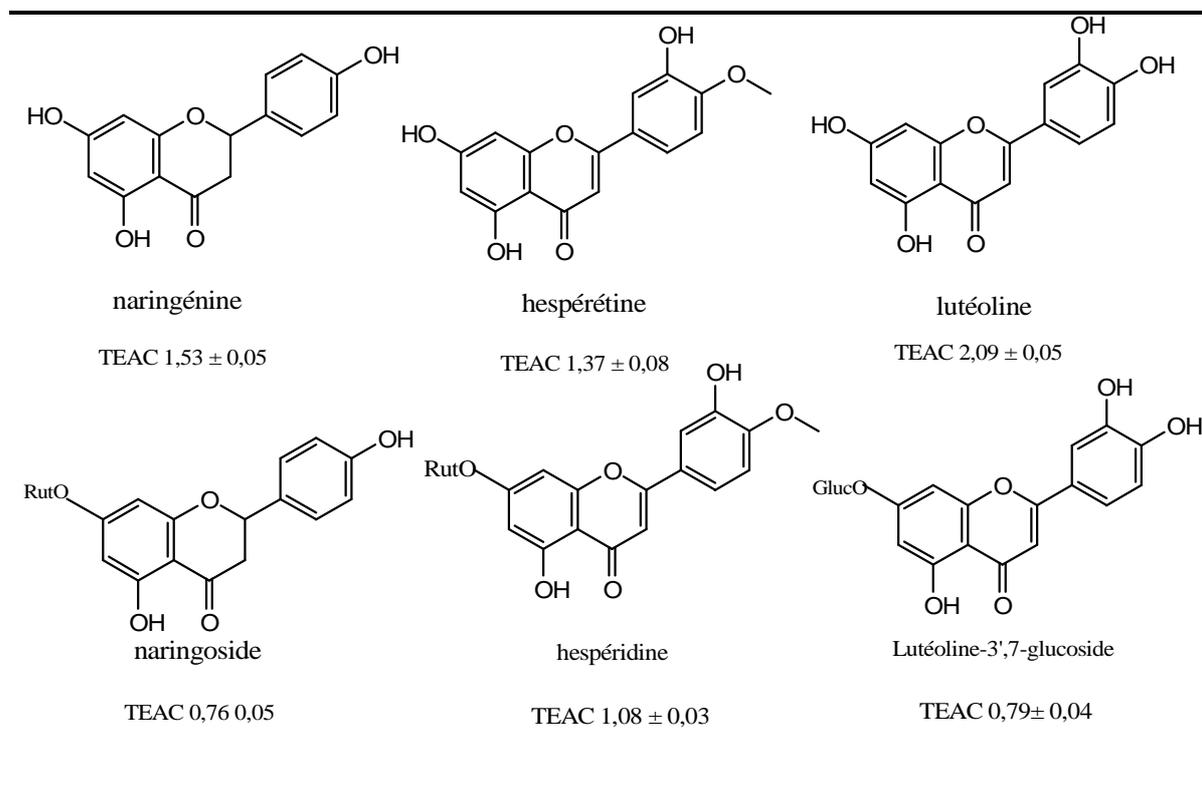
Pour les flavones, un cycle B dihydroxylé en ortho est aussi important pour l'activité antioxydante (**Figure 25**).



**Figure 25.** Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones. Les valeurs sont exprimées en mM.<sup>34</sup>

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

La comparaison de la naringénine avec la naringoside (**Figure 26**) montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue notablement l'activité. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine), et la lutéoline avec son 3',7-diglucoside (**Figure 26**).

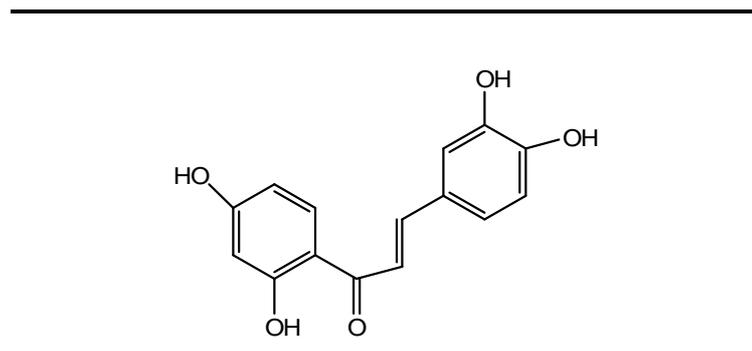


**Figure 26.** Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones. Les valeurs sont exprimées en mM.<sup>34</sup>

e) Chalcones

Certaines chalcones polyhydroxylées, intermédiaires de biosynthèse entre les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes, ont des propriétés antioxydantes. Ainsi la butéine (**Figure 27**) a été rapportée comme deux fois plus active que la quercétine et l' $\alpha$ -tocophérol dans l'inhibition de l'oxydation du saindoux.<sup>42</sup>

<sup>42</sup> Larson R. A., 1988. *Phytochemistry*, 27, 969-978.



**Figure 27.** Structure chimique de la butéine

f) Flavan-3-ols et tannins condensés

On les désigne souvent sous le terme générique de catéchines. Ils sont particulièrement abondants dans le thé vert, le chocolat et les raisins. De nombreuses études montrent que ce sont les composés bioactifs les plus importants du thé vert.<sup>43, 44, 45</sup> Les potentiels d'oxydoréduction des flavan-3-ols sont classés selon l'ordre suivant:<sup>46</sup> gallate d'épigallocatechine (EGCG) = épigallocatechine (EGC) < gallate d'épicatéchine (EGC) < épicatechine. D'après les mesures de TEAC, le potentiel antioxydant des catéchines du thé vert suit l'ordre suivant (**Figure 28**): gallate d'épigallocatechine = gallate d'épicatéchine > épigallocatechine > catéchine.

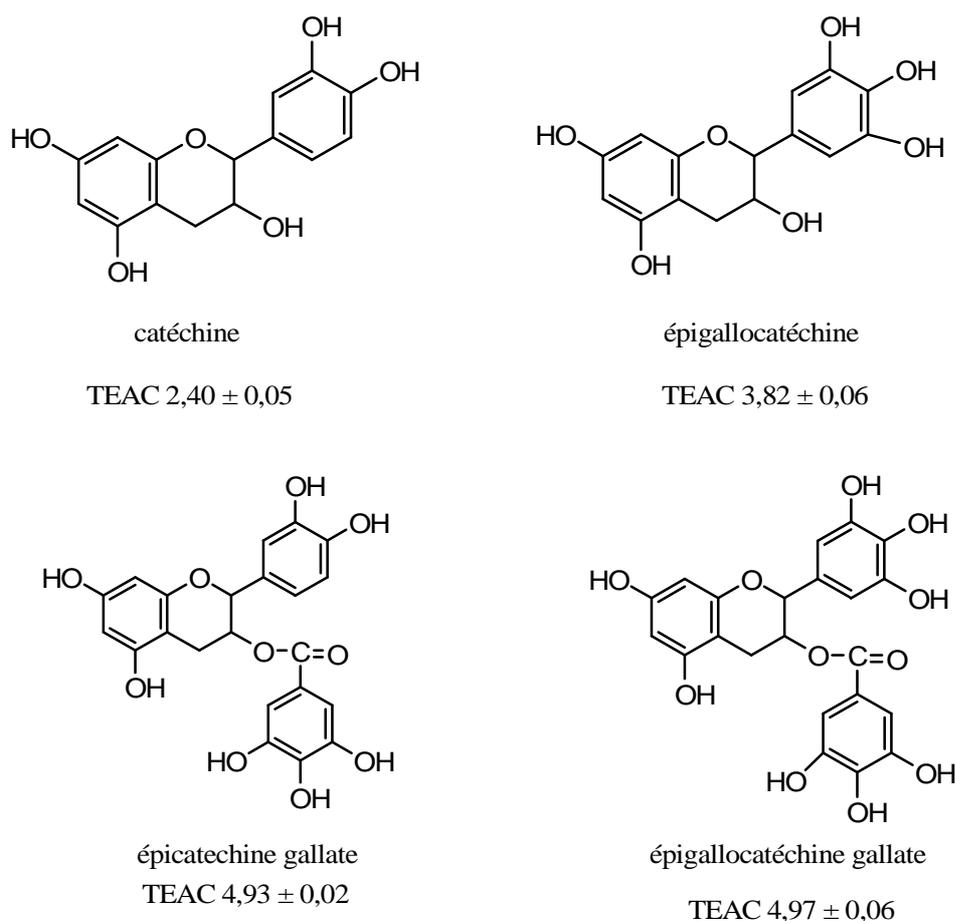
---

<sup>43</sup> Gramaza A. et coll., 2006. *Eur. J. Lipid Sci. Tec.*, 108, 351-362.

<sup>44</sup> Mandel S. & Youdim M B.H., 2004. *Free Radical Biol. Med.*, 37, 304-317.

<sup>45</sup> Yukiaki K. & Yukihiko H., 1999. *Rev. Mutat. Res.*, 436, 69-97.

<sup>46</sup> Higdon J.V. & Frei B., 2003. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 89-143.



**Figure 28.** Activité antioxydante de la catéchine et de la catéchine gallate.<sup>34</sup>

Les catéchines agissent *in vitro* comme pièges à radicaux libres, y compris  $\text{NO}^\bullet$  et le l'ion superoxyde.<sup>47</sup> Plusieurs facteurs entrent en jeu dans leur activité comme la stabilité du radical formé et son évolution pour conduire à une variété de produits d'oxydation.<sup>48</sup>

Les procyanidines dimériques B1 (EC-C) et B3 (C-C) sont de bons inhibiteurs de la peroxydation lipidique et sont des pièges à radicaux  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La présence d'unités galloyles renforce l'activité.<sup>49</sup>

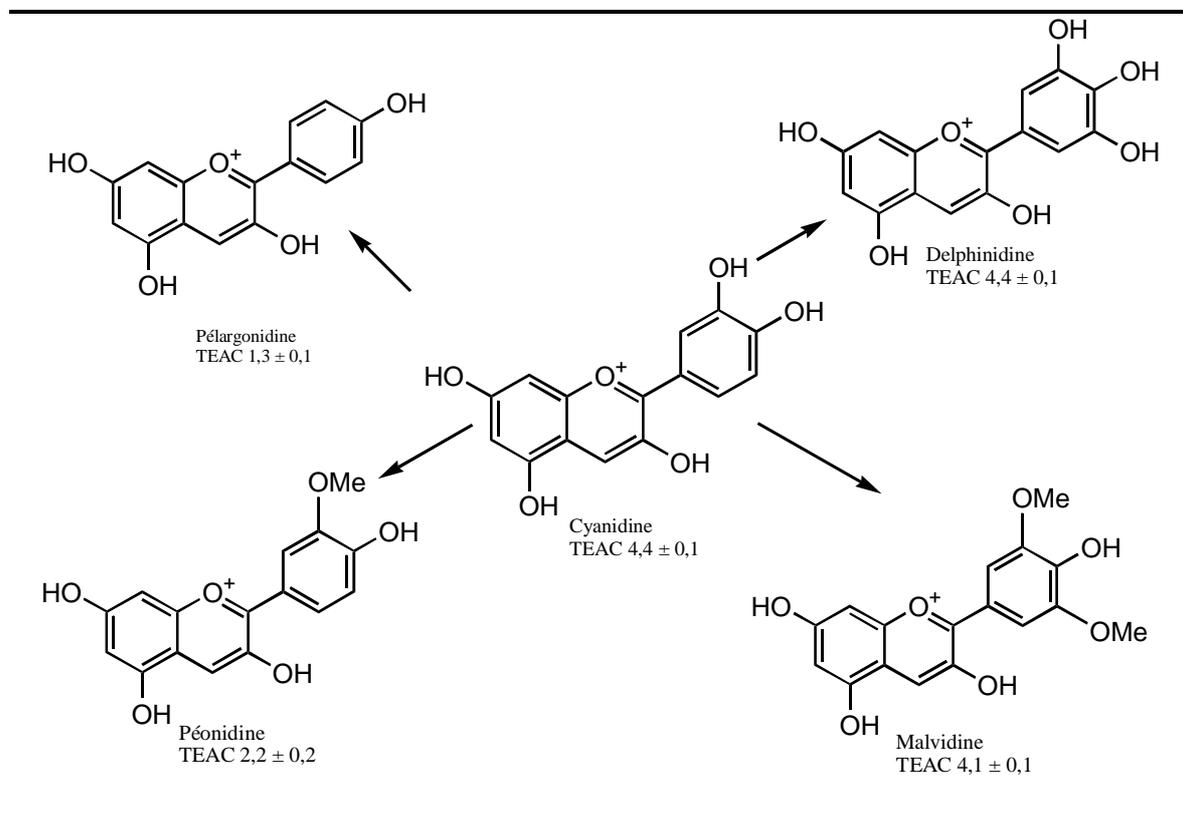
<sup>47</sup> Unno T. et coll., 2001. *J. Sci Food Agric* ,80, 601-606.

<sup>48</sup> Wiseman SA. et coll. , 2000. *Cah. Nutr. Diet.* ,35, 1S23-1S33

<sup>49</sup> Muir AD., 1996. *The American Oil Chemists Society Press*, Champaign. 204-212

g) Anthocyanidines

La cyanidine, la delphinidine et la malvidine (quoique dépourvue de structure catéchol) sont les composés les plus actifs de cette série (**Figure 29**). Cependant, la grande instabilité chimique de ces composés (sauf en solution fortement acide, pH < 2) est susceptible d'interférer notablement dans les tests



**Figure 29.** Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidines. Les valeurs sont exprimées en mM.<sup>34</sup>

Conclusion

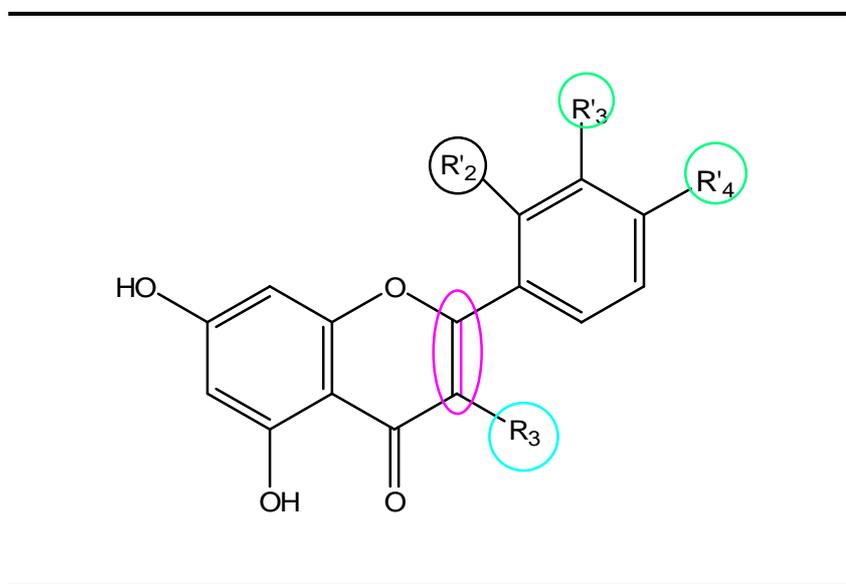
En résumé, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :<sup>50</sup>

- 1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol).
- 2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- 3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3

Les flavonoïdes tels que la quercétine qui répondent à ces trois critères structuraux (**Figure 30**), sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes

<sup>50</sup> Bors W. et coll., 1990. *Method. Enzymol.*, 186, 343-355.

(impliqués dans la peroxydation lipidique). Enfin, les flavonoïdes possédant une structure catéchol sur le cycle B, et en particulier la catéchine, sont des piègeurs du dioxygène singulet.



**Figure 30.** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

## 1-6 Propriétés thérapeutiques des polyphénols

### 1-6-1 Etudes épidémiologiques et propriétés biologiques *in vitro*

Les propriétés biologiques des polyphénols sont essentiellement établies *in vitro* et découlent de leur activité réductrice (effets anti- voire pro-oxydants) et de leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

L'une des premières propriétés reconnue aux flavonoïdes est d'être «veino-actifs» c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancer. Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les catéchines du thé sont des inhibiteurs de l'angiogénèse *in vitro*.

Les activités biologiques des polyphénols ont souvent été évaluées *in vitro*, avec des protéines purifiées, des extraits cellulaires et des cellules entières en culture. Les propriétés

biologiques des métabolites conjugués majoritairement présents dans le sang et les tissus ont en revanche été très peu étudiées, faute de disposer des standards commerciaux.

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols (leur devenir après absorption éventuelle au travers de la paroi intestinale) et une combinaison d'études cliniques pertinentes est indispensable. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir. C'est notamment le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes.

### 1-6-2 Effet antiallergique

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme.<sup>51</sup>

### 1-6-3 Effet anti-inflammatoire

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Une étude de Landolfi et son groupe a montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes.<sup>52</sup> Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la

<sup>51</sup> Di Carlo G. et coll., 1999. *Rev. Life Sci.*, 65, 337-53.

<sup>52</sup> Landolfi R. et coll., 1984. *Biochem Pharmacol*, 33, 1525-1530.

lipoxigénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxigénase.

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.<sup>53</sup> Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles.<sup>54</sup>

#### 1-6-4 Effet anti-ulcère

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production leucotriènes.<sup>55</sup>

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (*Platelet Activating Factor*) qui est un agent ulcérogène potentiel.<sup>56</sup> En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

#### 1-6-5 Effet anti-cancer

Présente dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale.<sup>57</sup> Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses.<sup>58</sup> La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression

---

<sup>53</sup>Ward J. 1994. *Austr. J. Physic.*, 23, 1297-301.

<sup>54</sup>Limasset B. et coll., 1993. *Biochem. Pharmacol.*, 46,1257-1271.

<sup>55</sup>Di Carlo G., Mascolo, N., Izzo, A.A, 1999. *Rev. Life Sci.*, 65, 337-53.

<sup>56</sup>Izzo A.A., 1996.. A review. *J Pharm Pharmacol.*, 48, 1103-1111

<sup>57</sup>Bracke M. et coll., 1991. *Clin Exp Metastasis.*, 9,13-25.

<sup>58</sup>Jodoin J. et coll., 2002. *J. Biochem. Biophys. Acta*, 1542, 149-159.

des gènes et la réduction des radicaux libres.<sup>52</sup> En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène<sup>59</sup> et inhibe l'activité de la collagénase.<sup>60</sup>

Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon.<sup>61</sup>

### 1-6-6 Autres activités biologiques

Les flavonoïdes peuvent aussi prévenir le développement du diabète en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques.<sup>62,63,64</sup> Certains flavonoïdes peuvent inhiber l'athérosclérose et par conséquent réduire le risque des maladies cardiovasculaires.<sup>65,66</sup> Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés.<sup>67</sup>

### 1-7 Propriétés pro-oxydantes des polyphénols<sup>68,69,70</sup>

Certains polyphénols particulièrement réducteurs peuvent manifester une activité pro-oxydante en entrant dans des cycles redox qui génèrent des EOR. Par exemple, l'acide gallique est capable de réduire  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ , ou  $Cu^{2+}$  en  $Cu^{+}$ , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle (**Figure 31**).<sup>71,72,73</sup> Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par autoxydation des ions de basse valence. Par leurs effets pro-oxydants, certains flavonoïdes peuvent promouvoir la dégradation oxydante de l'ADN.

La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions du fer libres, c'est-à-dire non liés aux protéines.

<sup>59</sup> Scutt A. et coll., 1987. *Experientia*, 43, 391-393.

<sup>60</sup> Makimura M., et coll., 1993. *J. Periodontol*, 64, 630-636.

<sup>61</sup> Duthie G. G., et coll., 2000. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79-106.

<sup>62</sup> Ong K.C., Khoo, H.E., 1997. *Gen.Pharmacol.*, 29, 121-126.

<sup>63</sup> Ong K.C., Khoo, H.E., 2000. *Life Sci.*, 67, 1695-1705.

<sup>64</sup> Goodarzi M. T., et coll., 2006. *Acta. Medica Iranica*, 44, 41-45.

<sup>65</sup> Hertog M.G. et coll., 1993. *Lancet*, 342, 1007-1011.

<sup>66</sup> Yann C. & Ramarosan A., 2005. *Pharmacol.Rep.*, 57, 97-107.

<sup>67</sup> Chu S.C. et coll., 1992. *J. Nat Prod.*, 55, 179-183.

<sup>68</sup> Laughton M.J. et coll., 1989. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 2859-2865.

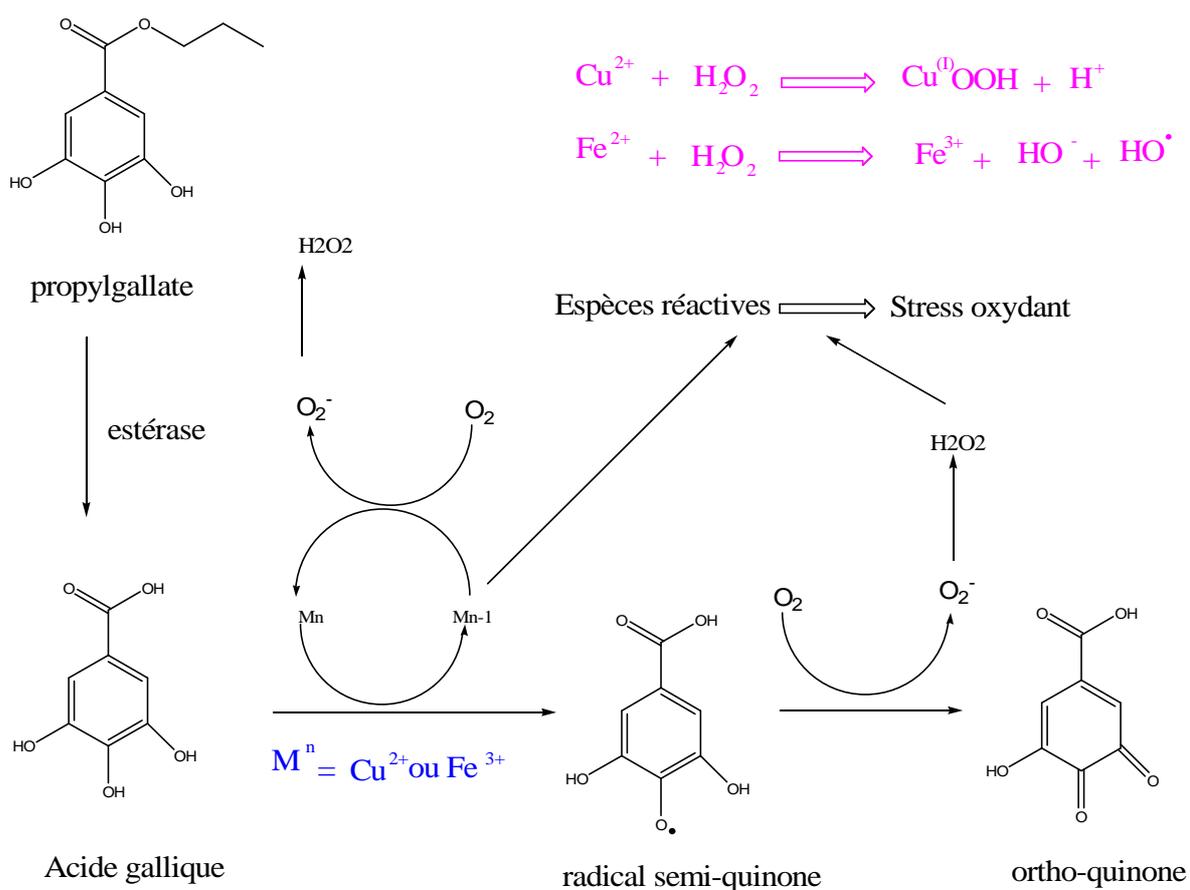
<sup>69</sup> Kessler M. et coll., 2002. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55, 1-11.

<sup>70</sup> Yen G.C. et coll., 1997. *J. Agr. Food Chem.*, 45, 30-34.

<sup>71</sup> Aruoma O.I. et coll., 1993. *J. Agric. Food. Chem.*, 41, 1880-1885.

<sup>72</sup> Kobayashi H. et coll., 2004. *Muta.Res.*, 558, 111-120.

<sup>73</sup> Gow-Chin Yen et coll., 2002. *J. Food. Chem.*, 79, 307-313.



**Figure 31.** Mécanisme de formation d'espèces réactives par l'acide gallique, métabolite du propylgallate.<sup>72</sup>

De plus, des effets indésirables ont été rapportés suite à l'administration de doses pharmacologiques chroniques de polyphénols excédant la dose moyenne absorbée via l'alimentation.<sup>74</sup> Ainsi, des cas de défaillance rénale, anémie, fièvre et réaction cutanée ont été relevés pour des doses allant de 1 à 1,5 g de flavonoïdes par jour.

<sup>74</sup> Cook N. C. & Samman S., 1996. *J. Nutr. Biochem*, 7, 66-76

**Références bibliographiques**

- [1] Fleuriet A., 1982. *Thèse Doc. Etat*, Montpellier.
- [2] Yusuf Y., 2006. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 64-71.
- [3] Bloor S. J., 2001. *Method. Enzymol.*, 335, 3-14.
- [4] Harborne J.B., 1980. Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, vol 8, 329-402.
- [5] Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006. Les Polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier*, 1-28.
- [6] Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème éd.). *Editions Tec & Doc Lavoisier*, 1120p.
- [7] Radi M., 2004. *Thèse. Doc.* Université Cadi Ayyad , Marrakech-Maroc.
- [8] Brouillard R., 1986. *Bull. Liaison groupe Polyphénols* ,13, 76-94.
- [9] Edwin Haslam., 1996. *J. Nat. Prod* ,59, 205-215.
- [10] Dangles O, 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier*, 2006, 29-50.
- [11] Ryuichi A. Masashi Y., Hiroki H., Toshiyuki O., Takashi K., 2004. *Am. Soc. Mass Spectrometry* ,15, 1228-1236.
- [12] Guyot S. Vercauteren J., Cheynier V., 1995. *Phytochemistry*, 42, 1279-1288.
- [13] El Hajji H., Nkhili EZ., Tomao V., Dangles O., 2006. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.
- [14] Maillard M. N., 1996. *Thèse Doct.*, E.N.S.IA., Paris, 148p.
- [15] Fukai K., Ishigami T., Hara Y., 1991. *J. Agric. Biol. Chem.*, 55, 1895-1897
- [16] Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T., 2000 . *J. Hypertens*, 18, 655-73.
- [17] Griendling K.K, Sorescu D, Ushio-Fukai M., 2000. *Circ. Res.*, 86, 494-501.
- [18] Yung-Zhong Fang, Sheng Yang, Guoyao Wu, 2002. *J. Nutr.*, 18, 872-879.
- [19] Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo H., Beckman J.S., Darley-Usmar V.M., 2000 *Free Radical. Bio. Med.*, 28 , 1780-1794.
- [20] Halliwell B. 1994. *Nutr. Rev.*, 52, 253- 265.
- [21] Haslam E., 1996. *J. Nat. Prod.*, 59, 205-215.
- [22] Havesteen, 2002. *J. Pharmacol. Therap.*, 96, 67-202.
- [23] Monien B.H. Henry B.L., Raghuraman A., Hindle M., Desai U. M., 2006. *J. Bioorg. Med. Chem.*, 14, 7988-7998.
- [24] Dangles O., Dufour C., 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, Eds O. Andersen and K. Markham, CRC Press, Boca Raton. Chapter 9, p 443-469.

- [25] Dangles O., Dufour C., 2008. *Recent advances in Polyphenol Research*. Chapter 3, 67-87.
- [26] Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S., 1994. *Free Radical. Biol. Med.*, 16, 845-850.
- [27] Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van-Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe, 1998. *J. Nat. Prod.*, 61,71 -76.
- [28] Hider R.C, Liu. Z. D., Khoder H.H., 2001. *Method. Enzymol.*, 335, 190-203.
- [29] Brown J. E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C. 1998. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.
- [30] Morris C.J., Earl J.R., Trenam C.W., Blake D.R., 1995 *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 109-122.
- [31] Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996 . *Free Radical. Biol. Med.* ,20, 331-342.
- [32] Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G.,1994. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4846-4851.
- [33] Pietta P. G., 2000. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042.
- [34] Rice-Evans C.A., Miller N. J., Paganga G., 1996. *Free Radical. Biol. Med.* ,20, 933-956.
- [35] Dugas A.J.,Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W., 2000. *J. Nat. Prod.*, 63, 327-31.
- [36] Bors W., Michel C., Stettmaier K., 1997. *Biofactors.*, 6, 343-355.
- [37] Cuvelier M-E., 1992. *Thèse des Sciences ENSIA de Massy*.
- [38] Farkas O., Jakus J., Héberger K., 2004. *Molecules*, 9, 1079-1088
- [39]Thumann V.F. & Herrman K.,1980. *Deut Lebensm-Rundsch* ,76, 344-347.
- [40] Berset C., 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier*, 29-50.
- [41] Miller N.J, Rice-Evans C.A, Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.,1993. *Clin. Sci.* ,84, 407-412.
- [42] Larson R. A., 1988. *Phytochemistry* ,27, 969-978.
- [43] Gramaza A. Khokhar S., Yoko S., Gliszczynska- Swiglo A., Hes M. Korczak J, 2006. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 108, 351-362.
- [44] Mandel S. & Youdim M B.H, 2004. *Free Radical. Biol. Med.*, 37, 304-317.
- [45] Yukiaki K. Yukihiro H., 1999. *Rev. Mutat.Res.*, 436, 69-97.
- [46] Higdon J.V., Frei B., 2003. *Crit .Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 89-143.
- [47] Unno T., Sugimoto A ., Kakuda T, 2001. *J. Sci. Food Agric.*, 80,601-606.
- [48] Wiseman S.A., Balentine A ., Frei B., Malvy D., Remesy C., 2000. *Cah. Nutr. Diet.*, 35, 1S23-1S33.

- [49] Muir A.D., 1996. *The Amirecan Oil Chemists' Society Press*, Champaign. 204-212.
- [50] Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., 1990. *Method. Enzymol.*, 186, 343-355.
- [51] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F., 1999. *Rev. Life Sci.*, 65, 337-53.
- [52] Landolfi R., Mower R.L., Steiner M., 1984. *Biochem Pharmacol*, 33, 1525-1530.
- [53] Ward J., 1994. *Austr. J. Physic.*, 23, 1297-301.
- [54] Limasset B., Doucen C., Dore J. Ch., Ojasoo T., Damon M., de Paulet A. C., 1993. *Biochem. Pharmacol.*, 46, 1257-1271.
- [55] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F., 1999. *Rev. Life Sci.*, 65, 337-53.
- [56] Izzo A.A., 1996. *Rev. J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 1103-1111.
- [57] Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., Foidart J.M., De Pestel, G., Mareel, M., 1991. *Clin. Exp. Metastasis.*, 9, 13-25.
- [58] Jodoin J., Demeule M., Béliveau R., 2002. *J. Biochem. Biophys. Acta*, 1542, 149-159.
- [59] Scutt A., Meghji S., Canniff J.P., Harvey W. , 1987. *Experientia.*, 43, 391- 393.
- [60] Makimura M., Hirasawa M., Kobayashi K., Indo, J., Sakanaka S., Taguchi T., Otake S., 1993. *J. Periodontol*, 64, 630-636.
- [61] Duthie G. G., Duthie S. J., Kyle J. A. M., 2000. *Nut. Res. Rev.*, 13, 79- 106.
- [62] Ong K.C., Khoo H.E., 1997. *Gen. Pharmacol.*, 29, 121-126.
- [63] Ong K.C., Khoo H.E., 2000. *Life Sci.*, 67, 1695-1705.
- [64] Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., 1993. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- [65] Yann C. & Ramarosan A., 2005. *Pharmacol.Rep.*, 57, 97-107.
- [66] Goodarzi1 M. T., Zali F., Malakooti M., Safari1 M. R., Sadeghian1 S., 2006. *Acta Medica Iranica* , 44, 41-45.
- [67] Chu S.C., Hsieh Y.S., Lin J.Y., 1992. *J Nat Prod.*, 55, 179-183.
- [68] Laughton M.J., Halliwell.B., Evans P.J., Hoult J., Robin S., 1989. *Biochem. Pharmacol.* , 38, 2859-2865.
- [69] Kessler M., Ubeau G., Jung L. 2002. *J. Pharm. Pharmacol*, 55, 1-11.
- [70] Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H., 1997. *J. Agr. Food Chem.*, 45, 30-34.
- [71] Aruoma O.I., Murcia A., Butler J., Halliwell B., 1993. *J. Agric. Food. Chem.*, 41, 1880-1885.
- [72] Kobayashi H., Oikawa S., Hirakawa K. Kawanishi S., 2004. *Muta. Res.*, 558, 111-120.
- [73] Gow-Chin Yen, Pin-Der Duh, Hui-Ling Tsai, 2002. *J. Food. Chem.*, 79, 307-313.
- [74] Cook N. C. & Samman S., 1996. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.

---

*CHAPITRE 2*  
*Thé vert, consommation, composition*  
*et propriétés biologiques*

---

## Chapitre 2. Thé vert, Consommation, Composition et Propriétés Biologiques

**Résumé** – Le **thé vert** (*Camillia sinensis*) est connu depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques qui lui attribuent des propriétés médicinales. Après l'eau, le thé est la boisson la plus populaire dans le monde, il est consommé en raison de sa saveur, ses caractéristiques aromatiques et effets bénéfiques pour la santé. Il existe plusieurs types de thé. Leur composition qualitative et quantitative dépend notamment du mode de fabrication, du type de culture, du type de cueillette et aussi de l'âge des feuilles. Le thé contient entre autres les composés polyphénoliques (en particuliers les catéchines) ainsi que des méthylxanthines (notamment la caféine). La médecine traditionnelle asiatique utilise les qualités thérapeutiques du thé depuis des millénaires. Aujourd'hui la recherche clinique et fondamentale confirme et précise ses propriétés préventives et curatives.

### 2-1 Généralités

#### 2-1-1 Historique du thé au Maroc

Les infusions ou liqueurs de thé représentent la boisson préparée à partir des feuilles du théier, *Camillia sinensis*. L'histoire de cette boisson remonterait, selon la légende chinoise, à 3000 ans avant Jésus Christ. Elle n'est apparue au Maroc qu'à la fin du XVIIIe siècle par voie maritime mise en place par les Anglais et les Hollandais. Le thé n'était connu que comme une denrée de luxe, un produit exotique d'Asie qu'on offrait aux rois et aux princes.<sup>1</sup> Au départ, en raison de son prix élevé, seuls les grands seigneurs et les commerçants aisés, en consommaient. Mais très vite, les Marocains, dans leur ensemble, en devinrent consommateurs. Depuis sa consommation n'a cessé d'augmenter, pour devenir, de nos jours, la seconde boisson la plus consommée au Maroc après l'eau plate.

---

<sup>1</sup> Bellakhdar J., 1997. *Ibis press* 37 N: pp 20.

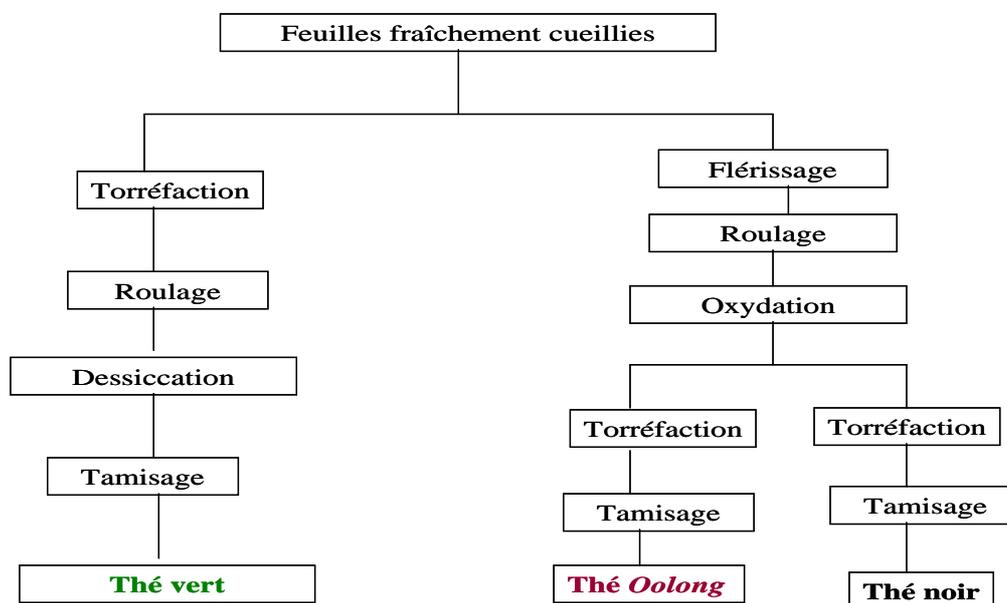
### 2-1-2 Description botanique <sup>2</sup>

A l'état sauvage, le théier (*Camellia sinensis*) est un arbuste de cinq à dix mètres de haut. Mais dans la plupart des plantations, il est taillé à environ 1,20 m pour faciliter la cueillette des feuilles. Les jeunes feuilles à l'extrémité des branches donnent les meilleurs thés, alors que les quatre ou cinq feuilles suivantes servent à la production courante. Les facteurs environnementaux comme le climat, le type de sol et l'altitude contribuent à la teneur en tanins (responsable de la couleur et de la saveur) et en théine (la caféine du thé).

### 2-1-3 Fabrication et consommation du thé <sup>3,4</sup>

Depuis des millénaires, en Asie, les infusions à base de thé sont appréciées pour leurs goûts, leurs caractéristiques aromatiques et leurs propriétés médicinales.

Le thé est manufacturé de la feuille et du bourgeon du *Camillia sinensis*, il existe trois catégories de thé dans le commerce : les thé verts (20% de la production mondiale en 2005), noirs (78% de la production mondiale en 2005) et le semi fermentés ou *Oolong*(2%). Ces trois catégories de thé se distinguent par leurs procédés de fabrication (**Figure 1**), par leurs goûts et par leurs compositions chimiques. <sup>5</sup>



**Figure 1.** Les principales étapes du traitement des feuilles de théiers après récolte.

<sup>2</sup> Pei-gen Xiao, Zhen-yu Li, 2002. *Tea Bioactivity and Therapeutic Potential*. CRC Press. 17-34.

<sup>3</sup> Graham H.N., 1992. *Prev. Med.*, 21, 334-350.

<sup>4</sup> Ning Xu, Zong-mao Chen, 2002. *Tea Bioactivity and Therapeutic Potential*. CRC Press. 35-56.

<sup>5</sup> Monograph. Green tea, 2000. *Alternative Medicine Review*, 5, 372- 375.

Le thé vert ne subit aucun procédé de fermentation, il est obtenu par stabilisation des feuilles de thé sous la chaleur humide ou sèche. Cette opération a pour effet de détruire les enzymes, en particulier les polyphénols oxydases (PPO). Elle est traditionnellement réalisée par torréfaction dans des poêlons en fonte.

L'étape de torréfaction consiste à chauffer les feuilles quelques minutes à 100°C en atmosphère humide pour inhiber les enzymes responsables de l'oxydation. Cette phase dure entre 30s et 5 min pour le thé vert et *Oolong* et 15 et 20 min pour le thé noir.<sup>6</sup> Puis les feuilles sont roulées à la main ou à la machine, et soumises à une nouvelle torréfaction. Dans les procédés plus modernes, en particulier au Japon, la stabilisation est effectuée à la vapeur.<sup>7</sup> Ce procédé permet aux feuilles de conserver leurs couleurs, mais aussi les précieuses substances qui font du thé bien plus qu'une simple boisson : il possède de nombreuses vertus médicinales concernant en particulier les polyphénols monomères.

Durant le flétrissage, qui dure de 16 et 32h suivant le procédé utilisé, les feuilles sont exposées à de l'air chaud (<35°C) permettant à la fois de les déshydrater et de les rendre plus souples pour être roulées. La teneur en eau des feuilles est de 50% environs.

Le roulage, dans le cas des thés verts et oolong, a pour but de donner une forme de bâtonnet aux feuilles. Dans le cas des thés noirs, les feuilles sont roulées afin de rompre la paroi cellulaire et permettre la libération des enzymes polyphénoloxydases et peroxydases qui vont oxyder les polyphénols.

La préparation du thé noir nécessite plusieurs étapes : après la cueillette, les feuilles sont mises à fermenter, sous l'action de l'humidité et de bactéries.. Ce thé est foncé avec une teinte plus ou moins rougeâtre. Ce traitement entraîne une modification profonde de la composition chimique des feuilles. Une oxydation ultérieure conduit à un groupe polydispersé de composés polymériques appelés théarubigines et théaflavines.

Le thé Oolong : ses feuilles n'ayant subi qu'une fermentation partielle, possède une teinte qui se classe entre le vert et le noir. Il contient un mélange des polyphénols monomériques et des molécules de théaflavines.

Pour le thé vert, l'étape de dessiccation consiste à sécher les feuilles avec de l'air chaud pendant 2 à 3 min avec alternance de périodes de 30 min de repos pour atteindre 5 à 6 % d'eau. Concernant les thés noirs, la dessiccation consiste à stopper l'oxydation puis ajuster la teneur en eau des feuilles à une valeur inférieure à 5%.

---

<sup>6</sup> Delmas, F.-X. & Minet, M., 2007. *Le guide de dégustation de l'amateur de thé*. Les éditions du Chêne, Paris, 239 p.

<sup>7</sup> Alain laurens et coll., 1998. Les surprenantes vertus du thé vert. *La recherche*,308, 54-57.

Les feuilles sont ensuite tamisées et classées en trois catégories : feuilles entières, brisées ou broyées. L'apparence des feuilles, leur type et le procédé subi déterminent le grade du thé.

Les trois variétés du thé contiennent une quantité significative de caféine (3-6%) qui n'est pas influencée par les procédés de fabrication.

De toute la production du thé, 78% est consommé en tant que thé noir principalement dans les pays occidentaux et quelques pays asiatiques, alors qu'environ 20% est consommé en tant que thé vert principalement dans les pays asiatiques, y compris le Japon, la Chine, la Corée et quelques régions d'Inde. Approximativement 2% est manufacturé sous forme de thé d'Oolong, qui est en particulier produit et consommé en Sud-est de Chine.

## 2-2 Composition chimique du thé vert <sup>3,8,9,10,11</sup>

Peu de gens savent que le thé n'est pas uniquement une façon de terminer un bon repas en buvant un liquide chaud, le thé est aussi une plante qui renferme différentes substances actives utilisées en phytothérapie. Actuellement, de nombreuses recherches scientifiques montrent que le thé est une source d'antioxydants qui renforcent les défenses naturelles.<sup>12,13,14,15</sup> La feuille du thé ne contient pas moins de 350 constituants. Généralement, à l'état frais, le thé vert renferme les constituants chimiques qui sont :

### - 30% à 40% de polyphénols :

Les propriétés pharmacologiques du thé vert sont dues principalement à la présence des polyphénols. Près de trois-quarts de ces derniers appartiennent au groupe des flavanols, couramment appelés les tannins, et largement représentés par des catéchines dont le plus important est l'épigallocatechine (EGC) et son gallate (de 48 à 55 % du contenu total en polyphénols).

On rencontre quatre composés, (-) épigallocatechine-3-gallate (EGCG), (-)épigallocatechine (EGC), (-) épicatechine-3-gallate (ECG) et (-) épicatechine (EC), ainsi

<sup>8</sup> Banerjee B., Chaudhuri T.C., 2005. Therapeutic effects of tea. *Science Publisher*. 23-28.

<sup>9</sup> Zong-mao Chen et coll., 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 57- 88.

<sup>10</sup> Hua-fu Wang et coll. 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 89-130.

<sup>11</sup> Chu D-C., Juneja L.R., 1997. Chemistry and Application of Green tea. *CRC Press*, 13-22.

<sup>12</sup> Landau J. M. et coll., 2006. *Nutritional Oncology (Second Edition)*, 597-606.

<sup>13</sup> Pastore R. L., Fratellone P., 2006. *EXPLORE: J. Science and Healing*, 2,531-539.

<sup>14</sup> Ozercan I. H. et coll., 2008. *Nutr. Res.*, 28, 92-97.

<sup>15</sup> Dufresne C. J., Farnworth E.R., 2001. *J.Nutr. Biochem.*, 12, 404-421.

que quatre composés minoritaires, (+) gallocatéchine-3-gallate (GCG), (+) gallocatéchine (GC), (+) catéchine-3-gallate (CG) et (+) catéchine (C) (**Figure 2**).

Le thé est aussi une source de flavonols, principalement la quercétine, le kaempferol et la myricétine (2-3% de la composition des polyphénols de thé).<sup>16</sup> Ils sont présents dans les extraits du thé sous forme de flavonols glycosides. Des analyses d'extraits de thé par CLHP et CLHP-MS ont identifié la présence des flavonols liées à des groupements glycosyls (glucose, rhamnose, arabinose,...).<sup>17,18,19</sup>

Le thé vert contient aussi une quantité significative d'acides phénoliques (acide gallique, acide coumarique,...).

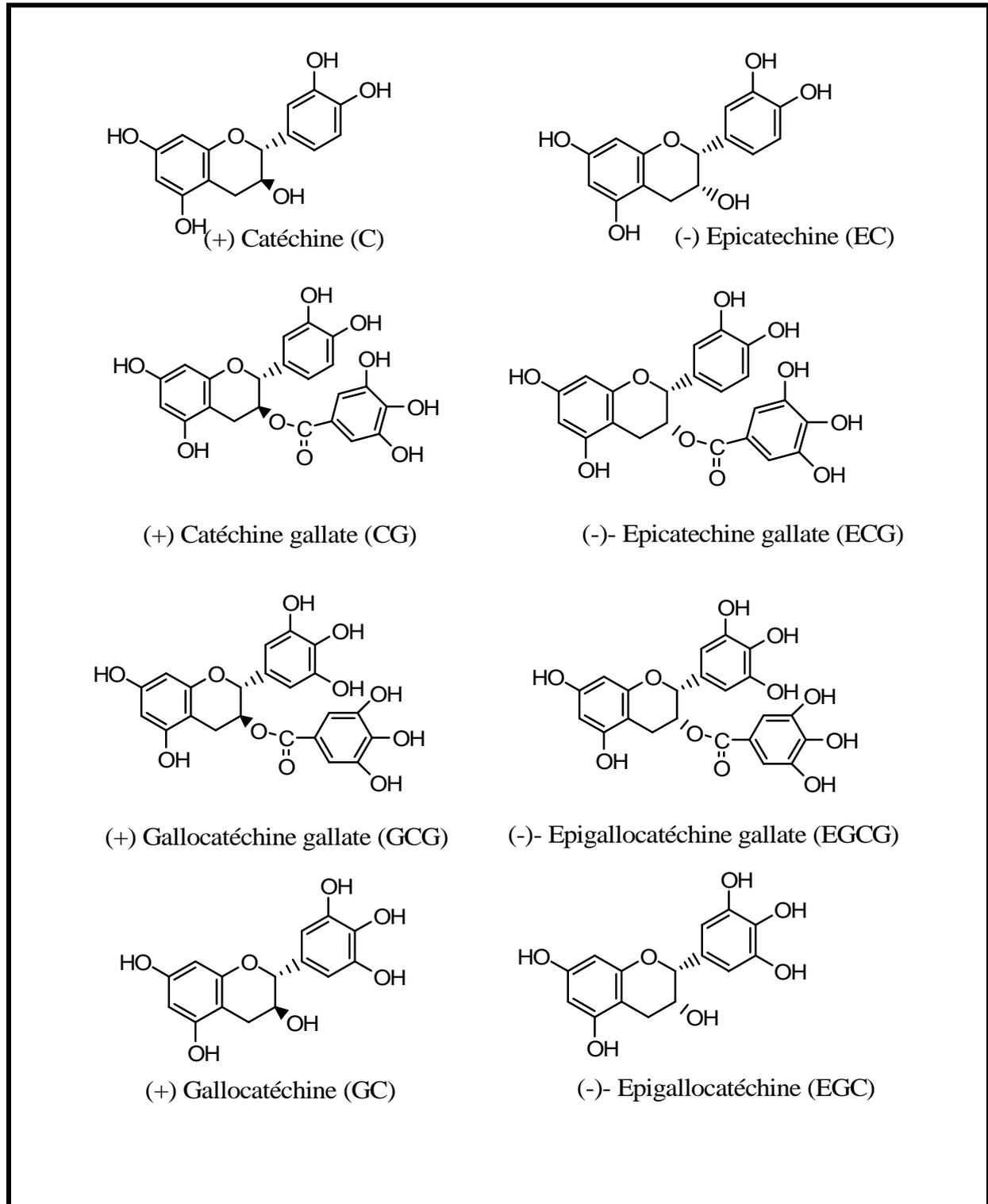
---

<sup>16</sup> Gramza A., Korczak J., 2005. *Trends Food Sci. Tech.*, 16, 351-358.

<sup>17</sup> Keith R. P. et coll., 1998. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2517-2522.

<sup>18</sup> Peterson J. et coll., 2005. *J. Food Compos. Anal.*, 18, 487-501.

<sup>19</sup> Finger A. et coll., 1991. *J. Sci. Food Agric.*, 55, 313-321.



**Figure 2.** Les catéchines de thé vert

- 1 à 5 % de caféine:

La caféine ou la théine sont une seule et même substance appelée triméthylxanthine. Dans le thé, l'action stimulante de la caféine est significativement modifiée par la présence des polyphénols qui génèrent un effet prolongé et modéré.

- Sources des vitamines :

Le thé est riche en vitamines du groupe B telles que thianine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3). La vitamine C se trouve aussi en quantité significative dans le thé vert. Enfin l'infusion de thé contient la vitamine P qui favorise la perméabilité capillaire et l'élasticité de la paroi des vaisseaux sanguins.

- Autres composants:

A l'état frais, le thé renferme 27% de matières sèches dont, en moyenne :

\*40% de glucides, 15 à 23 % de protéides et 2 à 3% de lipide, de faible quantité de chlorophylles et de caroténoïdes. Ces substances sont faiblement extraites lors de l'infusion ;

\* 9% de matières minérales. 5 à 6 tasses de thé par jour permettent de couvrir une partie des besoins physiologiques quotidiens. 45 % pour le manganèse, 10 % pour le potassium et 5 % pour le magnésium.

Par ailleurs, le thé est une boisson riche en fluor qui favorise la prévention des caries. La consommation d'une tasse apporte en moyenne 0,1 mg de fluor.

## **2- 3 Biosynthèse des catéchines de thé vert**<sup>10,20</sup>

La croissance des feuilles de *Camillia sinensis* s'accompagne de changements quantitatifs et qualitatifs du contenu phénolique.

Le schéma de la **figure 3** résume les voies de synthèse des principaux catéchines, d'après les données fournies par la littérature.<sup>10, 15</sup>

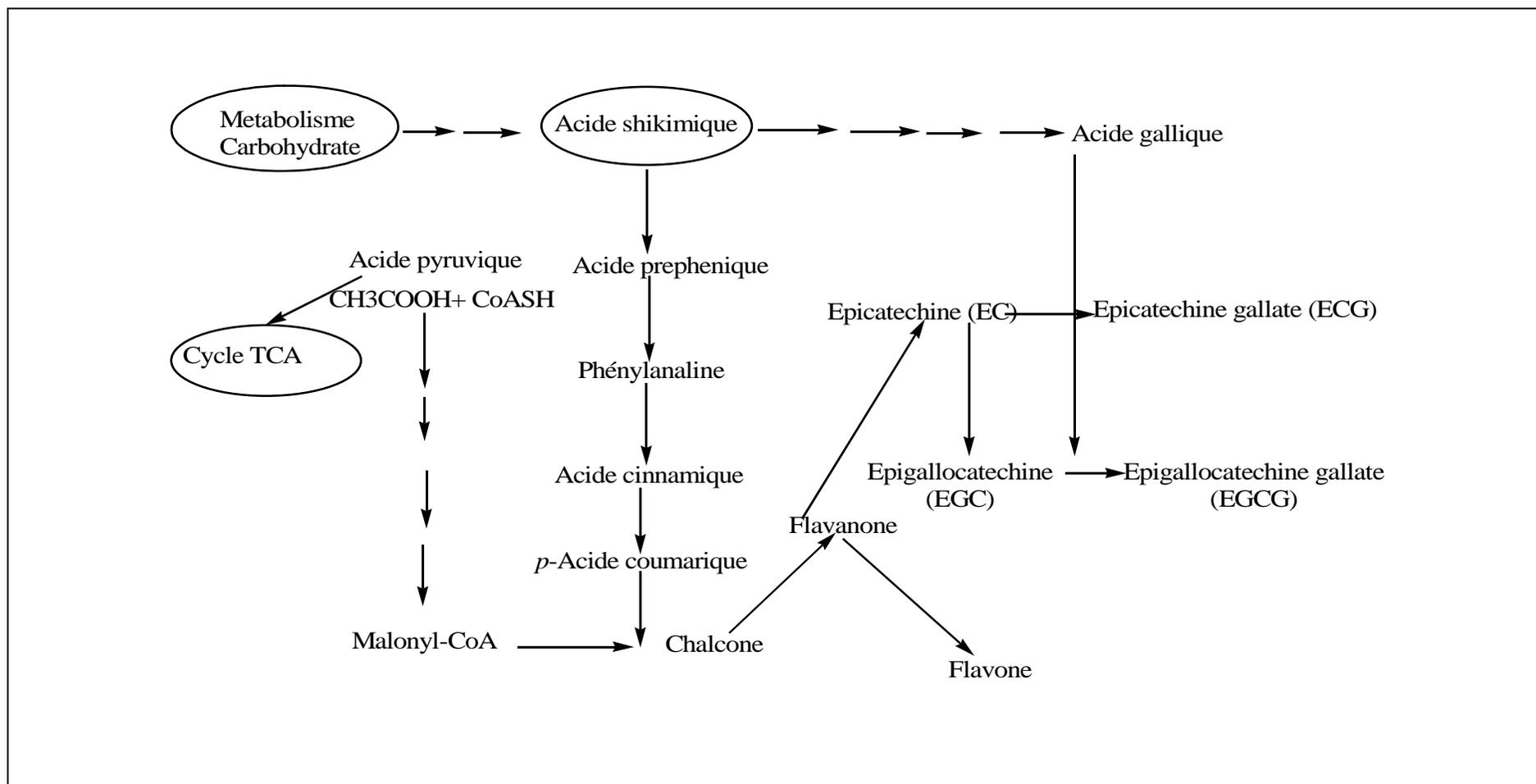
Les catéchines du thé vert sont issues de la condensation de molécule d'acide acétique malonique et d'acide shikimique. L'acide gallique présent dans les feuilles de *Camillia sinensis* est produit par la voie de l'acide shikimique.

---

<sup>20</sup> Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. CRC Press. 11-16.

La (-)-épigallocatechine est produite par hydroxylation de la molécule (-)-épicatéchine alors que la (-)-épicatéchine gallate et l'épigallocatechine gallate sont synthétisées par estérification de la (-)-épicatéchine avec l'acide gallique.

La présence de la lumière favorise l'augmentation de la production des catéchines dans les feuilles du thé. Ce phénomène est relié essentiellement à l'activité de la phénylalanine-ammonia-lyase (PAL) qui est l'enzyme clé dans la biosynthèse des catéchines (noyau B). Quand les feuilles du thé sont couvertes (absence de la lumière), l'activité de cet enzyme décroît rapidement.



**Figure 3.** Biosynthèse des catéchines dans les feuilles de « *Camellia sinensis* »

## 2- 4 Activité thérapeutique du thé vert

De nombreuses propriétés pharmacologiques du thé vert ont été démontrées par plusieurs auteurs. On peut dénombrer un effet antioxydant,<sup>21,22,23</sup> antimutagénique<sup>24,25,26</sup> antiviral,<sup>27</sup> un effet antiulcère,<sup>28,29</sup> inactivation des virus,<sup>30,31</sup> réduction de glucose dans le sang,<sup>32,33</sup> induction de l'apoptose,<sup>34, 35</sup> anti-inflammatoire,<sup>36</sup> et un effet antimicrobien.<sup>37,38</sup>

### 2-4-1 Mécanisme moléculaire de l'effet bénéfique de thé vert<sup>39,40</sup>

L'activité bénéfique de thé vert sur la santé est essentiellement attribuée aux propriétés antioxydantes de ses polyphénols. Cet effet thérapeutique est dû à la présence des groupes hydroxyles du noyau B des catéchines non gallate (EC) et (EGC) et aussi des hydroxyles du noyau B et D des catéchines gallate (ECg) et (EGCg). La présence de 3,4,5- trihydroxyl sur le noyau B a montré une activité antioxydante très importante. Il est capable de piéger et neutraliser les radicaux libres.

Les polyphénols du thé vert sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les espèces oxygénés réactives (EOR) par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène, mais aussi, en chélatant les ions des métaux de transition sous des complexes inertes.

De nombreux travaux scientifiques ont rapporté que les catéchines du thé vert ont un pouvoir antioxydant plus puissant que celui de la vitamine C et E<sup>16,41,42,43</sup>

<sup>21</sup> Coimbra S. et coll, 2006. *Clin. Nutr.*, 25, 790-796.

<sup>22</sup> McKay D. L., Blumberg J. B., 2002. *J.Am. Coll.Nutr.*, 21,1-13.

<sup>23</sup> Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 26-40.

<sup>24</sup> Yukihiro Kuroda & Yukihiro Hara, 2004. Health Effects of tea and its catechins. *Springer* 28-30.

<sup>25</sup> Thiraviam Geetha et coll., 2004. *Mut. Res.*, 556,65-74.

<sup>26</sup> Pei-Fang Hung et coll., 2005. *Am J Physiol. Cell. Physiol.*, 288,C1094-C1108.

<sup>27</sup> Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 91-111.

<sup>28</sup> Tajima K., Tominaga S., 1985. *Cancer. Res*, 76,705- 716.

<sup>29</sup> Yukihiro Kuroda & Yukihiro Hara, 2004. Health Effects of tea and its catechins. *Springer* 24-28.

<sup>30</sup> J Mukhtar H., Nihal A., 2000. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71,1698S-1702S.

<sup>31</sup> Yong-Su Zhen, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 211-242.

<sup>32</sup> Yun- Hsi Kao et coll., 2006. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 188-210.

<sup>33</sup> Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 129-139.

<sup>34</sup> Chiseko Noda, et coll., 2007. *Biochem. Biophys.Res.Com.*, 362, 951-957.

<sup>35</sup> Emma C. Stuart, Rhonda J. Rosengren, 2008. *Life Sci.*, 82, 943-948.

<sup>36</sup> Tsung O. Cheng, 2006. *Inter. J. Cardiol.*, 108, 301-308.

<sup>37</sup> Hamilton-Miller J.M.T, 1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 2375-2377.

<sup>38</sup> Pei-Zhen Tao, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 169-210.

<sup>39</sup> Nurulain T.Zaveri, 2006. *Life Sci.*, 78, 2073-2080.

<sup>40</sup> Roy D.K, et coll. 2005. Therapeutic effects of tea. *Science Publisher*. 29- 48.

<sup>41</sup> Rice-Evans C.A., et coll., 1996. *Free Radical Bio. Med.*, 20, 933-956.

<sup>42</sup> Kazuo Mukai, et coll, 2005. *Free Radical Bio. Med.*, 38, 1243-1256

### 2-4-2 Prévention des maladies cardiovasculaires<sup>44,45,46,47</sup>

Les agents qui inhibent l'agrégation anormale des plaquettes réduisent aussi les risques de maladies cardiaques. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation du thé est liée à une baisse importante des maladies cardiovasculaires.

Le thé inhibe l'agrégation des plaquettes et aussi le facteur d'activation des plaquettes (PAF). Des études de laboratoire ont montré que les flavonols et particulièrement l'épigallocatechin-3-gallate EGCG de thé réduisent le taux de cholestérol (*in vivo*) et inhibe l'oxydation des lipoprotéines à basse densité (LDL) (*in vitro*).<sup>48, 49, 50</sup> Le thé vert peut aussi diminuer la tension artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Les inhibiteurs de l'ECA sont les médicaments de choix utilisés pour combattre l'hypertension artérielle.

### 2-4-3 Prévention du cancer<sup>51, 52, 53, 54, 55</sup>

Ces dernières années, de très nombreux travaux publiés dans les revues scientifiques internationales ont fait état d'une activité préventive contre les maladies cancéreuses.

Des recherches plus récentes ont montré que la consommation du thé pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate,<sup>56</sup> de la peau,<sup>51</sup> du colon et du pancréas.<sup>57</sup> Des travaux expérimentaux sont actuellement en cours sur de nombreux modèles de tumeurs provoquées chez l'animal, ils ont montré un effet préventif du thé et surtout l'EGCG contre certaines tumeurs du sein, de la peau, de la prostate, et du poumon. Des expériences sur l'animal ont démontré que le thé vert et l'EGCG peuvent empêcher la carcinogenèse à toutes les étapes, à savoir initiation, propagation et terminaison.

---

<sup>43</sup> Lotito S. B., Fraga C.G., 1997. *Free Radical Bio.Med.*, 24, 435-441.

<sup>44</sup> Zong-mao Chen, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 151-168.

<sup>45</sup> Ulrike P. et coll., 2001. *Ame.J. Epidemiol.*, 142, 495-503.

<sup>46</sup> Thelle DS., 1995. *Curr. Opin Lipidol*, 6, 25-27.

<sup>47</sup> Stensvol I. et coll., 1992. *Prev. Med.*, 21, 546-553.

<sup>48</sup> Riemersma R. A. et coll. 2001. *The Lancet*, 357, 2136-2137.

<sup>49</sup> Hamer M., 2007. *Nutr. Res.*, 27, 373-379.

<sup>50</sup> Tankred S., Yvonne S., Helmut S., 2008. *Arch. Biochem. Biophys.*, 476, 102-106

<sup>51</sup> Kuzuhara T., et coll., 2008. *Cancer Lett.*, 261, 12-20

<sup>52</sup> Santosh K. Katiyar, et coll., 2000. *Arch. Dermatol*, 136, 989-994.

<sup>53</sup> Chung S., Yang, Zhi-Yuan Wang, 1993. *J. Natl Cancer I*, 85, 1038- 1049.

<sup>54</sup> Vaqar M. A., Mukhhtar H., 2006. *Free Radical Res.*, 40, 1095-1104.

<sup>55</sup> Hirota Fujiki, 2005. *Chem. Rec.*, 5, 119-132.

<sup>56</sup> Emma C. Stuart et coll., 2006. *Life Sci.*, 79, 2329-2336.

<sup>57</sup> Hirota Fujiki et coll., 2002. *Cancer Lett.*, 188, 9-13.

Le gallate d'épigallocatechine-3 (EGCG), est un catéchol qui bloque l'enzyme l'urokinase. Or cette enzyme est produite en quantité importante par la cellule. L'inhibition de l'urokinase par l'EGCG empêche la tumeur de produire des métastases.

On sait que les crèmes solaires protègent contre les coups du soleil, mais pas contre les modifications cellulaires pouvant entraîner le développement de mélanome. Les résultats de laboratoire révèlent que l'application topique ou la consommation orale de l'EGCG inhibent la cancérogenèse provoquée par les radiations ultraviolettes.<sup>58</sup>

Ainsi les travaux de Wang et coll., montrent clairement une activité inhibitrice du thé vert sur les lésions cutanées dues aux rayons ultraviolet B induit chez les souris.<sup>59</sup> Le thé vert piège les radicaux libres, ce qui pourrait expliquer en partie ses effets préventifs dans la survenue de cancers.

#### **2-4-4 Activité antioxydante<sup>60,61,62</sup>**

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre des substances potentiellement dangereuses que l'on appelle radicaux libres. Le thé en est une source très importante notamment de flavonoïdes dont le rôle est la neutralisation des radicaux libre.

#### **2-4-5 Activité antimicrobienne<sup>30,63,64</sup>**

Des études scientifiques ont révélé que le thé vert a de puissants effets antimicrobiens sur les bactéries de la bouche, lesquelles sont communément incriminées dans la carie dentaire et le tartre.

#### **2-4-6 Activité cognitive<sup>65</sup>**

Le thé est un stimulant bien connu du système nerveux central. Cet effet, il le doit à la caféine, qui favorise aussi bien le travail intellectuel que l'effort musculaire.

---

<sup>58</sup> Hsu S., 2005. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 52, 1049- 1059.

<sup>59</sup> Wang ZY et coll., 1991. *Carcinogenesis*, 12, 1527-1530.

<sup>60</sup> Shengmin Sang et coll., 2005. *Antioxid. Redox Sign.*, 7, 1704-1714.

<sup>61</sup> Koketsu M., 1997. *Chemistry and Applications of Green Tea. CRC Press.* 37-50.

<sup>62</sup> Shu-jun Chen, 2002. *Tea Bioactivity and Therapeutic Potential. CRC Press.* 192-210.

<sup>63</sup> Kubo, I. et coll., 1992. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 245-248.

<sup>64</sup> Sakanaka S, 1997. *Chemistry and Applications of Green Tea. CRC Press.* 87-102.

<sup>65</sup> Kajimoto, G, 1993. *J. Nihon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 10, 365-369.

### 2-4-7 Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer<sup>66,67</sup>

Plusieurs chercheurs ont commencé à s'intéresser aux propriétés du thé vert à la suite d'études épidémiologiques montrant que des personnes qui consommaient plus de trois tasses par jour avaient moins de risque de développer les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Des études *in vivo* ont montré que l'accumulation d'une grande concentration de fer dans le cerveau est parmi les causes des maladies neurodégénératives. Une attention particulière a été portée sur l'étude des catéchine du thé vert et en particulier sur l'épigallocatechine-3-gallate qui possède une capacité antioxydante remarquable ainsi que la propriété de chélater les ions du fer.

### 2-4-8 Toxicité<sup>68</sup>

La consommation régulière du thé, sous forme d'infusion ou de décoction, comme c'est le cas dans les populations sahariennes, peut créer une intoxication chronique et le théisme qui se manifestent par de l'insomnie, de l'anorexie, de la perte de poids, de la constipation et des troubles nerveux.

## 2-5 Usage traditionnel et industriel de thé vert

**Usage traditionnel :** le thé vert est apprécié partout par le monde comme diurétique, tonique, antidiarrhéique. Les montagnards le prennent parfois sous forme d'infusion, fortement sucré comme défatigant, au cours d'une longue marche.

En usage externe, la poudre de thé est utilisée comme cicatrisant dans la plaie ouverte, dans les affections oculaires.

Au Maroc, on consomme exclusivement le thé vert qui est la boisson nationale, par excellence ; c'est une infusion sucrée de thé vert à la menthe très concentrée au Sahara, légère dans la moyen Atlas – et parfumée parfois par diverses plantes.<sup>1</sup>

**Usage industriel :** l'industrie agroalimentaire est la source de débouché traditionnel du thé. Qu'il soit consommé, froid, chaud, en sachet ou en vrac, elle représente la majeure partie des ventes du thé au monde.

Des industriels tels que Signal s'intéressent aujourd'hui à la teneur en fluor du thé pour la prévention des caries et le renforcement de l'émail des dents. On outre la consommation de thé vert pourrait, selon de récentes recherches, réduire les risques de cancers, notamment de la

---

<sup>66</sup> Weinreb O et coll, 2004. *J. Nutr. Biochem.*,15, 506-516.

<sup>67</sup>Yukiaki Kuroda & Yukihiro Hara, 2004. Health Effects of tea and its catechins. *Springer*. 55-57.

<sup>68</sup> Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 177-182.

peau, du poumon. Toutefois, le thé s'est ouvert récemment à de nouveaux débouchés, notamment l'industrie pharmaceutique et celles des cosmétiques.

**Références Bibliographiques**

- [1] Bellakhdar J, 1997. *Ibis press* 37 N: pp 20.
- [2] Pei-gen Xiao & Zhen-yu Li, 2002. Tea Bioactivity and Therapeutic Potentiel. *CRC Press*. 17-34.
- [3] Graham H.N, 1992. *Prev. Med.*, 21, 334-350.
- [4] Ning Xu & Zong-mao Chen. 2002. Tea Bioactivity and Therapeutic Potentiel. *CRC Press*. 35-56.
- [5] Monograph. Green tea, 2000. *Alternative Medecine Review* ,5, 372- 375.
- [6] Delmas, F.-X. & Minet, M. (2007). *Le guide de dégustation de l'amateur de thé*. Les éditions du Chêne, Paris, 239 p.
- [7] Laurens A., Leboeuf M., Cavé A., 1998. Les surprenantes vertus du thé vert. *La recherche* ,308, 54-57.
- [8] Banerjee B., Chaudhuri T.C., 2005. Therapeutic effects of tea. *Science Publisher*. 23-28.
- [9] Zong-mao Chen, Hua-fu Wang, Xiao-qing You, Ning Xu, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 57- 88.
- [10] Hua-fu Wang, Xiao-qing You, Zong-mao Chen., 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 89-130.
- [11] Chu D-C., Juneja L.R, 1997. Chemistry and Application of Green tea. *CRC Press*, 13-22.
- [12] Landau J. M., Lambert J. D., Yang C.S., 2006. *Nutritional Oncology (Second Edition)*, 597-606.
- [13] Pastore R. L., Fratellone P., 2006. *EXPLORE: J. Science and Healing*, 2,531-539.
- [14] Ozercan I. H. , Sahin N., Akdemir F., Onderci M., Seren S., Sahin K., Kucuk O., 2008. *Nutr. Res.*, 28, 92-97.
- [15] Dufresne C. J., Farnworth E.R., 2001. *J. Nutr. Biochem.*, 12, 404-421.
- [16] Gramza A. & Korczak J. , 2005. *Trends Food Sci. Tech.*,16, 351-358.
- [17] Keith R. P., Rhodes M. J. C., Barnes K. A., 1998. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2517-2522.
- [18] Peterson J., Dwyer J. Bhagwat S. Haytowitz D., Holden J., Eldridge A.L., Beecher G. Aladesanmi J., 2005. *J. Food Compos. Anal.*,18, 487-501.
- [19] Finger A., Engelhardt U. H., Wray V., 1991. *J. Sci. Food Agric.*, 55, 313-321.
- [20] Yukihiko Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 11-16.
- [21] Coimbra S., Castro E., Rocha- Perira P., Rebelo I., Rocha S., Santos- Silva A. 2006. *Clin. Nutr.*, 25, 790-796.

- [22] McKay D. L., & Blumberg J. B., 2002. *J. Am. Coll. Nutrition.*, 21,1–13 .
- [23] Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 26-40.
- [24] Yukihiro Hara & Yukihiro Hara, 2004. Health Effects of tea and its catechins. *Springer* 28-30.
- [25] Thiraviam Geeth, Amita Garg, Kanwaljit Chopra, Indu Pal Kaur, 2004. *Mutation Research*, 556, 65-74.
- [26] Pei-Fang Hung, Bo-Tsung Wu, Hui-Chian Chen, Yen-Hang Chen, Chia-Lin Chen, Ming-Hua Wu, Hsien-Chun Liu, Meng-Jung Lee, and Yung-Hsi Kao, 2005. *American J Physiol Cell Physiol*, 288, C1094–C1108.
- [27] Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 91-111.
- [28] Tajima K, Tominaga S. 1985. *Cancer Res.*, 76, 705– 716.
- [29] Yukihiro Hara & Yukihiro Hara, 2004. Health Effects of tea and its catechins. *Springer* 24-28.
- [30] Mukhtar H., Nihal A., 2000. *Am. Clin. Nutr.*, 71, 1698S-1702S.
- [31] Yong-Su Zhen, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 211-242.
- [32] Yun- Hsi Kao, Hsin-Huei Chang, Meng-Jung Lee, Chia-Lin Chen, 2006. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 188-210.
- [33] Yukihiro Hara, 2001. Green tea. Health Benefit and Applications. *CRC Press*. 129-139.
- [34] Chiseko Noda, Jinsong He, Tomoko Takano, Chisato Tanaka, Toshinori Kondo, Kaoru Tohyama, Hirohei Yamamura, Yumi Tohyama, 2007. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 362, 951-957.
- [35] Emma C. Stuart, Rhonda J. Rosengren, 2008. *Life Sci.*, 82, 943-948.
- [36] Tsung O. Cheng, 2006. *Inter. J Cardiol.*, 108, 301-308.
- [37] Hamilton-Miller J.M.T, 1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 2375-2377.
- [38] Pei-Zhen Tao, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 169-210.
- [39] Nurulain T.Zaveri, 2006. *Life Sci.*, 78, 2073-2080.
- [40] Roy D.K, Nag Chandhuri A.K., Sen T, 2005. Therapeutic effects of tea. *Science Publisher*. 29- 48.
- [41] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. *Free Radical Bio. Med.*, 20, 933-956.
- [42] Kazuo Mukai, Souichi Nagai, Keishi Ohara, 2005. *Free Radical Bio. Med.*, 38, 1243-1256.
- [43] Lotito S. B., Fraga C.G., 1997. *Free Radical Bio. Med.*, 24, 435-441.
- [44] Zong-mao Chen, 2002. Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 151-168.

- [45] Ulrike Peters, Charles Poole, Lenore Arab1, 2001. *Am. J. Epidemiol.*,142, 495-503.
- [46] Thelle DS. 1995. *Curr. Opin Lipidol* ,6, 25-27.
- [47] Stensvol I, Tverdal A ,Solvoll K. Per Foss O., 1992. *Prev. Med.*, 21,546-553.
- [48] Riemersma R. A. , Carruthers K. F. , Elton R. A., Fox K. A. A. 2001. *The Lancet*, 357, 2136-2137.
- [49] Hamer M., 2007. *Nutr. Res.*, 27, 373-379.
- [50] Tankred S., Yvonne S., Helmut S., 2008. *Arch. Biochem. Biophys.*, 476, 102-106.
- [51] Takashi Kuzuhara, Masami Suganuma, Hirota Fujiki 2008. *Cancer Letters*, 261, 12-20.
- [52] Santosh K K., Nihal A., Hassan M., 2000. *Arch. Dermatol.*,136, 989-994.
- [53] Chung S. Yang, Zhi-Yuan Wang, 1993. *J. Natl Cancer I.* ,85, 1038- 1049.
- [54] Vaqar M. A., Mukhtar H., 2006. *Free Radical Res.*,40, 1095-1104.
- [55] Hirota Fujiki, 2005. *Chem. Rec.*, 5, 119-132.
- [56] Emma C. Stuart, Marissa J. Scandlyn, Rhonda J. Rosengren, 2006. *Life Sci.*,79, 2329-2336.
- [57] Hirota Fujiki, Masami Suganuma, Kazue Imai, Kei Nakachi, 2002. *Cancer Lett.*, 188, 9-13.
- [58] Hsu S., 2005. *Am. Acad. Dermatol.*,52, 1049- 1059.
- [59] Wang ZY., Agarwal R, Bickers DR., Mukhtar H., 1991. *Carcinogenesis* ,12, 1527-1530.
- [60] Shengmin Sang, Zhe Hou, Joshua D. Lambert, Chung S. Yang, 2005. *Antioxid. Redox Sign.*,7,1704-1714.
- [61] Koketsu M., 1997. *Chemistry and Applications of Green tea. CRC Press* ,37-50.
- [62] Shu-jun Chen, 2002. *Tea Bioactivity and Therapeutic Potential. CRC Press.* 192-210.
- [63] Kubo I., Muroi H., M. Himejima 1992. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 245-248.
- [64] Sakanaka S., 1997. *Chemistry and Applications of Green Tea. CRC Press.* 87-102.
- [65] KajimotoG .,1993. *J. Nihon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* ,10,, 365-369.
- [66] Weinreb O., Mandel S., Amit Tamar, Youdim M., B., H.,2004.*J. Nutr. Biochem.*,15, 506-516.
- [67]Yukiaki Kuroda & Yukihiro Hara, 2004. *Health Effects of tea and its catechins. Springer.* 55-57.
- [68] Yukihiro Hara, 2001. *Green tea. Health Benefit and Applications. CRC Press.* 177-182.

## **DEUXIEME PARTIE**

**Interactions de Polyphénols de l'alimentation avec  
les Ions du Fer et du Cuivre, conséquences sur leur  
oxydation à l'air et sur leur pouvoir antioxydant**

---

*CHAPITRE 1*  
*Matériels & Méthodes*

---

**I- 1 Réactifs**

L'ensemble des réactifs utilisés lors des expériences est rassemblé dans le tableau 1.

**Tableau 1. Réactifs utilisés**

	Réactif	Pureté %	Fournisseur
Polyphénol	-Quercétine dihydrate	98	Aldrich (Allemagne)
	-(+)-Rutine hydrate	95	Aldrich (USA)
	-(+) Catéchine hydrate	+96	Fluka (Indonésie)
	-Acide gallique monohydrate	+98	Sigma-Aldrich (USA)
	-Acide caféique	97	Aldrich (Allemagne)
Ions du cuivre et du fer	-CuCl	99,9	Aldrich (USA)
	-CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	99,90	Aldrich (USA)
	-FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	99	Aldrich (USA)
	-Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	99,99	Aldrich (USA)
Indicateur coloré	-xylénol orange (sel de sodium)	-	Sigma-Aldrich (USA)
	-butylhydroxytoluène(BHT)	97	Aldrich (Allemagne)
	-ferrozine (5,6-diphényl-3-(2-pyridyl)- 1,2,4 triazine-4',4''-disulfonate de sodium hydrate	-	Aldrich (Allemagne)
	-Disulfonate de bathocuproïne	-	Aldrich (Allemagne)
	Tampon phosphate	-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	99
	-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	99.5	Fluka (Indonésie)
Autres	-Acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA, sel de disodium dihydrate)	99	Normapur (France) Sigma (Allemagne)
	-Acide linoléique	-	Aldrich (Allemagne)
	-Tween 20 (polyoxyéthylène sorbitan monolaurate)*	-	Riedl-de Haen (Allemagne)
	-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% en poids	-	Aldrich (Allemagne)
	-MeOH, MeCN	UV-Vis Analyses	

\* tensioactif non ionique

## I -2 Analyses

Toutes les expériences ont été réalisées à 37°C.

### I-2-1 Complexation , oxydation et activité antioxydante

La complexation, l'oxydation et le pouvoir antioxydant du polyphénol sélectionné ont été suivis par spectroscopie UV-Visible (HP 8453 à barrettes diodes). La température dans la cellule a été maintenue à 37°C au moyen d'un bain thermostaté. Les solutions d'ion métallique ( $5 \times 10^{-3}$  M) ont été préparées dans MeOH ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ), MeOH/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 M (96/4) ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) et MeCN/HCl 0,2M (96/4) ( $\text{Cu}^{\text{I}}$ ).

Dans 2 ml de tampon phosphate à pH 7,4 placés dans la cellule du spectrophotomètre sont ajoutées 20  $\mu\text{L}$  d'une solution  $5 \times 10^{-3}$  M fraîchement préparée de polyphénol. La complexation et l'oxydation sont suivies dans le temps (mode cinétique) après addition d'un petit volume (10-100  $\mu\text{L}$ ) d'une solution  $5 \times 10^{-3}$  M d'ion métallique (rapport molaire métal/polyphénol = 0.5 à 5). Avec la quercétine, l'influence de l'ordre d'addition des réactifs a été étudiée. Dans certains cas, l'influence de l'addition de 50  $\mu\text{l}$  d'une solution (0,02 M) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon_{(\text{exp.})}(\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 30\%}) = 40,06 \text{ mol/cm}$ , calculée à 240 nm) juste avant l'addition d'ion métallique a également été étudiée.

Les spectres UV-visible sont enregistrés durant 1-2 min pour la complexation et jusqu'à 120 min pour l'autoxydation.

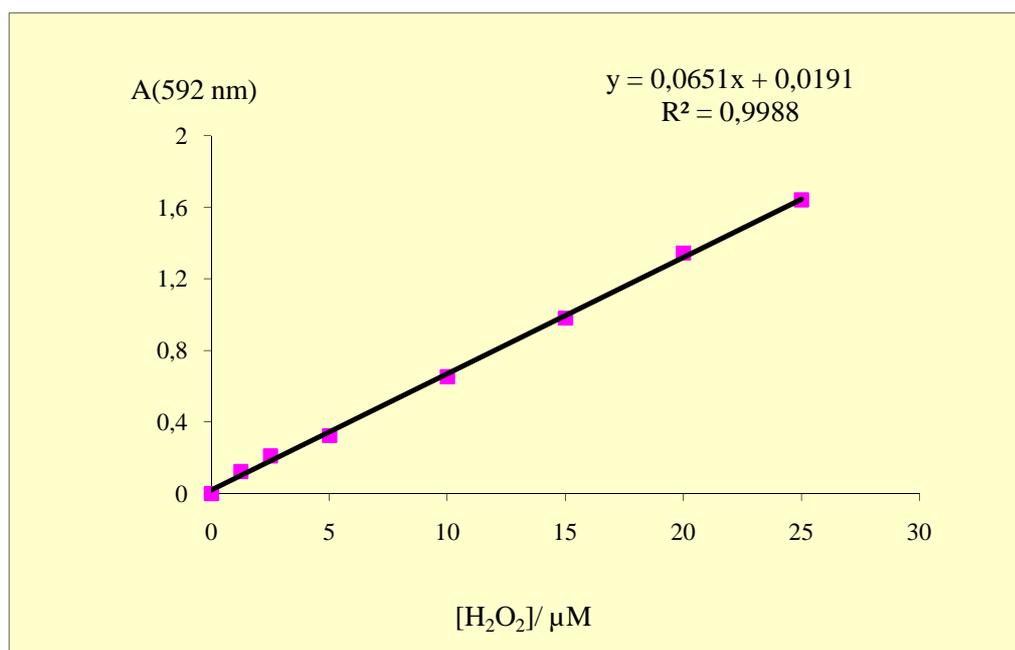
Dans les mêmes conditions, la complexation des ions du fer par la quercétine a également été étudiée à pH 5 sur une période de 10 min ainsi que l'oxydation des polyphénols par  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en milieu fortement acide (pH 1.4).

### I-2-2 Dosage de $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>1</sup>

Le réactif FOX2 a été préparé en mélangeant une solution de 19 mg xylénol orange et de 220 mg BHT dans 225 ml MeOH à une solution de 24,5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  dans 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,25 M). Un volume de 0,5 ml d'une solution  $10^{-4}$  M de polyphénol dans le tampon à pH 7,4 en présence ou absence d'ion métallique (1 équiv.) est rapidement prélevé, dilué dans 1,5 ml de réactif FOX2 à température ambiante et agité pendant 10 min. Le spectre UV-visible est enregistré afin de mesurer l'absorbance à 592 nm ( $\epsilon(\text{Fe}^{\text{III}}\text{-xylénol orange}) = 65 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

---

<sup>1</sup> Sodergren E et coll., 1998. *J Biochem. Biophys. Methods*, 37, 137–146.



**Figure 1.** Courbe d'étalonnage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### I-2-3 Dosage de Fe<sup>II</sup> <sup>2</sup>

Un volume de 0,5 ml d'une solution 10<sup>-4</sup> M de polyphénol dans le tampon phosphate en présence de Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup> est rapidement prélevé, dilué dans 1,5 ml d'une solution de ferrozine 10<sup>-3</sup> M à température ambiante et agité pendant 10 min. Le spectre UV-visible est ensuite enregistré afin de mesurer l'absorbance à 564 nm ( $\epsilon(\text{Fe}^{\text{II}}\text{-ferrozine}) = 27900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### I-2-4 Dosage de Cu<sup>I</sup> <sup>3</sup>

Un volume de 0,5 ml d'une solution 10<sup>-4</sup> M de polyphénol dans le tampon phosphate en présence de Cu<sup>II</sup> ou Cu<sup>I</sup> est rapidement prélevé, dilué dans 1,5 ml d'une solution 5.10<sup>-4</sup> M de disulfonate de bathocuproïne à température ambiante et agité pendant 10 min. Les échantillons sont alors transférés dans la cellule du spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance à 480 nm ( $\epsilon(\text{Cu}^{\text{I}}\text{-bathocuproïne}) = 13900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### I-2-5 Procédures d'ajustement de courbes (*curve fitting*)

Le traitement des courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction du temps (détermination de constantes de vitesse) ou de la concentration d'ion métallique (détermination de constantes thermodynamiques de complexation) a été réalisé sur un PC à

<sup>2</sup> Welch KD et coll., 2002. *Arch Biochem Biophys*, 397, 360–369

<sup>3</sup> Midorikawa K et coll., 2004. *Chem Biol Int*, 150, 271–281

l'aide du programme *Scientis* (MicroMath, Salt Lake City, USA) après implémentation dans les modèles des équations adéquates déduites de la loi de Beer-Lambert, de la loi d'action de masse et des lois de conservation de la matière (constantes de complexation) ou des lois de la cinétique chimique (constantes de vitesse). Dans ce dernier cas, il s'agit donc d'un ensemble d'équations différentielles dont les conditions initiales sur les concentrations sont précisées. Les courbes théoriques sont ajustées aux courbes expérimentales par régression non-linéaire selon la méthode des moindres carrés. Les écarts-types sur les paramètres à optimiser (constantes de vitesse, constante d'association, coefficients d'absorption molaires voire stoechiométrie) sont aussi rapportés.

### I- 2-6 Analyses CLHP-SM

Elles ont été effectuées sur un appareil Hewlett-Packard 1100 équipé d'une colonne de silice RP-18 (Purospher star, 4.6 ×150 mm, 5µm ) et couplé d'une part à un détecteur à barrettes de diodes et d'autre part à un spectromètre de masse Micromass Platform utilisé en mode electrospray négatif (température de désolvation = 80°C, débit d'azote = 300 L/h, tension = 25 V). Le solvant d'élution (débit = 1 mL/min) est un mélange d'une solution aqueuse à 0,5% d'acide formique (A) et d'acétonitrile(B) dont la composition est précisée dans le Tableau 2. La solution à injecter (20 µL) est préalablement filtrée à travers une membrane Whatman 0,45. La détection est typiquement effectuée à 280 nm.

**Tableau 2.** Gradient d'élution pour l'analyse CLHP-SM

Temps (min)	A (%)	B (%)
0.0	99,0	1,0
20.00	40,0	60,0
40.00	0,0	100,0
50.00	0,0	100,0
51.00	99	1

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel Masslynx version 3.4.

**I-2-7 Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par les polyphénols**

Les hydroperoxydes de l'acide linoléique sont détectés à 234 nm, longueur d'onde d'absorption du groupement diène conjugué. Le blanc est réalisé avec 2 ml de solution de Tween (1,22 M) dans le tampon phosphate (pH 7.4).

Dans la cuve, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide linoléique 0,2 M dans MeOH sont introduits dans 2 ml de la solution de Tween 20 1,22 mM dans le tampon phosphate 0,01 M (pH 7.4) agité à 37°C. Dans ces conditions, l'acide linoléique est parfaitement solubilisé.

Après 2 min d'agitation, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse 0.5 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (calibration en utilisant  $\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 240 nm) puis 20  $\mu\text{L}$  d'une solution 5 mM de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans MeOH sont ajoutés successivement. Les concentrations totales de réactifs dans la cuve sont donc: acide linoléique (LH) = 2 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 5 mM,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  = 50  $\mu\text{M}$

Après 1500 à 1700 secondes, un petit volume (10-80  $\mu\text{L}$ ) d'une solution 50 mM d'antioxydant dans MeOH est additionné. L'acquisition est poursuivie pour une durée totale de 4000 s. La vitesse de peroxydation lipidique est calculée en mesurant la pente de la droite A(234 nm) en fonction du temps. De 1300 à 1700 secondes, on détermine la vitesse initiale (non inhibée) de peroxydation lipidique et à partir de 1800 s secondes jusqu'au 2500 s, on détermine la vitesse de peroxydation inhibée par l'antioxydant. Les antioxydants testés sont la quercétine, la rutine, la catéchine, l'acide gallique et l'acide caféique.

### Références bibliographiques

- [1] Sodergren E., Nourooz-Zadeh J., Berglund L., Vessby B., 1998. *J Biochem Biophys Methods* (37) 137–146.
- [2] Welch KD., Davis TZ., Aust SD., 2002. *Arch Biochem Biophys* (397) 360–369.
- [3] Midorikawa K., Uchida T., Okamoto Y., Toda C., Sakai Y., Ueda K., Hiraku Y., Murata M., Kawanishi S., Kojima N., 2004. *Chem Biol Int* (150) 271–281.

## **Chapitre 2. Interactions de polyphénols avec des ions du Cuivre et du Fer : Complexation et Oxydation**

**Résumé** – L'interaction des polyphénols avec les ions des métaux de transition d'importance biologique (fer, cuivre) est un phénomène aux répercussions multiples. Ces interactions peuvent maintenir une partie de leur activité antioxydante par l'intermédiaire de formation des complexes inactifs. On outre, les ions du fer et du cuivre sont susceptibles d'amorcer l'oxydation à l'air des polyphénols. Ce processus d'autoxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique et du polyphénol, la température, le pH, la présence d'agents complexants....

Au cours ce travail, nous avons étudié la capacité de certains polyphénols très communs et représentatifs des différentes classes (quercétine, rutine, catéchine, acide gallique et acide caféique) à chélater les ions du fer et du cuivre dans un tampon phosphate neutre et l'influence de ce phénomène sur leur stabilité (autoxydation).

Les suivis cinétiques par spectroscopie UV-visible permettent, en particulier, de déterminer les valeurs des constantes de vitesse de formation des complexes et des constantes de vitesse apparentes d'autoxydation. Les complexes polyphénols-cuivre sont beaucoup plus réactifs en présence de O<sub>2</sub> que leurs homologues polyphénols-fer.

Les principaux produits d'oxydation des polyphénols sont identifiés et caractérisés par CLHP-SM. L'autoxydation du Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup> est rapide dans le tampon phosphate neutre en présence ou en absence de polyphénols. En revanche, les polyphénols permettent le maintien du cuivre au degré d'oxydation I. Le peroxyde d'hydrogène accumulé a été dosé. La rutine a démontré une forte stabilité par rapport aux autres polyphénols étudiés. Enfin dans des conditions fortement acides (pH 1-2), l'oxydation de la quercétine est rapide en présence de Fe<sup>3+</sup> sans participation de O<sub>2</sub>. La complexation n'a pas lieu dans ces conditions

---

## CHAPITRE 2-1 Généralités

---

### 2-1-1 Les métaux de transition

Ils constituent une grande famille d'éléments chimiques ayant chacun des propriétés spécifiques en fonction de la structure électronique de leur sous-couche d incomplète (configuration  $nd^x$  avec  $n = 3, 4, 5$  et  $x$  compris entre 1 et 9). Les métaux de transition sont de bons réducteurs et forment facilement des ions par perte d'un ou plusieurs électrons. Ils possèdent plusieurs degrés d'oxydation stables, Les métaux de transition et leurs cations sont susceptibles de former des complexes de coordination avec une grande variété de ligands organiques et inorganiques. Par exemple, le dioxygène peut entrer dans le système de coordination du métal (M) et ainsi former des complexes tels que  $M^{n+} - O_2$  ou  $M^{n+} - O_2 - M^{n+}$  ou encore  $M^{n+} = O$  après clivage de la liaison O–O. Ces types de complexes interviennent dans le cycle catalytique de nombreuses métalloenzymes (oxydases, oxygénases).

Dans ce chapitre, seul le fer et le cuivre seront étudiés. En effet, ils possèdent une réactivité propre, et par rapport aux autres métaux de transition, ils sont présents dans les systèmes biologiques en quantité non négligeable. Impliqués dans la réaction de Fenton, ils peuvent induire des pathologies liées à la production d'espèces réactives de l'oxygène.<sup>1</sup>

### 2-1-2 Régulation du fer et du cuivre dans les cellules

#### • Fer

L'organisme d'un humain adulte possède 4 g de fer dont environ 2/3 sous forme d'hémoglobine (transport de  $O_2$  dans le sang). Dix pourcents supplémentaires sont sous forme de myoglobine (transport de  $O_2$  dans les muscles) et une faible quantité dans plusieurs enzymes contenant du fer (Ex. : les monoxygénases à cytochromes P450).

Le fer existe dans l'alimentation sous la forme oxydée  $Fe^{III}$ . L'acide chlorhydrique sécrété par la paroi de l'estomac permet sa solubilisation et la vitamine C et/ou les polyphénols de l'alimentation réduisent une partie du  $Fe^{III}$  en  $Fe^{II}$  et facilitent son absorption.

Ils existent des maladies impliquant des anomalies du métabolisme de fer. En dessous du taux optimal, il y a risque d'anémie et au dessus risque de stress oxydant.

---

<sup>1</sup> Miller D. M. et coll., 1990. *Free Radical Biol. Med.*,8, 95-108.

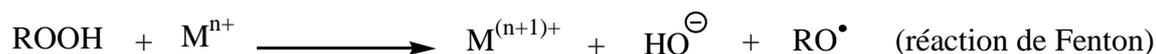
### • Cuivre

Le cuivre est largement distribué dans la nature et est un élément essentiel à la vie. Le corps humain adulte en contient 80 mg. Il est absorbé au niveau de l'estomac et de la partie supérieure de l'intestin grêle, probablement sous forme de complexe avec des acides aminés tels que l'histidine. Ces complexes du cuivre entrent dans le sang et la plupart du cuivre se lie fortement à l'albumine du sérum tandis que le reste est stocké. Dans le foie par exemple, le cuivre est incorporé dans la céruloplasmine, une glycoprotéine. On ne peut pas exclure la possibilité que les ions du cuivre, même sous forme liée, participent à la production des radicaux hydroxyles (réaction de Fenton). Ces derniers, très réactifs, réagissent aussitôt avec le ligand (protéine) et demeureront indétectables en solution.

L'ingestion du sulfate de cuivre ou d'autres sels de cuivre est une cause d'empoisonnement aigu. Une conséquence caractéristique de cette surcharge de cuivre est la nécrose hépatique. Le cuivre, comme le fer joue un rôle de catalyseur ou d'initiateur dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que dans la peroxydation des lipides insaturés des membranes et des lipoprotéines. Il est aussi considéré comme un agent mutagène potentiel.

### 2-1-3 Interaction des polyphénols par des métaux de transition d'importance biologique (Fe, Cu)

Le fer et le cuivre sont des métaux d'importance biologique impliqués dans de nombreux phénomènes de transport (dioxygène) et de transfert d'électron. En général fortement complexés à des protéines de transport ou de stockage (transferrine, ferritine, hémossidérine) et à des enzymes (cytochromes, peroxydases, superoxyde dismutase, catalases, ...), ils pourraient exister sous forme « libre » (faiblement complexée) à l'état de traces et participer alors au « stress oxydant », par production des radicaux oxygénés toxiques.<sup>2,3,4,5</sup>



R= H, lipide polyinsaturé

<sup>2</sup> Halliwell B., Gutteridge J.M.C, 1990. *Method. Enzymol.*, 186, 1-85.

<sup>3</sup> Kaneda I, et coll., 2007. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 21, 43-51.

<sup>4</sup> Mancuso J. R. et coll., 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 213-219.

<sup>5</sup> Wigand M.C. et coll., 1992. *Phytochemistry*, 31, 4317-4324.

L'interaction des polyphénols avec les métaux de transition joue un rôle important dans les propriétés antioxydantes des polyphénols.<sup>6</sup> En effet, une voie majeure de production des EOR consiste en la réduction du dioxygène par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (complexe labiles en faible concentration) avec la formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et en la production de radicaux oxyde par coupure réductrice d'hydroperoxydes par ces mêmes ions (réaction de Fenton). La formation de complexes métalliques stables et inertes (bloquant l'ion métallique sous un état redox donné) constitue un mécanisme potentiel d'action antioxydante. Pour ce qui concerne les flavonoïdes, il semblerait que l'importance de ce mécanisme dépende étroitement de la cible à protéger. En comparaison de l'activité antioxydante par capture des EOR, il serait mineur dans l'inhibition de la peroxydation lipidique mais dominant dans l'inhibition de coupures oxydantes de brins d'ADN.

Dans l'organisme, on ne connaît pas de mécanismes susceptibles d'éliminer directement un excès de fer ou de cuivre. La seule méthode pour prévenir une surcharge excessive de fer ou de cuivre dans l'organisme est de mettre en place une thérapie de complexation des métaux de transition. A titre d'exemple, on peut citer l'acide phytique qui est un fort complexant naturel du fer qu'on retrouve notamment dans les céréales et le pain complet. Pour ces raisons, il peut être intéressant de disposer de complexants spécifiques des métaux de transition d'où l'importance de la consommation des aliments riches en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes.

Sur le plan nutritionnel, il est à noter que la complexation des ions du fer par les polyphénols place le fer sous une forme non biodisponible (complexes non absorbables dans le tractus digestif). Il s'agit donc d'un effet antinutritionnel, particulièrement significatif pour les populations des pays en voie de développement dont l'alimentation est relativement pauvre en fer.

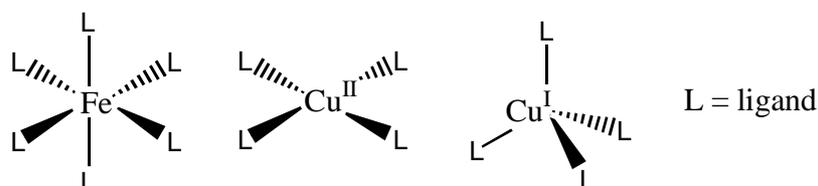
Enfin, l'interaction des ions métalliques et des polyphénols (anthocyanes présentant une substitution 1,2-dihydroxy sur le cycle B) est un mécanisme de variation des couleurs naturelles. La substitution des deux protons du noyau catéchol par l'ion métallique intervient à  $\text{pH} > 3$  et induit de forts déplacements bathochromes de la bande d'absorption du pigment dans le domaine visible. La présence d'un ion de métal de transition peut être nécessaire pour l'expression de la couleur bleue du fait d'un transfert de charge depuis l'anthocyane vers les orbitaux d partiellement occupés du centre métallique.

---

<sup>6</sup> Dangles O, 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier*, 29-54.

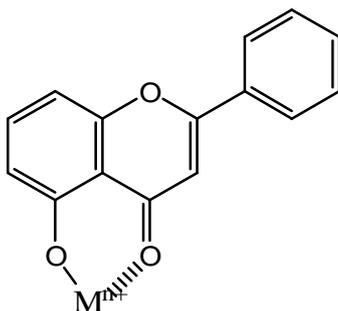
### 2-1-4 Données bibliographiques sur la complexation des flavonoïdes avec du fer et du cuivre

L'environnement des ions  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans les complexes est octaédrique (nombre de coordination = 6) tandis que les complexes du cuivre présentent un nombre de coordination de quatre dans un environnement tétraédrique ( $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) ou plan carré ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ).

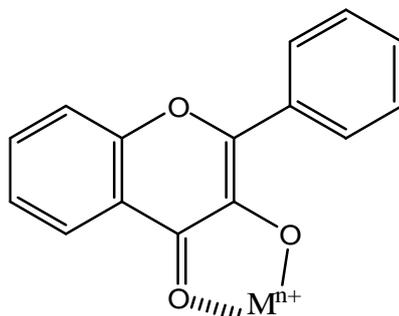


D'un point de vue structural, les flavonoïdes ont plusieurs sites potentiels de complexation métallique:

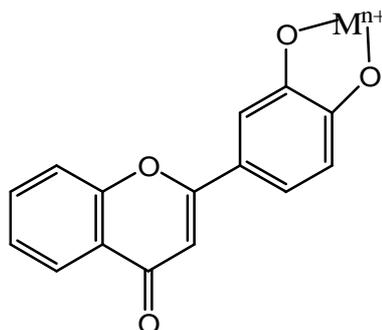
- Les 5-hydroxyflavones peuvent chélater les ions métalliques grâce au groupement 5- hydroxy-4-carbonyle pour donner un chélate à six centres.



- Les 3-hydroxyflavones forment avec les ions métalliques un complexe à cinq centres grâce au groupement 3- hydroxy-4-carbonyle.



- Les 3',4'-dihydroxyflavones chélatent les ions métalliques par l'intermédiaire de leur groupement ortho-dihydroxybenzène (catéchol) présent sur le cycle B.



Dans le cas plus compliqué d'un flavonoïde possédant simultanément plusieurs sites de complexation, la structure et la stoechiométrie des complexes varient en fonction des conditions d'acidité et de solvant.

Plusieurs travaux ont mis en évidence que les propriétés réductrices des polyphénols et leur capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, notamment le fer et le cuivre, peuvent moduler divers processus d'importance biologique faisant intervenir l'état redox de l'ion métallique. Les interactions des ions du cuivre et du fer avec les polyphénols, et plus particulièrement avec les flavonoïdes, sont souvent proposées comme l'un des mécanismes d'action antioxydante de ces produits naturels.<sup>7, 8, 9, 10, 11,12,13</sup> Par exemple, les flavonoïdes inhibent la peroxydation lipidique amorcée par  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Certaines études ont démontré que les complexes métalliques des flavonoïdes ont une activité antioxydante plus puissante que les flavonoïdes sous forme libre, en particulier pour la capture du radical-anion superoxyde.<sup>14,15,16</sup>

Cependant la complexation du cuivre ou du fer par les polyphénols entraîne l'inhibition de la peroxydation lipidique seulement si :

- Les complexes de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}$  sont inactifs dans la réaction de Fenton;
- Les complexes de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  sont assez stables pour prévenir une réduction ultérieure en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}$  susceptible de conduire à la réaction de Fenton.

Néanmoins, la complexation métallique des polyphénols et leur activité antioxydante ne vont pas nécessairement de pair. Il a été montré que la complexation métallique peut induire

<sup>7</sup> Van Acker S.A.B.E. et coll., 1996. *Free Radic.Biol. Med.*, 20, 331-342.

<sup>8</sup> Ferrali M., et coll., 1997. *FEBS Lett.*, 416, 123-129.

<sup>9</sup> Brown J.E. et coll., 1998. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.

<sup>10</sup> Jovanovic S.V et coll., 1998. *J. Chem. Soc. Perkin Transact. 2*, 11, 2365-2369.

<sup>11</sup> Paiva-Martins F., Gordon M.H., 2005. *J.Agric. Food Chem.*, 53, 2704-2709.

<sup>12</sup> Heim K.E. et coll., 2002. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572-584.

<sup>13</sup> Yoshino M., Murakami K., 1998. *Anal. Biochem.*, 257, 40-44.

<sup>14</sup> Kostyuk V. A. et coll., 2001. *Arch.Biochem. Biophys.*, 385, 129-137.

<sup>15</sup> Moridani M. Y et coll., 2003 *Free Radical. Biol. Med.*, 34, 243-253.

<sup>16</sup> Bravo A R. Anaconda J., 2001. *Transit. Metal Chem.*, 26, 20-23.

une activité pro-oxydante (production d'espèces oxygénées réactives) sous certaines conditions.<sup>12, 17, 18,19</sup>

La complexation métallique des flavonoïdes peut être étudiée par spectroscopie UV-visible. Les flavones et flavonols ont typiquement deux longueurs d'onde d'absorption maximale dans le domaine UV-visible. La première, dans l'intervalle 240-285 nm, est attribuée à la bande I du cycle A. La deuxième, dans l'intervalle 300-400 nm, est la bande II du cycle B. La bande I est due à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  du noyau A, tandis que la bande II est attribuée à un transfert de charge du noyau B vers le noyau C. La complexation des flavonoïdes par des ions métalliques provoque des déplacements bathochromes des deux bandes d'absorption. Il semble que ce comportement soit observé quel que soit le site de complexation (5-hydroxy-4-céto, 3-hydroxy-4-céto ou catéchol).

Etablir les mécanismes de la complexation des ions métalliques par les polyphénols permet de mieux comprendre la complexité de leurs propriétés pro- et antioxydantes. Par conséquent, de nombreux complexes métal-flavonoïde ont été synthétisés et caractérisés. Une grande variété de techniques analytiques (analyse élémentaire, potentiométrie, spectroscopies UV-visible et infrarouge, spectrométrie de masse, RMN de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) a permis d'évaluer les interactions des flavonoïdes avec les ions métalliques, les sites de complexation, la stabilité et la stoechiométrie des complexes formés, etc...

Les ions métalliques les plus étudiés sont  $\text{Al}^{\text{III}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$  et  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Toutefois, les données sur la structure et la stoechiométrie des complexes sont parfois incomplètes et contradictoires. En outre, les résultats dépendent étroitement des conditions expérimentales.

Une étude très complète de la complexation de la rutine et de la quercétine par différents ions métalliques dont  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a été réalisée par potentiométrie et spectroscopie UV-visible.<sup>20</sup> Les constantes de stabilité et stoechiométries des complexes ont été déduites. Les résultats montrent que la complexation de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par la quercétine et la rutine est plus forte que celle de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Pour  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , la complexation est de stoechiométrie 1:1 et concerne quasi-exclusivement le noyau catéchol (cycle B). D'une manière générale, les catéchols sont bien connus pour leur forte affinité pour  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Dans le cas de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , la complexation métallique est de stoechiométrie 1:1 voire 1:2. Comme pour  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , il y a participation du noyau catéchol.

Mira et coll. ont effectué une étude détaillée par spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse de la capacité de chélation des flavonoïdes par les ions du cuivre et du

<sup>17</sup> Labieniec M., Gabryelak, T., 2006. *Cell. Biol. Inter.*, 30, 761-768.

<sup>18</sup> Puppo A., 1992. *Phytochemistry*, 31, 85-88.

<sup>19</sup> Sakihama Y. et coll., 2002. *Toxicol.*, 177, 67-80.

<sup>20</sup> Escandar G.M., Sala L.F., 1991. *Can. J.Chem.*, 69, 1994-2001.

fer en fonction du pH.<sup>21</sup> En outre, la capacité de réduction par les flavonoïdes de Fe<sup>III</sup> et Cu<sup>II</sup> respectivement en Fe<sup>II</sup> et Cu<sup>I</sup> a également été étudiée. Les flavonoïdes sélectionnés pour cette étude sont: des flavones et flavonols (apigénine, lutéoline, kaempférol, quercétine, myricétine et rutine), des isoflavones (génistéine et daidzéine), des flavanones (taxifoline, naringénine et naringine) et un flavanol (catéchine). Tous ces flavonoïdes présentent une plus grande capacité à réduire Cu<sup>II</sup> que Fe<sup>III</sup>. Les résultats montrent que les flavonoïdes possédant à la fois des groupements catéchol (cycle B) et 3-hydroxyle, ainsi qu'une double liaison (C2,C3), réduisent mieux Fe<sup>III</sup> en Fe<sup>II</sup>. Il semble que la réduction du cuivre par les flavonoïdes dépende essentiellement du nombre de groupements hydroxyles. Seuls les flavones, les flavonols et la catéchine peuvent former des complexes avec les ions du fer et du cuivre dans le tampon d'acétate pH 5.5 et le tampon phosphate pH 7.4. Cependant, pour un pH compris entre 5,5 et 7,4, tous les flavonoïdes étudiés forment des complexes avec le cuivre sur le même site, le groupement 5-hydroxy-4-carbonyle. A pH 7,4, la complexation de la quercétine, de la myricétine et de la catéchine par Cu<sup>II</sup> implique le groupement catéchol du cycle B. De plus la quercétine et la myricétine sont les seuls flavonoïdes qui peuvent interagir fortement avec Fe<sup>III</sup> à pH 5,5. La complexation a lieu sur le site du groupement 5-hydroxy-4-carbonyle, ce qui pourrait être expliqué par la réduction préalable de Fe<sup>III</sup> en Fe<sup>II</sup>.

Sungur et Uzar<sup>22</sup> ont effectué récemment une étude par potentiométrie et spectroscopie UV-visible de la complexation de Fe<sup>III</sup> et Cu<sup>II</sup> par l'acide tannique et la myricétine. Ils en ont déduit la stoechiométrie des complexes ainsi que leur constante de stabilité. La myricétine et l'acide tannique ont une plus grande affinité pour Fe<sup>III</sup> que pour Cu<sup>II</sup>. La complexation de Fe<sup>III</sup> par l'acide tannique est de stoechiométrie 1:1 à pH < 3, 2:1 à pH compris entre 3 et 7 et 4:1 à pH > 7. Dans le cas de la myricétine, la complexation de Fe<sup>III</sup> est de stoechiométrie 1:2 à pH compris entre 4 et 5 et 1:1 à pH 6.

D'autres travaux ont été aussi rapportés sur la complexation métallique des acides phénoliques.<sup>23,24</sup> Par exemple, la capacité de complexation des ions du fer par les acides phénoliques a été quantifiée par Andjelkovic et coll.<sup>25</sup> dans le tampon tris à pH 7,4. Dans ces conditions, les acides vanillique, syringique et férulique ne complexent pas Fe<sup>III</sup> en raison de l'absence de groupement catéchol ou galloyl. En revanche, l'acide chlorogénique a une grande capacité à chélater Fe<sup>III</sup>.

<sup>21</sup> Mira L. et coll., 2002. *Free Radical. Res.*, 36, 1199–1208.

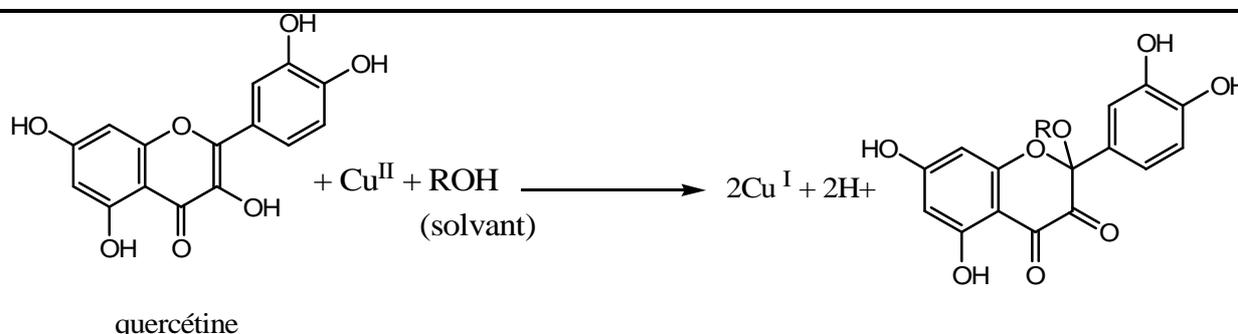
<sup>22</sup> Sungur S.A., Uzar A., 2008. *Spectrochimica Acta Part A*, 69, 225–229.

<sup>23</sup> Chvátalová K. et coll., 2008. *Food Chem.*, 106, 650-660.

<sup>24</sup> Hynes M.J., O'Coinceannainn M., 2004. *Inorg. Biochem.*, 98, 1457-1464.

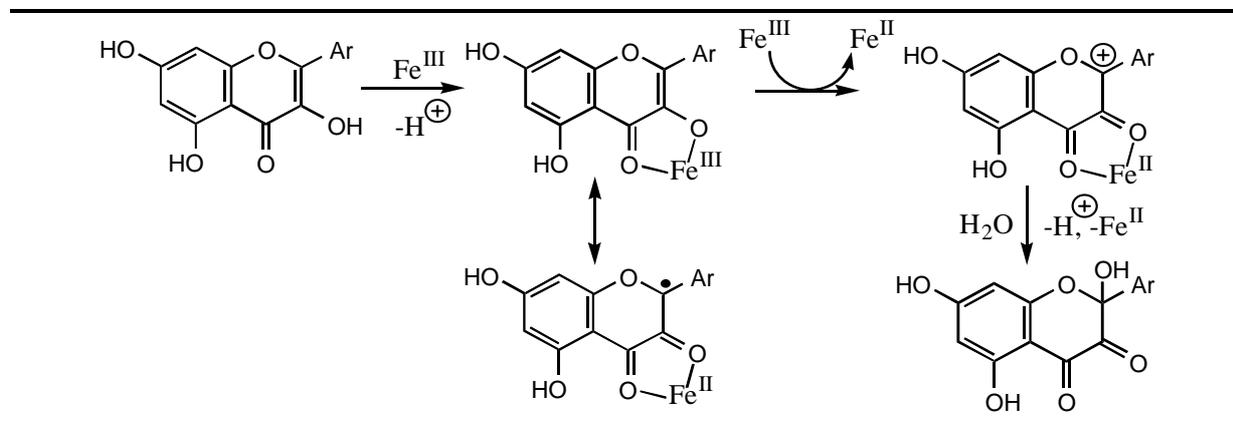
<sup>25</sup> Andjelkovic M. et coll., 2006. *Food Chem.*, 98, 23–31.

La complexation quercétine-Cu<sup>II</sup> s'accompagne d'une oxydation du ligand selon la réaction suivante:<sup>26,27</sup>



### Schéma 1

Dans le cas de complexation du Fe<sup>III</sup> par la quercétine ou la morine, les complexes formés (de stœchiométrie 1:1 ou 2:1) évoluent rapidement par transfert d'électron du ligand vers Fe<sup>III</sup> (Schéma 2 ).<sup>28</sup>



### Schéma 2

Il est très important de noter que l'oxydation des flavonoïdes au sein des complexes est fortement liée aux conditions expérimentales : nature de l'ion métallique, valeur du pH, nature du tampon, potentiel redox du ligand, coligands.

Actuellement, il est difficile de quantifier complexation et oxydation dans les matrices alimentaires (ex. : thé vert) et dans les échantillons biologiques (plasma). Cependant, est

<sup>26</sup> Utaka M., Takeda A., 1985. *J.Chem. Soc., Chem. Commun*, 24, 1824-1826.

<sup>27</sup> Guang-Ri Xu, et coll., 2007. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 28, 889-892.

<sup>28</sup> Ryan P., Hynes M.J., 2008. *J. Inorg. Biochem.*, 102, 127-136.

possible de mettre en évidence à la fois la complexation et l'autoxydation des flavonoïdes en présence des ions métalliques par CLHP couplée à la spectrométrie de masse.

Les ions du cuivre et du fer amorcent souvent l'oxydation des polyphénols. Par exemple, l'oxydation de la quercétine et du flavonol (3-hydroxyflavone) en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en solution alcoolique avec ou sans dioxygène a été rapportée.<sup>26</sup> Les produits d'oxydation proviennent de l'addition d'une molécule d'alcool en C2 d'un intermédiaire de type méthylènequinone correspondant au transfert de 2 électrons et 2 protons. Brown et *coll.* ont examiné les interactions des flavonoïdes avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans différents tampons.<sup>9</sup>

En milieu fortement acide, la complexation de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par les flavonoïdes n'a pas lieu en raison de la compétition défavorable avec les protons pour les sites oxygénés des ligands. Cependant, dans ces conditions,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est sous forme d'ion  $\text{Fe}^{3+}$  libre, ce qui maximise son pouvoir oxydant. Les flavonoïdes sont donc rapidement oxydés malgré l'absence de complexes intermédiaires.<sup>29</sup> Concernant les effets pro-oxydants des polyphénols en présence d'ions de métaux de transition, Il a été montré que certaines catéchines du thé vert en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans des conditions d'aérobies peuvent induire la dissociation de l'ADN,<sup>30</sup> et aussi accélérer la peroxydation des acides gras insaturés.<sup>30</sup>

En présence d'ion du cuivre, l'épigallocatechine-3-gallate (EGCg) et l'épigallocatechine (EGC) ont des effets pro-oxydants très différents malgré leurs potentiels redox très proches. En présence du  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , L'EGC possède une activité pro-oxydante plus puissante que EGCg à p H7.4, 37°C.<sup>30</sup> Cette différence est due principalement à leur capacité à chélater l'ion métallique pour former des complexes stables incapables de participer à la production des EOR. Dans plusieurs travaux, EGCg a montré une plus forte activité antioxydante que EGC, ce qui traduit la participation de l'unité galloyl. Sur la base des données de la littérature<sup>31,32</sup>, il semble que chaque ligand d'EGCg ou d'épicatéchine gallate (ECg) lie deux équivalents de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  selon le schéma suivant.<sup>33</sup>

---

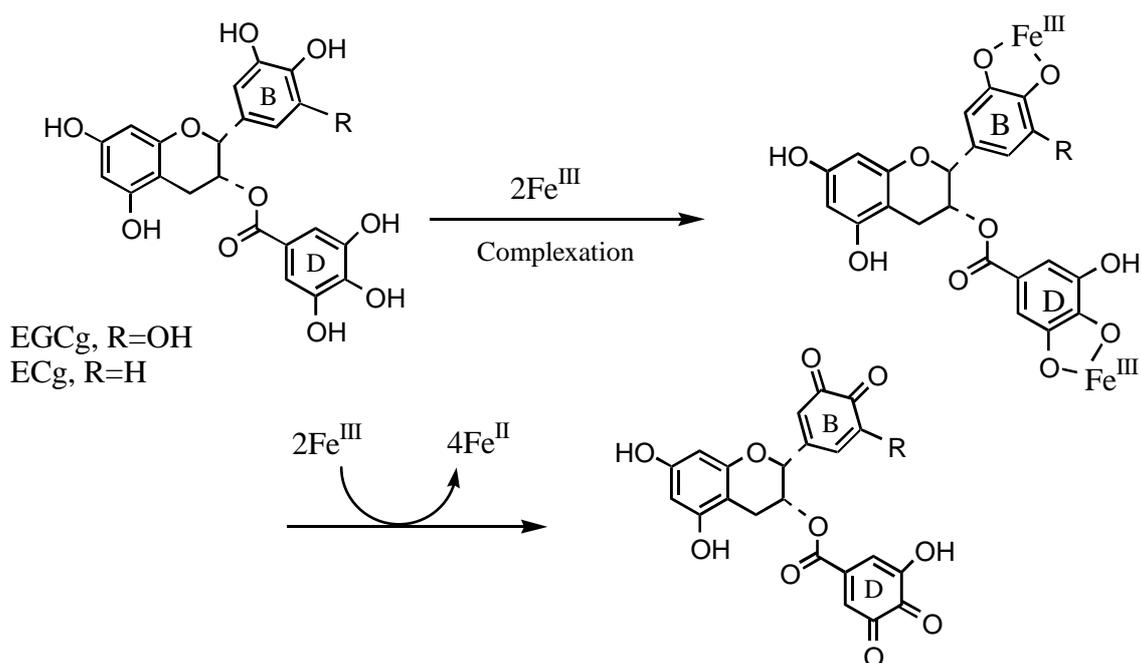
<sup>29</sup> El Hajji H. et *coll.*, 2006. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.

<sup>30</sup> Hayakawa F. et *coll.*, 1997. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1336, 123-131.

<sup>31</sup> Navarro R.E et *coll.*, 2005. *J. Inorg. Biochem.*, 99, 584-588.

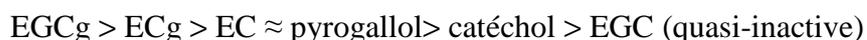
<sup>32</sup> Inoue M. et *coll.*, 2002. *J. Inorg. Biochem.*, 88, 7-13.

<sup>33</sup> Ryan P., Hynes M.J., 2007. *J. Inorg. Biochem.*, 101, 585-593.

Schéma 3<sup>34</sup>

La grande distance séparant les noyaux B et D permet de réduire les répulsions électrostatiques entre les 2 ions liés. Pour EGCg, le site de coordination principal est le noyau D. En outre, il a été montré récemment que l'EGCg et l'ECg peuvent réduire 4 équivalents de  $Fe^{III}$ .<sup>34</sup>

La capacité des catéchines à piéger le radical hydroxyle produit en présence de  $Fe^{III}$  ou  $Cu^{II}$  a été étudiée dans un tampon phosphate à pH 7,4.<sup>34</sup> L'ordre de piégeage est le suivant :



En présence de  $Fe^{III}$  ou  $Cu^{II}$ , la décomposition de  $H_2O_2$  ajoutée aux catéchines, n'est pas observée, tandis que  $Fe^{II}$  et  $Cu^I$  dissocient rapidement  $H_2O_2$  (réaction de Fenton). L'étude par spectroscopie UV-visible a révélé la formation de complexes stables (absorbant vers 440 nm et 500 nm) entre EGCg et  $Fe^{III}$ ,  $Fe^{II}$  et  $Cu^{II}$  sans formation de  $H_2O_2$ . Par contre, la dissociation du complexe EGC- $Cu^{II}$  par acidification ne permet de récupérer EGC que dans des conditions anaérobies. Ces résultats suggèrent que le complexe EGC- $Cu^{II}$  est le seul qui peut réduire  $O_2$  en EOR. En revanche, EGCg forme des complexes stables avec l'ion métallique grâce au groupement gallate. Une interprétation possible est la suivante : deux molécules d'ECG

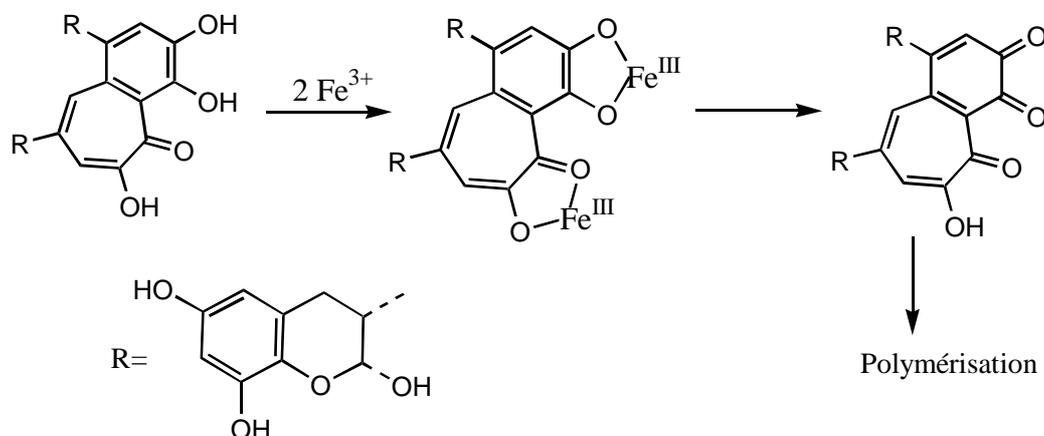
<sup>34</sup> Hayakawa F. et coll., 2004. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 68, 1825-1830.

peuvent chélater  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans un même plan.<sup>35</sup> Les petites molécules comme  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$  peuvent alors compléter la sphère de coordination en occupant les positions axiales, ce qui entraîne la production d'EOR

Dans le cas de EGCg, la coordination du groupement gallate empêcherait la liaison de  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  et la production consécutive d'EOR.

Les interactions des ions du fer et du cuivre avec les théaflavines du thé et leurs gallates ont été étudiées par spectroscopie UV-visible dans un tampon phosphate à pH 7,4.<sup>36, 37</sup> La complexation métallique se manifeste par l'apparition d'une nouvelle bande dans le domaine 510-550 nm. Le digallate a plus d'affinité pour les ions du fer que le monogallate et la théaflavine non substituée. En revanche, les quatre théaflavines ont la même affinité pour les ions du cuivre, ce qui implique que le groupe gallate ne participe pas à la liaison. La complexation métallique des théaflavines par les ions métalliques est souvent suivie par la décomposition rapide des théaflavines et l'apparition de produits d'oxydation.<sup>38</sup>

Dans des conditions acides, l'oxydation des théaflavines par  $\text{Fe}^{\text{III}}$  donne des produits d'oxydation instables qui tendent à polymériser (**Schéma 4**):<sup>38</sup>



**Schéma 4**<sup>38</sup>

<sup>35</sup> Yoshioka H. et coll., 2001. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 65, 1697-1706.

<sup>36</sup> O'Coinceannainn M. et coll., 2004. *J. Inorg. Biochem.*, 98, 657-663.

<sup>37</sup> Miller N. J. et coll., 1996. *FEBS Lett.*, 392, 40-44.

<sup>38</sup> Linert W. et coll., 1991. *Inorg. Chim. Acta*, 187, 239-247.

Au delà des études thermodynamiques de la complexation métallique des polyphénols<sup>39,40</sup> assez peu d'études cinétiques ont été entreprises.<sup>41,42,43,44</sup> En outre, les études sont souvent conduites dans des conditions fortement acides pour éviter les problèmes de précipitation et d'autoxydation. Or, dans le corps humain, Fe<sup>III</sup> et Cu<sup>II</sup> sont exposés à des pH neutres ou faiblement acides et typiquement solubilisés par association à des protéines spécifiques (hémoglobine, ferritine, transferrine...). Cependant, une fraction de ces ions peut être plus faiblement liée, notamment à des chélateurs de faible poids moléculaire (tels que les ions citrate et phosphate, l'ATP...), et ainsi participer à des mécanismes redox producteurs d'EOR.<sup>45</sup> L'influence des polyphénols de l'alimentation sur ces processus, qu'il s'agisse d'effets pro- ou antioxydants (amplification ou inhibition de la production d'EOR) peut avoir des répercussions en santé humaine. Un site biologique probable pour ces phénomènes est le tractus digestif qui est constamment exposé à diverses formes de fer et cuivre alimentaire et à des concentrations notables de polyphénols sous forme native (si l'alimentation est riche en produits végétaux). En ce site, la complexation métallique des polyphénols est également susceptible de moduler la biodisponibilité des ions métalliques aussi bien que celle des polyphénols, surtout si elle s'accompagne d'une oxydation de ces derniers. Enfin, l'interaction des polyphénols et des ions métalliques peut avoir lieu dans l'aliment lui-même, notamment au cours des procédés technologiques, et constituer la première étape vers des processus d'autoxydation encore mal connus et de nature à abaisser la concentration de polyphénols dans l'aliment. Il est donc d'un grand intérêt d'étudier les différents aspects physico-chimiques des interactions des ions du fer et du cuivre avec les polyphénols d'importance alimentaire : complexation, oxydation, production d'EOR, évolution de l'état redox du métal. Les polyphénols sélectionnés dans ce travail sont la catéchine, la quercétine, la rutine, l'acide gallique et l'acide caféique; qui d'une part sont abondants dans les aliments, et d'autre part possèdent un groupement catéchol garantissant une interaction avec les ions de métaux de transition.

---

<sup>39</sup> Torreggiani A. et coll., 2005. *J. Mol. Struct.*, 744-747 (SPEC. ISS.) 759-766.

<sup>40</sup> Esparza I., et coll., 2005. *Anal. Chim. Acta* 543 267-274.

<sup>41</sup> Hynes M.J., O'Coinceanainn M., 2001. *J. Inorg. Biochem.*, 85, 131-142.

<sup>42</sup> Hynes M.J., O'Coinceanainn M., 2004. *J. Inorg. Biochem.*, 98, 1457-1464.

<sup>43</sup> Hynes M.J., O'Coinceanainn M., 2001. *J. Inorg. Biochem.*, 84, 1-12.

<sup>44</sup> Mochizuki M., et coll., 2001. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, 1569, 35-44.

<sup>45</sup> Kakhlon O., Cabantchik Z.I., 2002. *Free. Radical. Bio.Med.*, 33, 1037-1046

**Références bibliographiques**

- [1] Miller D. M., Buettner G. R., Aust S.D., 1990. *Free Radical Bio. Med.*, 8, 95-108.
- [2] Halliwell B., Gutteridge J.M.C, 1990. *Methods. Enzymol.*, 186, 1-85.
- [3] Kaneda I., Kubo F., Sakurai H. 2007. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 21, 43-51.
- [4] Mancuso J. R. et coll., 2000. *J. Agric.Food chem.*,48, 213-219.
- [5] Wigand M.C, Dangles O. Brouillard, 1992. *Phytochemistry*, 31, 4317-4324.
- [6] Dangles O, 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier*, 29-54.
- [7] Van Acker S.A.B.E., Van Den Berg D.-J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van Der Vijgh W.J.F., Bast A., 1996. *Free Radical. Biol. Med.*, 20, 331-342.
- [8] Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. 1997. *FEBS Lett.*, 416, 123-129.
- [9] Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A., 1998. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.
- [10] Jovanovic, S.V., Simic, M.G., Steenken, S., Hara, Y.,1998. *J. Chem. Soc. Perkin Transact. 2*, 11, 2365-2369.
- [11] Paiva-Martins F., Gordon M.H., 2005. *J. Agric.Food Chem.*, 53, 2704-2709.
- [12] Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572-584.
- [13] Yoshino M., Murakami K., 1998. *Anal. Biochem.*, 257, 40-44.
- [14] Kostyuk V. A., Potapovich A. Vladykovskaya I. E. N., Korkina L. G., Afanas'ev V., 2001. *Arch.Biochem. Biophys.*, 385, 129-137.
- [15] Moridani M. Y, Pourahmad J., Bui H., Siraki V, O'Brien P. J., 2003. *Free Radical. Biol. Med.*, 34, 243-253.
- [16] Bravo A, R. Anaconda J., 2001. *Transit. Metal Chem.*, 26, 20-23.
- [17] Labieniec M., Gabryelak T., 2006. *Cell. Biol. Inter.*, 30, 761-768.
- [18] Puppo A., 1992. *Phytochemistry*, 31, 85-88.
- [19] Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H., 2002. *Toxicol.*,177, 67-80.
- [20] Escandar G.M, Sala L.F, 1991. *Can. J. Chem.*, 69,1994-2001.
- [21] Mira L., Fernandez M.T., Santos. M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R., 2002 *Free Radical Res.*, 36,1199–1208.
- [22] Sungur S.A, Uzar A, 2008. *Spectrochimica Acta Part A*, 69, 225–229.
- [23] Chvátalová K., Slaninová I., Březinová L., Slanina J., 2008. *J. Food Chem.*,106, 650-660.
- [24] Hynes M.J., O'Coinceanainn M., 2004. *Inorg. Biochem.*, 98,1457-1464.

- [25] Andjelkovic M., Van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., 2006. *Food Chem.*, 98, 23–31.
- [26] Utaka M., A. Takeda, 1985. *J.Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1824-1826.
- [27] Guang-Ri Xu, Mo Youn In, Yong Yuan, Jae-Joon Lee, and Sunghyun Kim, 2007. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 28, 889-892.
- [28] Ryan P., Hynes M.J., 2008. *J. Inorg. Biochem.*, 102, 127-136.
- [29] El Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.
- [30] Hayakawa F., Takahide K., Toshio M., Mitsue F., Sohmiya H. , Masayuki F., Takashi A., 1997. *Biochim.Biophys. Acta* , 1336, 123–131.
- [31] Navarro R.E., Santacruz H., Inoue M., 2005. *J. Inorg . Biochem .* , 99, 584-588.
- [32] Inoue M.B., Inoue M., Fernando Q., Valcic S., Timmermann B.N., 2002. *J. Inorg . Biochem.*, 88, 7-13.
- [33] Ryan P., Hynes M.J., 2007. *J. Inorg. Biochem.*, 101, 585-593.
- [34] Hayakawa F., Ishizu Y., Hoshino N., Yamaji A., Ando T., Kimura T., 2004. *Biosc., Biotech. Biochem.*, 68, 1825-1830.
- [35] Yoshioka H., Senba Y., Saito K., Kimura T., Hayakawa F., 2001. *Biosc., Biotech. Biochem.*, 65, 1697-1706.
- [36] O’Coinceanainn M, Bonnely S, Baderschneider B, Hynes J.M, 2004. *J. Inorg. Biochem.* ,98, 657–663.
- [37] Miller N. J., Castelluccio C., Tijburg L., Rice-Evans C., 1996. *FEBS Lett.*, 392, 40-44.
- [38] Linert W., Jameson R.F., Herlinger E. , 1991. *Inorg. Chim. Acta* ,187, 239–247.
- [39] Torreggiani A., Tamba M., Trincherro A., Bonora S., 2005. *J. Mol. Struct.*, 744-747 (SPEC. ISS.) 759-766.
- [40] Esparza I., Salinas I., Santamaria C, Garcia-Mina. J.M , Fernandez J.M, 2005. *Anal. Chim. Acta*, 543, 267-274.
- [41] Hynes M.J., O’Coinceanainn M., 2001. *J. Inorg. Biochem.*, 85, 131-142.
- [42] Hynes M.J., O’Coinceanainn M., 2004. *J. Inorg. Biochem.*, 98, 1457-1464.
- [43] Hynes M.J., O’Coinceanainn M., 2001. *J. Inorg. Biochem.*, 84, 1-12.
- [44] Mochizuki, M., Yamazaki, S.-I., Kano, K., Ikeda, T., 2001. *Biochim.Biophys. Acta - General Subjects* ,1569, 35-44.
- [45] Kakhlon O., Cabantchik Z.I, 2002. *Free. Radical. Bio.Med.*, 33, 1037-1046.

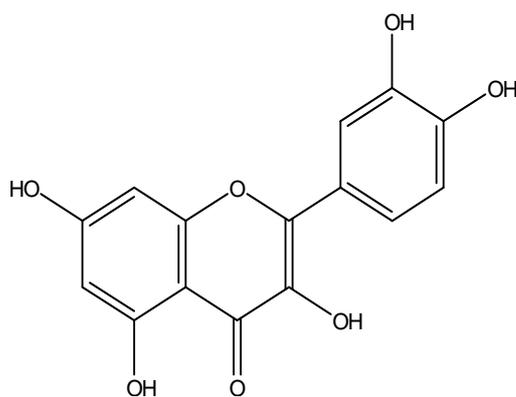
---

## CHAPITRE 2-2

### Interactions de la Quercétine avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation, Oxydation

---

La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) (**Figure 1**) est un flavonol présent dans une grande variété d'aliments incluant les oignons rouges et jaunes, les pommes, le thé, les brocolis, certaines graines et des fruits oléagineux comme les noix. Elle a fait l'objet de nombreuses publications sur ses effets biologiques et sa biodisponibilité au cours de ces dernières années. Elle semble avoir de multiples effets bénéfiques sur la santé de l'homme, incluant une protection cardiovasculaire, une activité anticancéreuse, des effets antiulcéreux, ainsi qu'une activité antiallergique, antivirale et anti-inflammatoire. Elle possède une bonne activité antioxydante, due principalement aux groupements OH des cycles B et C. Elle peut agir comme antioxydant primaire, en réduisant les radicaux peroxydes, le radical-anion superoxyde, le radical hydroxyle ou le dioxygène singulet. Elle peut en outre inhiber la lipoxygénase ou encore chélater les ions de métaux de transition.



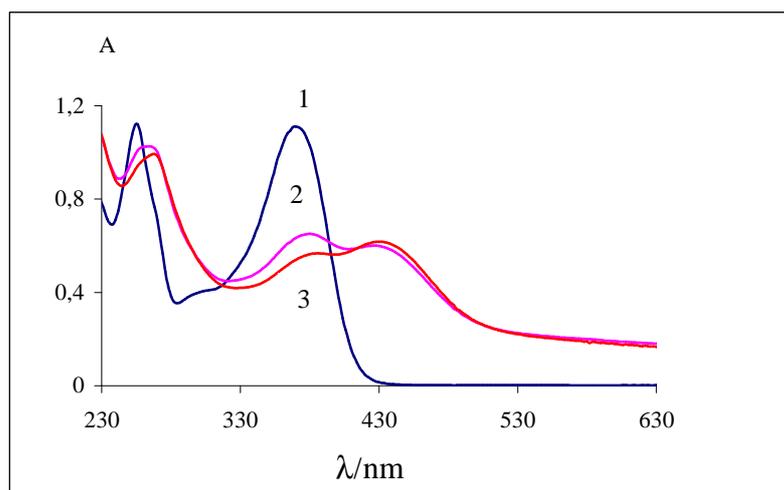
**Figure 1.** Structure chimique de la quercétine

## 2-2-1 Interaction de la quercétine avec des ions du fer et du cuivre : Complexation

### 2-2-1-1 Complexation Quercétine-Fer à pH 5

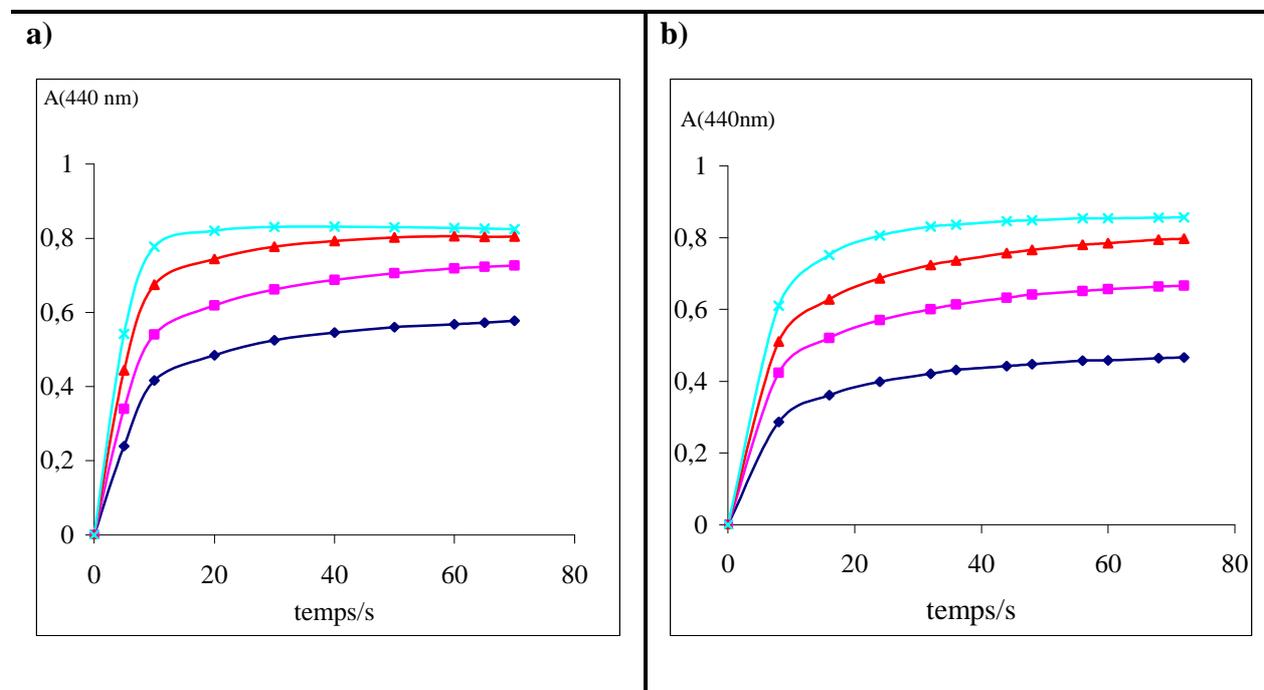
La complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par la quercétine dans un mélange tampon acétate (0,2 M)/MeOH (1/1) à pH 5 et à 37°C a été étudiée par spectroscopie UV-visible. Pour chaque complexe, le tracé de l'absorbance (à une longueur d'onde fixe où le complexe absorbe) en fonction de la concentration totale de métal est quantitativement analysé. La complexation est suivie dans le temps (mode cinétique) après addition d'un petit volume d'une solution concentrée d'ion de fer à la solution de la quercétine placée dans la cellule du spectrophotomètre.

En absence d'ion métallique, la quercétine est caractérisée par deux longueurs d'onde d'absorption maximale à 267 nm et 380 nm et qui correspondent respectivement aux cycles A et B. Des changements dans le spectre d'absorption UV de la quercétine ont été remarqués après l'addition de petits volumes d'ion métallique (**Figure2**). En particulier, une nouvelle bande d'absorption apparaît à 440 nm qui correspond au complexe quercétine-métal noté (QM). Par ailleurs, aucune augmentation de l'absorbance à 330 nm, longueur d'onde qui caractérise les produits d'oxydation de la quercétine, n'est observée. Un phénomène de précipitation est observé dans le cas où le rapport Fe/quercétine est supérieur à deux.



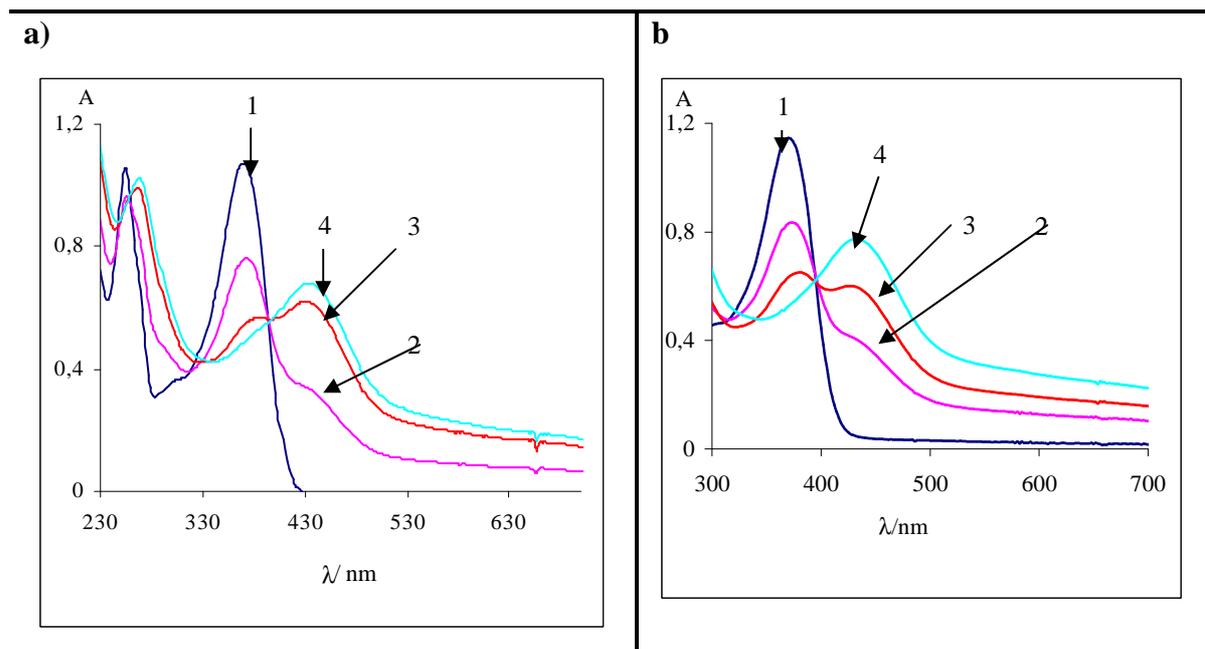
**Figure 2.** Spectres UV-visible de la complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (1 équiv.) par la quercétine (50 $\mu\text{M}$ ) dans le mélange tampon acétate (0,2 M) / MeOH (1/1) à 37°C et pH 5. Spectres enregistrés 10 min après addition des ions métalliques. **1**=  $\text{QH}_2$ , **2**=  $\text{QH}_2\text{-Fe}^{\text{II}}$ , **3**=  $\text{QH}_2\text{-Fe}^{\text{III}}$ .

La complexation des ions du fer par la quercétine est relativement rapide, comme la montre la saturation de l'absorbance à 440 nm au bout de quelques dizaines de secondes (**Figure 3**).



**Figure 3.** Complexation de la quercétine par différents équiv. de Fe<sup>III</sup> (a) et Fe<sup>II</sup> (b) dans le mélange tampon acétate (0,2M)/MeOH (1:1) (pH 5, 37°C). ♦ ρ = 1 , ■ ρ = 1.5, ▲ ρ = 2, × ρ = 3 avec ρ = QH<sub>2</sub>/Fer. Concentration de la quercétine = 50μM.

En outre, l'intensité finale de la bande d'absorption du complexe à 440 nm croît en fonction de la concentration d'espèce métallique à une tendance nette à la saturation au delà de 1-2 équivalents d'ion métallique (**Figure 4**).



**Figure 4.** Spectre UV-visible de la complexation quercétine-Fe<sup>III</sup> (A) et quercétine-Fe<sup>II</sup> (B) (0-1,5 équiv.) (tampon acétate 0,2M/méthanol 1/1, pH 5, 37°C). **1** = QH<sub>2</sub>, **2** = (ρ= 0.5), **3** = (ρ= 1), **4** = (ρ= 1.5). ρ = Fe<sup>III</sup>/QH<sub>2</sub>. Concentration de la quercétine = 50μM.

Les constantes de stabilité des complexes sont calculées selon le modèle suivant.

La réaction de complexation peut s'écrire :  $M + QH_n \rightarrow QM + nH^+$

QH<sub>n</sub> : quercétine, n : nombre de protons déplacés lors de la complexation (n = 1 si la complexation implique le groupement 3-hydroxycarbonyl ou 5-hydroxycarbonyl, (n = 2 si la complexation implique le groupement catéchol)

M : ion métallique

QM : chélate de stœchiométrie 1:1

La constante d'équilibre s'écrit alors :

$$K = \frac{[QM][H^+]^n}{[M][QH_n]} \quad (1)$$

Etant donné que le pH est maintenu constant au cours de l'expérience, l'affinité de la quercétine pour l'ion métallique peut aussi être mesurée par :

$$K_1 = K/[H^+]^n = \frac{[QM]}{[M][QH_n]} \quad (2)$$

Les variations de l'absorbance à 440 nm (longueur d'onde d'absorption maximale du complexe) en fonction de la concentration d'ion du fer peuvent être quantitativement analysées avec les équations suivantes déduites de la loi de Beer-Lambert et des lois de conservation de la matière:

$$A_{\text{plateau}} = \epsilon_1 K_1 [M]c / (1 + K_1[M]) \quad (3)$$

$$[M] = M_t / (1 + K_1 c / (1 + K_1 [M])) \quad (4)$$

$A_{\text{plateau}}$ : absorbance finale à 440 nm

[M]: concentration d'ion métallique libre

$M_t$  : concentration totale d'ion métallique

$c$  : concentration totale de quercétine

$\epsilon_1$ : coefficient d'absorption molaire du complexe à la longueur d'onde d'analyse (pas d'absorption significative des ions libres et de la quercétine à 440 nm).

Les valeurs de l'absorbance utilisées dans le calcul de  $K_1$  sont celles qui correspondent au palier atteint lorsque l'équilibre s'est établi ( $t = 1$  min). Cette méthode permet de s'assurer que l'équilibre de complexation est atteint et que la précipitation et l'autoxydation éventuelles demeurent négligeables.

Les valeurs des paramètres  $\epsilon_1$  et  $K_1$  sont reportées dans le **tableau 1**. Les valeurs du coefficient de corrélation  $r$  sont satisfaisantes.

**Tableau 1.** Constante de stabilité des complexes quercétine-fer à pH 5 et 37°C

Métal	$10^{-3} K (M^{-1})$	$\epsilon_1 (M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	$r$
Fe <sup>II</sup>	78 ( $\pm 21$ )	18800 ( $\pm 800$ )	0,993
Fe <sup>III</sup>	119 ( $\pm 25$ )	18000 ( $\pm 480$ )	0,997

L'augmentation de  $A(440 \text{ nm})$  au cours du temps peut être analysée selon le modèle cinétique suivant :

$$-d[QH_n]/dt = -d[M]/dt = d[QM]/dt = k_1[QH_n][M] - k_1[QM] / K_1$$

Les valeurs de la constante de vitesse  $k_1$  et de la constante de complexation  $K_1$  sont calculées à partir des équations ci-dessus, des lois de conservation de la matière et de la relation  $A = \epsilon_1[QM]$  dans laquelle  $\epsilon_1$  est fixé à la valeur déduite de l'étude précédente (voir tableau 1). Les valeurs des paramètres  $k_1$  et  $K_1$  sont rapportées dans le **tableau 2**.

**Tableau 2.** Complexation du Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup> par la quercétine (50 µM) dans un mélange tampon acétate (0,2 M)-MeOH (1/1) (pH 5, 37°C).

M <sub>t</sub> (µM)	k <sub>1</sub> (Fe <sup>III</sup> ) (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	10 <sup>-3</sup> K <sub>1</sub> (Fe <sup>III</sup> ) (M <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> (Fe <sup>II</sup> ) (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	10 <sup>-3</sup> K <sub>1</sub> (Fe <sup>II</sup> ) (M <sup>-1</sup> )
50	1222 (± 22)	117,2 (± 0,8)	1067(± 41)	36,6 (± 0,8)
75	1203 (± 40)	129,0 (± 4,2)	-	-
100	1510 (± 43)	133,7 (± 7,3)	866 (± 33)	79,6 (± 2,4)
125	-	-	982 (± 26)	77,3 (± 2,5)
150	1448 (± 12)	113,3 (± 2,5)	918 (± 31)	75,5 (± 5,1)
200	1160 (± 36)	107 (± 11)	844 (± 34)	71,1 (± 6,4)
250	1218 (± 10)	96,5 (± 2,6)	814 (± 36)	57,5 (± 6,7)

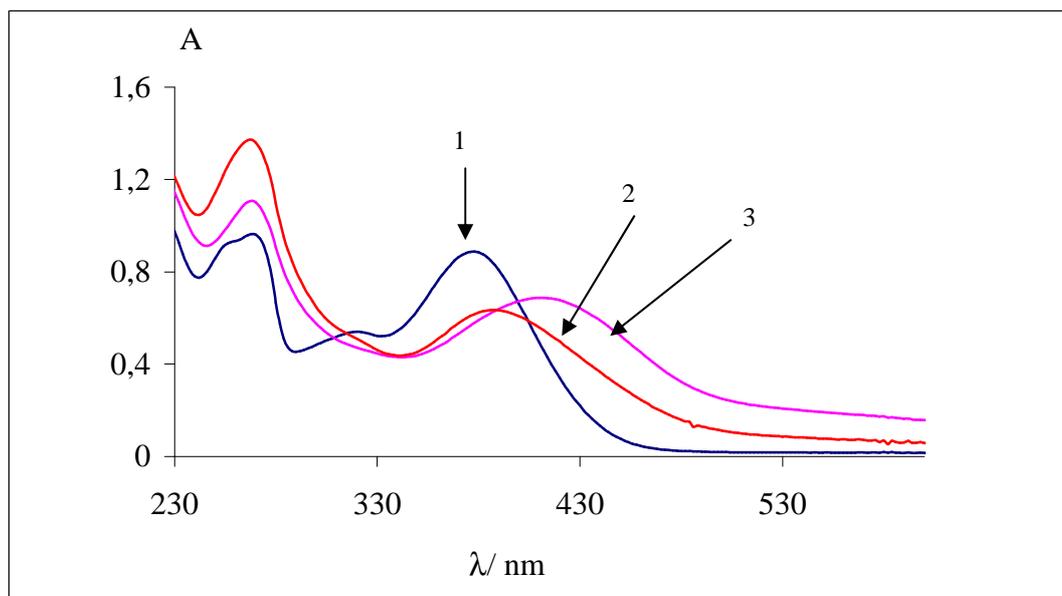
Les résultats des tableaux 1 et 2 montrent que :

- les valeurs de K<sub>1</sub> calculées par les deux méthodes sont en accord raisonnable.
- Le complexe Fe<sup>III</sup>-quercétine est plus stable que le complexe Fe<sup>II</sup>-quercétine, ce qui reflète une chélation plus rapide de la quercétine avec Fe<sup>III</sup> à pH 5. Ces résultats sont en bon accord avec les données de la littérature.<sup>1</sup> Le site probable de complexation de la quercétine par les métaux de transition à pH 4-5, est entre le groupement 5-hydroxyle-4-oxo. La capacité de former un complexe entre le noyau catéchol de la quercétine et l'ion métal diminue avec la décroissance de pH du tampon.

#### 2-2-1-2 Complexation Quercétine-Fer à pH 7,4

A pH 7,4, la complexation quercétine-fer est beaucoup plus rapide qu'à pH 5, ce qui reflète la compétition plus faible entre H<sup>+</sup> et M<sup>n+</sup> (Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup>) pour le site de complexation de la quercétine. A pH 7,4, une large bande d'absorption à 460 nm apparaît après l'addition des ions du fer et qui correspond aux complexes quercétine-fer (**Figure 5**).

<sup>1</sup> Mira L. et coll., 2002. *Free Radical. Res*, 36, 1199–1208.



**Figure 5.** Spectres UV-visible de la complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (1 équiv.) par la quercétine dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/méthanol (95/5) à  $37^\circ\text{C}$  et pH 7,4. **1** =  $\text{QH}_2$ , **2** =  $\text{QH}_2/\text{Fe}^{\text{III}}$ , **3** =  $\text{QH}_2/\text{Fe}^{\text{II}}$ . Spectres enregistrés 2 min après addition des ions métalliques

Pour un rapport molaire Fe/quercétine supérieur à 1, l'absorbance du complexe à 460 nm augmente rapidement, puis plus lentement. La complexation est trop forte pour que les constantes de stabilité soient estimées. L'analyse cinétique suggère deux processus de complexation successifs et quasi-irréversibles.  $\text{Q} + \text{M} \rightarrow \text{QM}_1$  puis  $\text{QM}_1 + \text{M} \rightarrow \text{QM}_2$

Dans cette hypothèse, les constantes de vitesse et les coefficients d'absorption molaires ( $k_1, \epsilon_1$ ) et ( $k_2, \epsilon_2$ ), correspondant respectivement aux complexes  $\text{QM}_1$  et  $\text{QM}_2$  ont pu être calculés. Les résultats sont reportés dans le **tableau 3**.

**Tableau 3.** Complexation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans un tampon phosphate à pH 7,4. La complexation est suivie à 460 nm durant 2 min.

[Fe] ( $\mu\text{M}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon_2$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
<b><math>\text{Fe}^{\text{II}}</math></b>				
75	12100( $\pm 100$ )	9600 ( $\pm 20$ )	743 ( $\pm 64$ )	10600 ( $\pm 20$ )
100	10760 ( $\pm 100$ )	9400 ( $\pm 30$ )	1901 ( $\pm 82$ )	11030 ( $\pm 10$ )
125	7209 ( $\pm 51$ )	9910 ( $\pm 30$ )	1732 ( $\pm 56$ )	11020 ( $\pm 10$ )
150	11290 ( $\pm 450$ )	9120 ( $\pm 130$ )	1875 ( $\pm 117$ )	11350 ( $\pm 10$ )
175	4808 ( $\pm 66$ )	10710 ( $\pm 60$ )	879 ( $\pm 71$ )	11510 ( $\pm 10$ )
200	9060 ( $\pm 220$ )	10180 ( $\pm 90$ )	1505 ( $\pm 76$ )	11920 ( $\pm 10$ )
<b><math>\text{Fe}^{\text{III}}</math></b>				
125	3355 ( $\pm 41$ )	6300 ( $\pm 20$ )	56 ( $\pm 15$ )	8800 ( $\pm 450$ )
150	3062 ( $\pm 33$ )	7130 ( $\pm 20$ )	158 ( $\pm 14$ )	8520 ( $\pm 50$ )
175	4160 ( $\pm 140$ )	6340 ( $\pm 60$ )	298 ( $\pm 18$ )	8410 ( $\pm 20$ )
200	3000 ( $\pm 70$ )	6270 ( $\pm 40$ )	155 ( $\pm 8$ )	8640 ( $\pm 30$ )
225	1809 ( $\pm 20$ )	7150 ( $\pm 20$ )	53 ( $\pm 6$ )	8760 ( $\pm 90$ )
250	2740 ( $\pm 90$ )	8330 ( $\pm 70$ )	176 ( $\pm 18$ )	9920 ( $\pm 30$ )

La complexation quercétine- $\text{Fe}^{\text{III}}$  est plus lente que la complexation quercétine- $\text{Fe}^{\text{II}}$  car la compétition avec les ions phosphates est plus forte avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$  qu'avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

Pour un rapport molaire Fe/quercétine inférieur à 1, les résultats s'interprètent par la formation réversible du complexe QM. Le modèle cinétique développé à pH 5 conduit aux résultats rassemblés dans le tableau 4 qui confirment la plus forte affinité de la quercétine pour  $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

**Tableau 4.** Constantes de stabilité des complexes quercétine-fer à pH 7,4 et 37°C (analyse à 460 nm sur 2 min).

Métal (1 equiv.)	$K_1$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$\epsilon_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a)
$\text{Fe}^{\text{II}}$	$45,5 (\pm 1,0) \times 10^4$	$10^4$
$\text{Fe}^{\text{III}}$	$16,1 (\pm 0,1) \times 10^3$	6300

a) valeur fixe déduite des résultats du tableau 3

La formation de complexes Fe<sup>III</sup>-quercétine de stoechiométries 1:1 et 2:1 a déjà été rapportée par potentiométrie en solution aqueuse (non tamponnée).<sup>2</sup> En effet, la quercétine possède trois sites de complexation métallique.

Cependant, les données de la littérature suggèrent que la complexation de Fe<sup>III</sup> par la quercétine (en particulier dans des conditions neutres) a lieu en priorité *via* le catéchol du cycle B.<sup>3</sup>

La complexation de Fe<sup>III</sup> par la quercétine dans le tampon phosphate à pH neutre est influencée par l'ordre d'addition des réactifs. Elle est relativement lente lors de l'addition de la quercétine à une solution de Fe<sup>III</sup> dans le tampon car en forte compétition avec la complexation de Fe<sup>III</sup> par l'ion phosphate. Cela se traduit par une constante de complexation apparente plus faible :  $K_1 = 3938 (\pm 90) \text{ M}^{-1}$  ( $\epsilon_1$  fixée à  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). L'ordre d'addition des réactifs n'a pas été étudié dans le cas de la complexation de la quercétine par Fe<sup>II</sup>, car l'autoxydation de Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup> est plus rapide que la complexation quand la quercétine est ajoutée en dernier (voir la suite).<sup>4</sup> En revanche, les différences observées dans les cinétiques de formation et les constantes de stabilité des complexes quand l'ion métallique est ajouté en dernier suggèrent que l'autoxydation de Fe<sup>II</sup> est plus lente que la complexation dans ces conditions.

### 2-2-1-3- Complexation quercétine-cuivre à pH 7,4

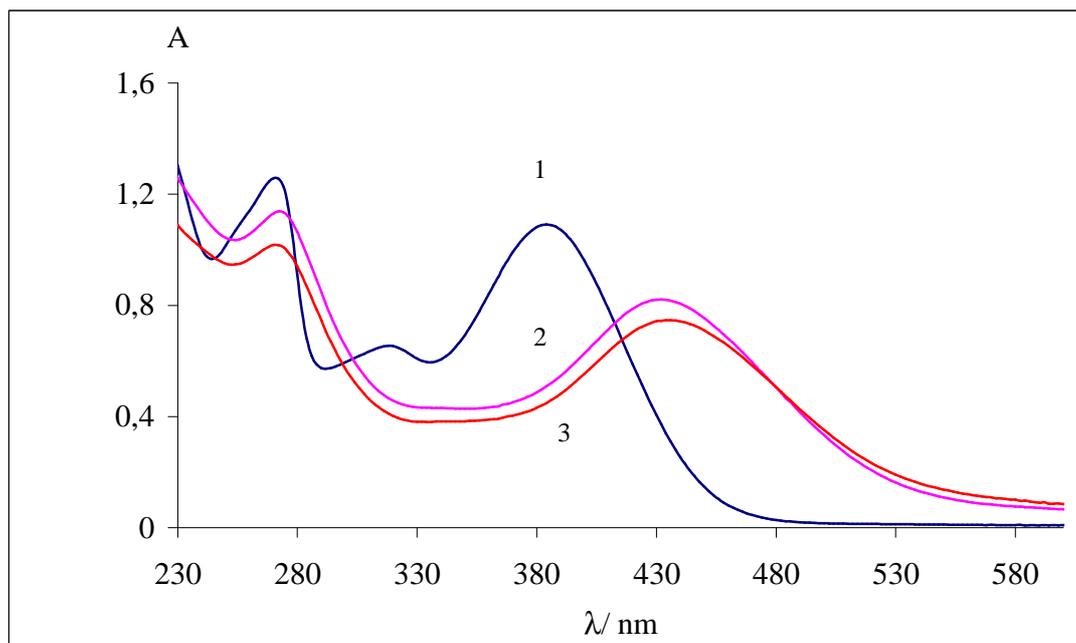
L'addition des ions du cuivre à la solution de quercétine dans le tampon phosphate provoque l'apparition d'une nouvelle bande large de longueur d'onde d'absorption maximale égale à 440 nm et qui correspond au complexe quercétine-cuivre (**Figure 6**). Ces résultats sont conformes aux données de la littérature.<sup>1</sup>

La complexation des ions du cuivre par la quercétine semble plus forte que celle des ions du fer. En effet, A(440 nm) atteint un palier plus rapidement dans le cas des couples quercétine-cuivre que dans le cas des couples quercétine-fer.

<sup>2</sup> Escandar G.M., Sala L.F., 1991. *Can. J. Chem* ,69,1994–2001.

<sup>3</sup> Engelmann MD. et coll., 2005. *J Agric.Food. Chem* .,53, 2953–2960.

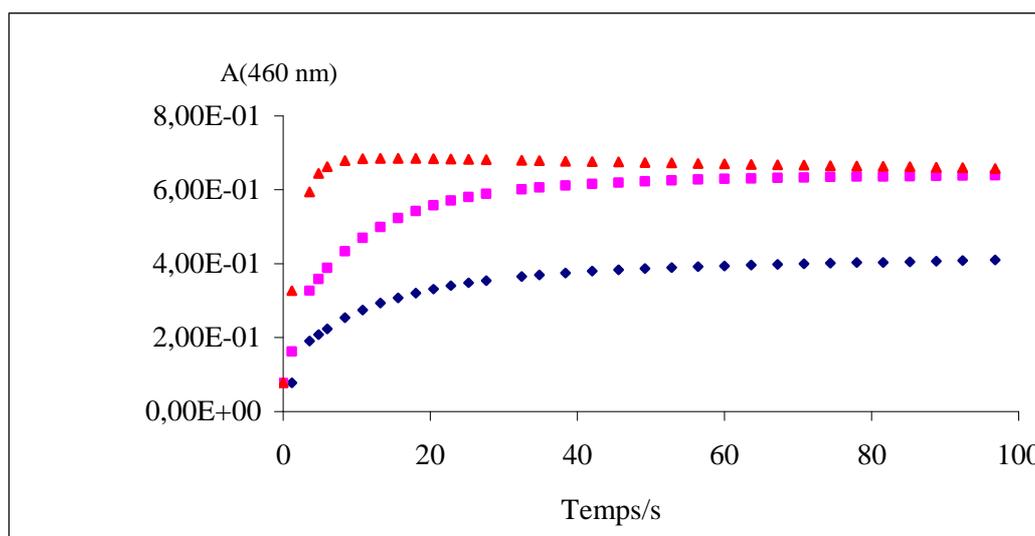
<sup>4</sup> Welch KD., Davis TZ., Aust SD., 2002. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397, 360–369.



**Figure 6.** Spectres UV-visible de la complexation du  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (1 équiv.) par la quercétine ( $50\mu\text{M}$ ) dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/méthanol (95/5) à  $37^\circ\text{C}$  et pH 7,4. **1** =  $\text{QH}_2$ , **2** =  $\text{QH}_2/\text{Cu}^{\text{I}}$ , **3** =  $\text{QH}_2/\text{Cu}^{\text{II}}$ . Spectres enregistrés 1 min après addition des ions métalliques.

#### a- Complexation quercétine- $\text{Cu}^{\text{II}}$

L'absorbance du complexe à 460 nm augmente rapidement (**Figure 7**).



**Figure 7.** Variation de l'absorbance à 460 nm en fonction du temps pour différents rapport molaire ( $\rho$ ) = $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercétine.  $\blacklozenge$   $\rho = 0,5$ ,  $\blacksquare$   $\rho = 1$ ,  $\blacktriangle$   $\rho = 2$ . Quercétine =  $50\mu\text{M}$ .

Les variations de l'absorbance maximale à 460 nm en fonction de la concentration totale de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  peuvent être quantitativement analysées avec les équations (3) et (4) (pages : 99 et 100) qui supposent la formation réversible d'un complexe  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -quercétine de stœchiométrie 1:1 ( $r=0,9995$ ) :

$$K_1 = 180 (\pm 34) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ et } \epsilon_1 = 15780 (\pm 380) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Pour ce système, l'analyse cinétique des variations de  $A(460 \text{ nm})$  en fonction du temps s'est révélé plus complexe. Pour un rapport molaire  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercétine  $< 1$ , l'analyse est possible en supposant la formation quasi-irréversible d'un complexe QM de stœchiométrie 1:1 (constante de vitesse  $k_1$ , coefficient d'absorption molaire  $\epsilon_1$ ) qui évoluerait en un complexe QM' (constante de vitesse du premier ordre  $k'_1$ , coefficient d'absorption molaire  $\epsilon'_1$ ).

Les paramètres ( $k_1$ ,  $\epsilon_1$ ) et ( $k'_1$ ,  $\epsilon'_1$ ) sont reportés dans le **tableau 5**.

**Tableau 5.** Complexation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) par  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ( $n(\text{équiv.}) < 1$ ) dans un tampon phosphate à 37°C et pH 7,4. Suivi cinétique à 460 nm durant 2 min.

$[\text{Cu}^{\text{II}}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$\epsilon_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$10^3 k'_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon'_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
12,5	7840 ( $\pm 480$ )	8900 ( $\pm 250$ )	45 ( $\pm 3$ )	13450 ( $\pm 50$ )
25	5930 ( $\pm 570$ )	8540 ( $\pm 440$ )	40 ( $\pm 3$ )	13740 ( $\pm 20$ )
37,5	7890 ( $\pm 320$ )	10290 ( $\pm 160$ )	26 ( $\pm 4$ )	12210 ( $\pm 80$ )

Nous pouvons interpréter ces résultats par un réarrangement dans la sphère de coordination du cuivre qui pourrait impliquer des ligands phosphate. Sur la gamme de temps choisie pour l'étude de la complexation, aucune augmentation significative de l'absorbance à 330 nm n'est observée, ce qui suggère que l'oxydation du ligand quercétine est négligeable.

Dans le cas où le rapport molaire  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercétine  $> 1$ , la complexation est beaucoup plus rapide. La courbe exprimant  $A(460 \text{ nm})$  en fonction du temps se compose alors de deux parties : une première partie croissante et rapide (20 premières secondes) qui correspond à la formation du complexe quercétine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  puis une deuxième partie décroissante et lente qui correspond à la décomposition du complexe et à la formation des produits d'oxydation de la quercétine. Nous nous sommes limités à une analyse cinétique de la première étape en supposant une complexation irréversible de stœchiométrie 1:1. Les valeurs des paramètres  $\epsilon_1$  et  $k_1$  sont rapportées dans le **tableau 6**.

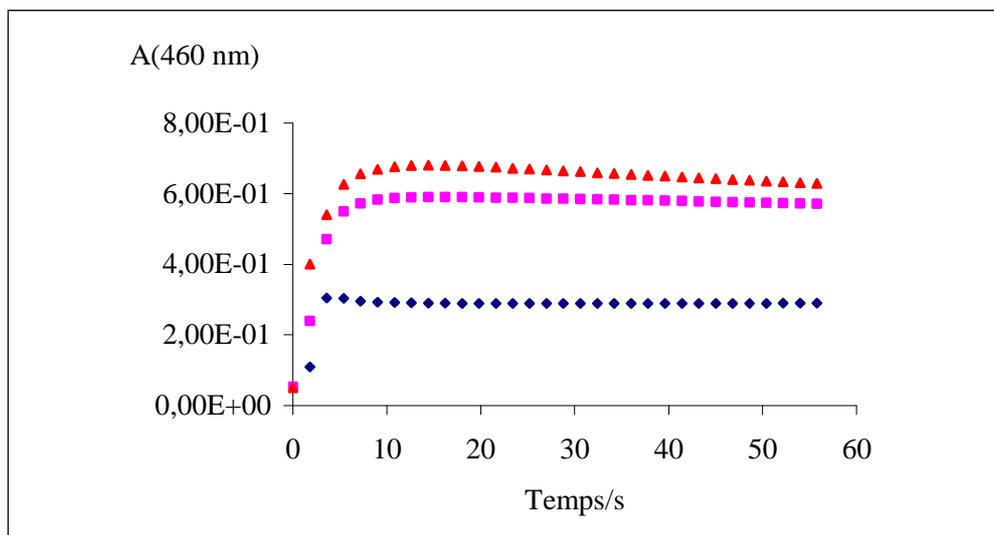
**Tableau 6.** Complexation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) par  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ( $n(\text{équiv.}) > 1$ ) dans un tampon phosphate à 37°C et pH 7,4. Analyse à 460 nm durant les 15 premières secondes.

$[\text{Cu}^{\text{II}}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$\varepsilon_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
100	6140 ( $\pm 400$ )	12410 ( $\pm 150$ )
125	6650 ( $\pm 100$ )	14720 ( $\pm 30$ )

#### b- Complexation quercétine- $\text{Cu}^{\text{I}}$

La complexation de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  par la quercétine est beaucoup plus rapide que par les autres ions métalliques étudiés précédemment. L'addition de différentes concentrations de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  à la solution de quercétine dans le tampon phosphate entraîne le développement d'une bande d'absorption du complexe à 460 nm (**Figure 6**). La complexation quercétine- $\text{Cu}^{\text{I}}$  est supposée irréversible et de stœchiométrie 1:1.

Pour un rapport  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{quercétine} \leq 1$ , le complexe formé est stable (après les 15 premières secondes de croissance rapide,  $A(460 \text{ nm})$  ne varie plus) (**Figure 8**). Dans le cas  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{quercétine} > 1$ , une décroissance de l'absorbance du complexe est observée après les 15 premières secondes de la cinétique. Ce phénomène pourrait être expliqué par le réarrangement du complexe (QM) en un deuxième complexe plus stable (QM') (produit thermodynamique) ou par l'apparition de produits d'autoxydation de la quercétine.



**Figure 8.** Complexation de la quercétine (50 $\mu\text{M}$ ) par  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95:5) (pH 7,4, 37°C).  $\blacklozenge$   $\rho = 0,5$ ,  $\blacksquare$   $\rho = 1$ ,  $\blacktriangle$   $\rho = 2$ .

Sur les 15 premières secondes de la cinétique, la variation de A(460 nm) en fonction du temps peut être quantitativement analysée. La constante de vitesse de complexation ( $k_1$ ) est d'environ  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Les paramètres  $k_1$  et  $\epsilon_1$  sont reportés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Complexation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) par  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans un tampon phosphate à 37°C et pH 7,4. Analyse à 460 nm sur les 15 premières secondes

$[\text{Cu}^{\text{I}}]$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$\epsilon_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
75	8990 ( $\pm$ 490)	12610 ( $\pm$ 150)
100	8690 ( $\pm$ 370)	12040 ( $\pm$ 80)

On peut déduire de cette étude que l'affinité de la quercétine est plus forte pour les ions du cuivre que pour les ions du fer, ce qui pourrait traduire une compétition plus faible avec les ions phosphate dans le cas des ions du cuivre mais aussi un changement probable dans le site de complexation, les ions du cuivre ayant été rapportés pour lier la quercétine *via* le groupement 3-hydroxy-4-carbonyl voire 5-hydroxy-4-carbonyl.<sup>3</sup>

### Conclusion

La complexation métallique de la quercétine dépend du pH, des ions du tampon et de l'ordre d'addition des réactifs. On peut dresser un bilan récapitulatif des constantes de vitesse de complexation (stoechiométrie 1:1) (**Tableau 8**).

**Tableau 8.** Constante de vitesse de complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}$  par la quercétine à pH 7,4 et 37°C

Complexe	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
Quercétine- $\text{Cu}^{\text{I}}$	$1 \times 10^4$
Quercétine- $\text{Cu}^{\text{II}}$	$7-10 \times 10^3$
Quercétine- $\text{Fe}^{\text{II}}$	$5-10 \times 10^3$
Quercétine- $\text{Fe}^{\text{III}}$	$2-4 \times 10^3$

Avec un excès d'ions du fer, une complexation quercétine-fer de stoechiométrie 2:1 est à prendre en compte. Dans le cas des ions du cuivre, une deuxième étape lente est observée qui pourrait traduire le réarrangement du complexe initial en un complexe plus

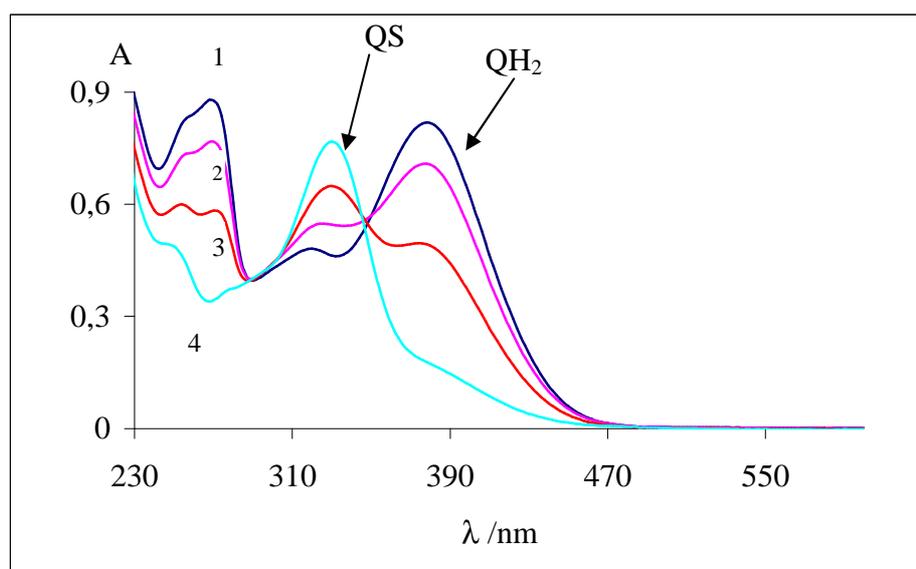
stable (participation des ligands phosphate) ou l'apparition des produits d'autoxydation de la quercétine.

## 2-2-2 Interaction de la quercétine avec des ions du fer et du cuivre: Oxydation

### 2-2-2-1 Autoxydation de la quercétine en absence de métal

L'autoxydation de la quercétine (QH<sub>2</sub>) en absence d'ion métallique ajouté a été suivie dans le temps par spectroscopie UV-visible. Elle est à peine détectable dans le mélange tampon acétate (0,2M)/MeOH (50:50) (pH 5). Par contre, elle est significative dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95:5).

Sur une heure de réaction, il y a augmentation de l'absorbance à 330 nm accompagnée de la décroissance de l'absorbance à 380 nm, ce qui s'interprète par la consommation de la quercétine au profit de ses produits d'autoxydation (QS) (**Figure 9**).



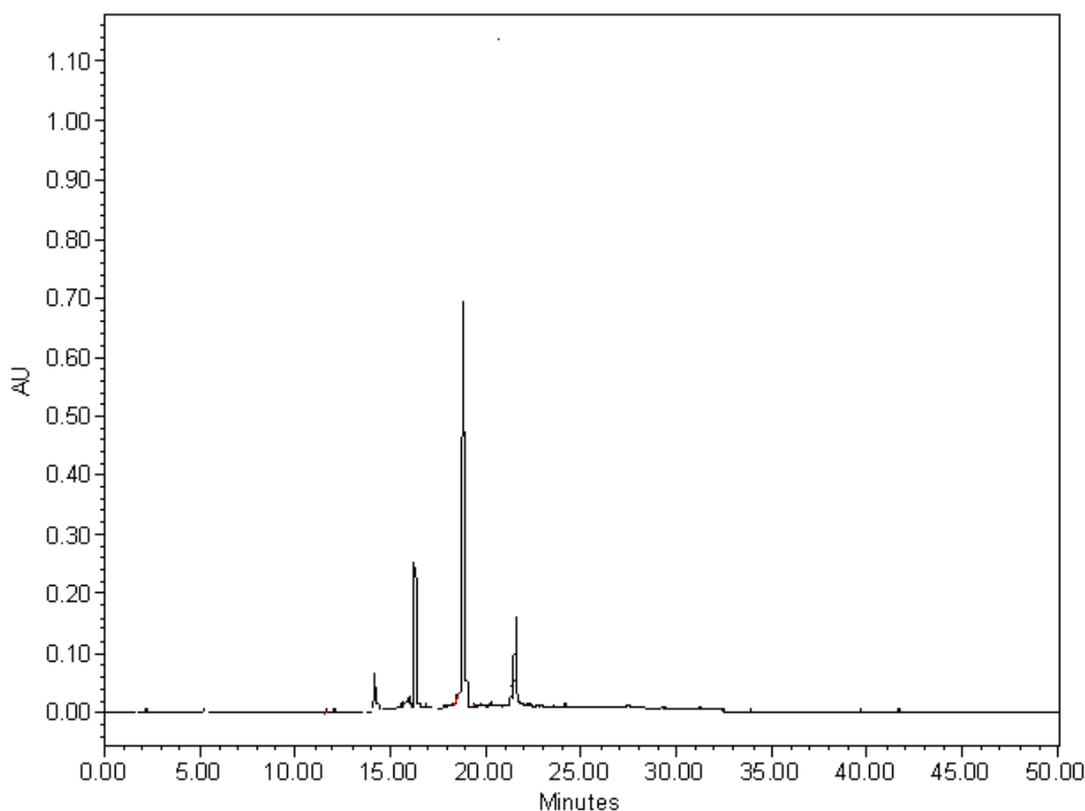
**Figure 9.** Autoxydation de la quercétine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). **1**= 1min, **2** = 1h, **3** = 3h, **4**= 7h.

L'autoxydation de la quercétine dans le tampon phosphate (pH=7,4) suit une cinétique apparente du premier ordre. Les valeurs de la constante de vitesse de formation de QS et de consommation de QH<sub>2</sub> sont en bon accord :

$$k(\text{QS}) = 57,5 (\pm 3) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1} \text{ et } k(\text{QH}_2) = 56,7 (\pm 3) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

Dans ces conditions, le temps de demi-vie de la quercétine est donc  $\ln 2/k \approx 3,4$  h. De plus, les coefficients d'absorption molaires peuvent être estimés:  $\epsilon(\text{QH}_2, 380 \text{ nm}) = 18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon(\text{QH}_2, 330 \text{ nm}) = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et  $\epsilon(\text{QS}, 330 \text{ nm}) = 19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Nous avons également étudié l'autoxydation par CLHP-UV-Visible et CLHP-MS (**Figure 10**). Quatre pics de différents temps de rétention ont été détectés sur le chromatogramme CLHP (**Tableau 9**).



**Figure 10.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine. Autoxydation de la quercétine (0.01 M) dans un mélange de tampon phosphate (0.01M)/ MeOH, pH 7.4, 37°C, durant 7h

**Tableau 9.** Données d'analyse HPLC-MS de l'autoxydation de la quercétine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). Analyse après 15 h d'autoxydation.

$t_R$ (min)	m/z	$\lambda_{\max}$ (nm)	Structure proposée
14.0	317, 299, 261, 255, 199, 179, 163, 137	292	$\text{QH}_2\text{O}$
16.0	331, 299, 271, 261, 217, 199, 187, 137	292	$\text{QMeOH}$
19.1	349, 331, 299, 271	292	$\text{QH}_2\text{OMeOH}$
22.8	301, 179, 151	254, 370	$\text{QH}_2$

Conformément à la littérature,<sup>5,6</sup> les composés d'autoxydation de la quercétine (QS) sont des produits d'addition de solvants (H<sub>2</sub>O et/ou MeOH) sur la *p*-méthylènequinone (Q) formée par oxydation biélectronique de la quercétine et correspondant à l'arrachement des 2 atomes H des groupements O3-H et O4'-H (schéma 1).

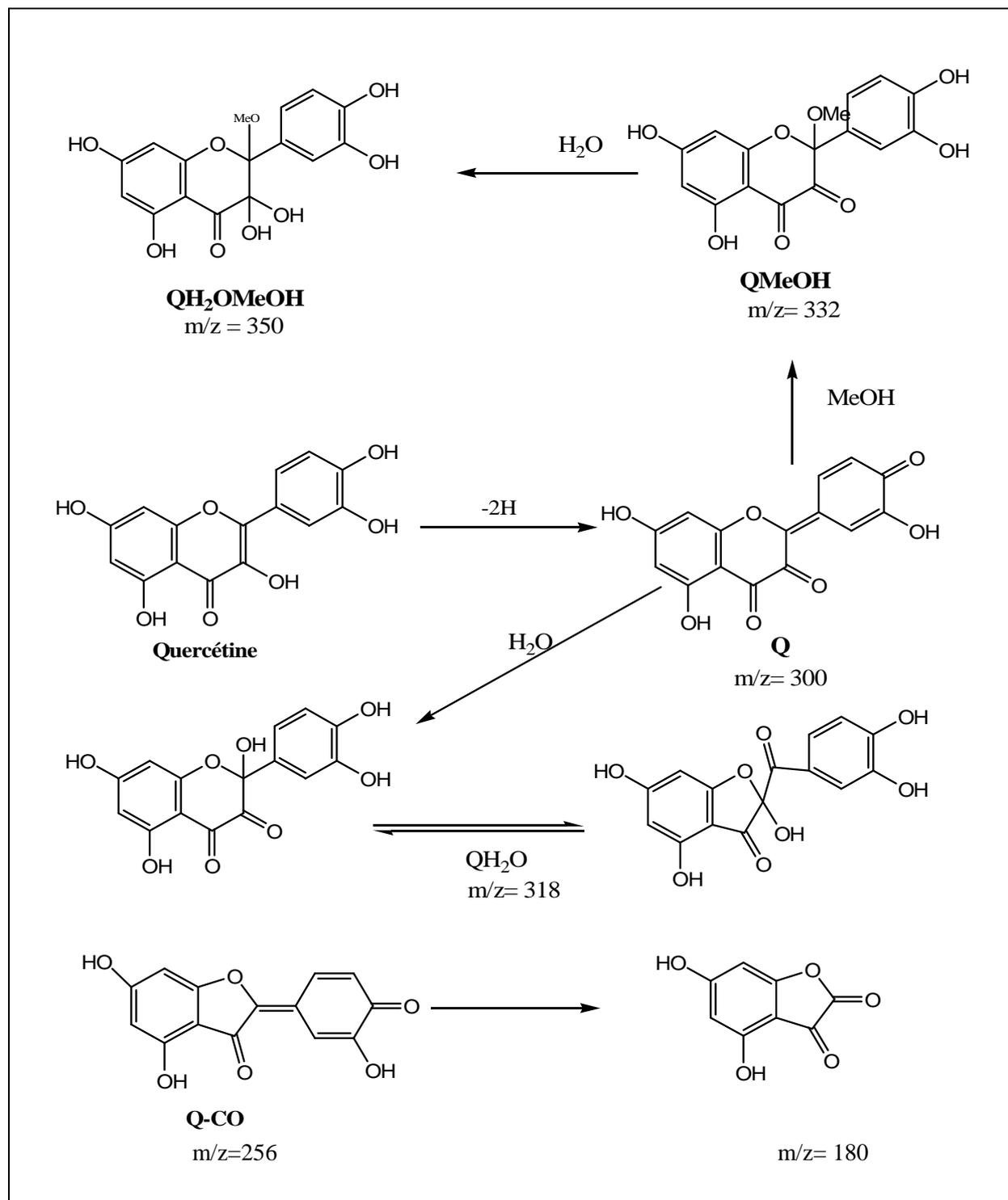
On note que l'addition de MeOH sur Q a bien lieu même si MeOH est en faible pourcentage (5%) dans le tampon phosphate.

De plus, l'autoxydation de la quercétine s'accompagne de la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour une concentration de 10<sup>-4</sup> M de quercétine, la vitesse de formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atteint une valeur constante de 3×10<sup>-10</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Ainsi, la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulée pendant 3h d'autoxydation est de 3 μM alors que la concentration de quercétine consommée est de 50 μM (voir la méthode de dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chapitre 1, partie II).

---

<sup>5</sup> Jungbluth G. et coll., 2000. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* 1946–1952

<sup>6</sup> Krishnamachari V. et coll., 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4357–4363.



**Schéma 1.** Produits d'autoxydation de la quercétine et leurs principaux fragments en spectrométrie de masse (2 dernières structures)

On pourrait considérer que la première étape de l'autoxydation de la quercétine est la conséquence du transfert direct d'électrons de la quercétine au dioxygène.<sup>2</sup> Cependant, la réaction de transfert d'électrons est thermodynamiquement très défavorable puisque les potentiels redox des couples  $\text{QH}_2/\text{QH}^\bullet$  et  $\text{O}_2$  (dissous)/ $\text{O}_2^{\bullet-}$  sont respectivement de 0,33 V (pH neutre) et -0,16 V.<sup>7</sup> En outre, l'interaction directe de  $\text{O}_2$  dans une molécule organique à électrons appariés est cinétiquement défavorable pour des raisons de non conservation du spin électronique.<sup>8</sup> Ainsi, il est probable que des traces d'ions métalliques non identifiés (en provenance du tampon par exemple) interviennent pour catalyser à la fois l'autoxydation de la quercétine et la décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit.

#### 2-2-2-2 Autoxydation de la quercétine initiée par les ions du fer à pH 7,4

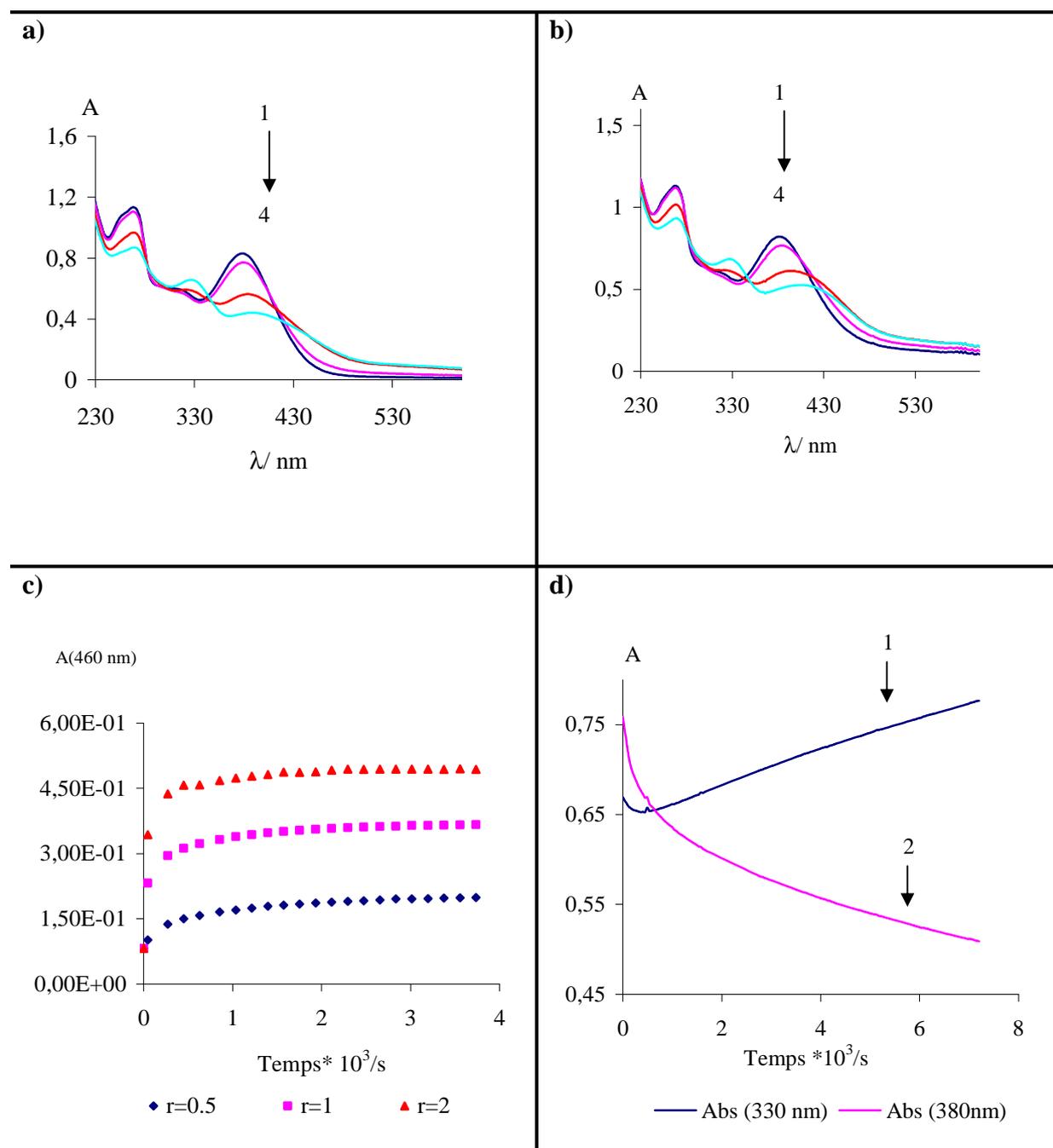
L'autoxydation de la quercétine a été suivie pendant 2h par spectroscopie UV-visible (**Figure 11**).

Plusieurs remarques peuvent être faites:

- Aux premières minutes d'addition des ions du fer, les changements spectraux reflètent la complexation métallique. Durant cette période, aucune augmentation de l'absorbance à 330 nm, typique des produits d'oxydation de la quercétine (QS), n'a été détectée.
- Une augmentation lente de  $A(330 \text{ nm})$  intervient par la suite avec diminution de l'absorbance résiduelle à 380 nm. Ces changements spectraux révèlent respectivement la formation de QS et la consommation de la quercétine libre ( $\text{QH}_2$ ) (**Figures 11 a, b, c, d**).

<sup>7</sup> Jovanovic SV, et coll., 1996. *J.Chem. Soc. Perkin Trans 2* 2497–2504.

<sup>8</sup> Miller DM, Buettner GR, Aust SD., 1990. *Free Radical. Biol.Med.*, 8, 95–108



**Figure 11.** Autoxydation de la quercétine ( $50\mu\text{M}$ ) initiée par (1 $\text{equiv.}$ )  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (Figure 11a) et par  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (Figure 11b) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4), **1** = 0 min, **2** = 4min, **3** = 1h, **4** = 2h. Variation de  $A(460 \text{ nm})$  en fonction du temps et (0.5-2 équivalents) de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (Figure 11c). Cinétique de consommation de la quercétine (380 nm) et d'apparition des produits d'oxydation en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (1  $\text{equiv.}$ ) (Figure 11d, **1**= A 330 nm et **2**= 380 nm).

- Pour un rapport molaire Fe/quercétine  $\leq 1$ ,  $A(460 \text{ nm})$  croît vers un palier qui suggère que le complexe métallique est stable. Pour un rapport molaire Fe/quercétine  $> 1$ ,  $A(460 \text{ nm})$  croît vers une valeur maximale ( $t \leq 10 \text{ min}$ ) puis décroît d'une façon significative (Figure 11c).

Une analyse cinétique quantitative de la phase d'autoxydation peut être proposée avec l'hypothèse que la complexation est rapide et quasi-irréversible. Ainsi, à la fin de l'étape de complexation qui marque le début de l'analyse cinétique, les concentrations de quercétine et du complexe métallique sont respectivement prises à  $c - M_t$  et  $M_t$  ( $M_t$ : concentration totale d'ion métallique,  $c$ : concentration totale de quercétine) quand la quercétine est en excès ( $c > M_t$ ), et à 0 et  $c$  quand la quercétine est en défaut ( $c < M_t$ ).

Pour un rapport molaire  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{quercétine} > 1$ , les variations de l'absorbance à 460 nm en fonction du temps peuvent être interprétées par la conversion du complexe (QM) en un premier produit ( $P_1$ ) qui absorbe à 460 nm, lequel se transforme en un deuxième produit ( $P_2$ ) qui n'absorbe pas à 460 nm. Les produits  $P_1$  et  $P_2$  sont caractérisés par leur constante de vitesse de formation (1<sup>er</sup> ordre apparent) et leur coefficient d'absorption molaire, soit ( $k'_1, \epsilon'_1$ ) et ( $k'_2, \epsilon'_2$ ) respectivement. Ensuite, les changements de  $A(330 \text{ nm})$  et  $A(380 \text{ nm})$  sont simultanément analysés en utilisant la valeur de  $k'_1$  précédemment déterminée pour extraire une valeur affinée de  $k'_2$  (**Tableau 10**).

**Tableau 10.** Autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.

$\text{Fe}^{\text{III}}$ ( $\mu\text{M}$ ) a)	$k'_1 \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k'_2 \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon'_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon'_2$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
100 (460)	69 ( $\pm 2$ )	1,25 ( $\pm 0,02$ )	9360 ( $\pm 10$ )	0
100 (380)	69	3,05 ( $\pm 0,02$ )	10920	0
(330)			11930	24830
150 (460)	119 ( $\pm 2$ )	1,67 ( $\pm 0,02$ )	10380 ( $\pm 10$ )	0
150 (380)	119	2,97 ( $\pm 0,01$ )	11270	0
(330)			12530	26410
100 (460)	139 ( $\pm 3$ )	1,99 ( $\pm 0,01$ )	10810 ( $\pm 10$ )	0
100 (380)	139	2,62 ( $\pm 0,01$ )	11580	0
(330)			14200	30860
250 (460)	181 ( $\pm 3$ )	2,11 ( $\pm 0,01$ )	11080 ( $\pm 10$ )	0
250 (380)	181	2,43 ( $\pm 0,01$ )	11640	0
(330)			14990	32380

a) entre parenthèses, longueur d'onde d'analyse (en nm)

Avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (rapport molaire  $\text{Fe}^{\text{II}}$ /quercétine  $> 1$ ), la démarche inverse donne de meilleurs résultats. L'analyse des variations simultanées de A(380nm) et A(330 nm) en fonction du temps permet de déduire les constantes  $k'_1$  et  $k'_2$  puis l'analyse des variations de A(460 nm), en fixant  $k'_1$  à la valeur obtenue précédemment, conduit à une valeur affinée de  $k'_2$ . Les valeurs des paramètres ( $k'_1$ ,  $\epsilon'_1$ ) et ( $k'_2$ ,  $\epsilon'_2$ ) sont rapportées dans le **tableau 11**.

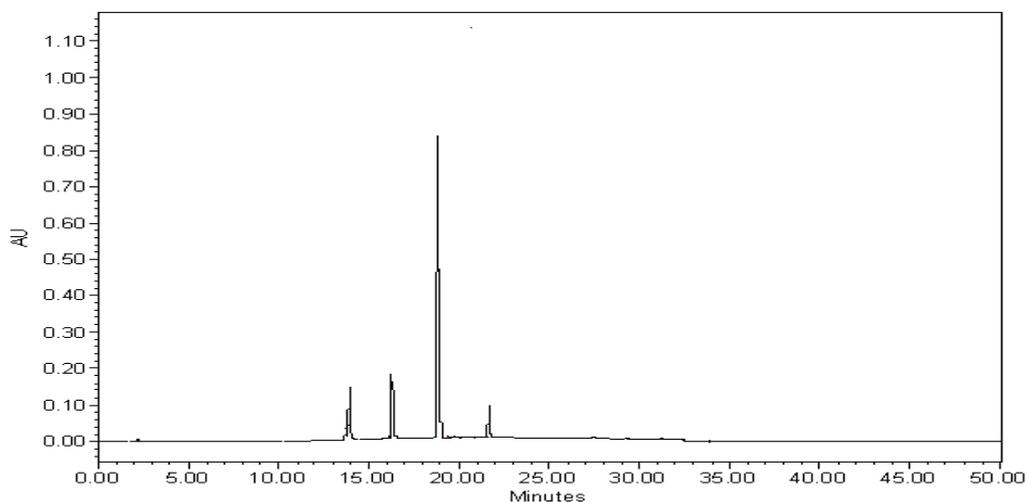
**Tableau 11.** Autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.

$\text{Fe}^{\text{II}}$ ( $\mu\text{M}$ ) a)	$k'_1 \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k'_2 \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon'_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon'_2$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
100 (460)	90	2,23 ( $\pm 0,02$ )	10380 ( $\pm 10$ )	0
100 (380)	90 ( $\pm 3$ )	2,56( $\pm 0,02$ )	12490	0
(330)			12370	27060
150 (460)	39	2,51 ( $\pm 0.01$ )	10150 ( $\pm 10$ )	0
150 (380)	39 ( $\pm 1$ )	2,21 ( $\pm 0.02$ )	9950	0
(330)			12900	28040
200 (460)	44	3,10 ( $\pm 0.03$ )	10780 ( $\pm 10$ )	0
200 (380)	44 ( $\pm 1$ )	2,40 ( $\pm 0.02$ )	10090	0
(330)			13760	29640
250 (460)	31	2,98 ( $\pm 0.03$ )	10740 ( $\pm 10$ )	0
250 (380)	31 ( $\pm 2$ )	1,38 ( $\pm 0.01$ )	10290	0
(330)			17380	43260

a) entre parenthèses, longueur d'onde d'analyse (en nm)

Le produit  $\text{P}_1$  absorbe à 460 nm et à 380 nm. Son absorbance à 330 nm est deux fois plus faible que celle du produit  $\text{P}_2$  qui n'absorbe ni à 460 nm ni à 380 nm. Il est donc raisonnable de supposer que le produit  $\text{P}_1$  est un complexe métallique qui provient du réarrangement de la sphère de coordination du complexe primaire QM comme nous l'avons déjà remarqué dans le cas de la complexation métallique de la quercétine par les ions du cuivre.

Nous avons également étudié l'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par CLHP-UV et CLHP-MS. Les analyses montrent que le produit  $\text{P}_2$  est un mélange de produits d'oxydation qualitativement identiques à ceux identifiés en absence de l'ion métallique ajouté (QS) (**Figure 12**).



**Figure 12.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine. Autoxydation sur 7h de la quercétine (0.01 M) initiée par (2 équiv.)  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans un mélange de tampon phosphate (0.01M)/ MeOH, pH 7.4, 37°C.

Quand l'ion métallique est en excès, le coefficient d'absorption molaire de  $\text{P}_2$  ou QS à 330 nm en présence de métal est supérieurs à celui estimé en absence de métal (environ  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) sans doute en raison de l'absorption (non prise en compte dans les calculs) de l'ion libre à cette longueur d'onde.

Pour un rapport molaire Fe/quercétine  $< 1$ , la quercétine est partiellement sous forme libre dans le tampon phosphate et son autoxydation 'directe' (sans formation intermédiaire du complexe QM) est à prendre en compte. Les valeurs de la constante de vitesse correspondante sont en bon accord avec celles obtenues en absence de fer. Les valeurs des paramètres ( $k'_1$ ,  $\epsilon'_1$ ) et ( $k'_2$ ,  $\epsilon'_2$ ) sont reportées dans le **tableau 12**.

**Tableau 12.** Autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence d'ions du fer (rapport molaire Fe/quercétin  $< 1$ ) dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.

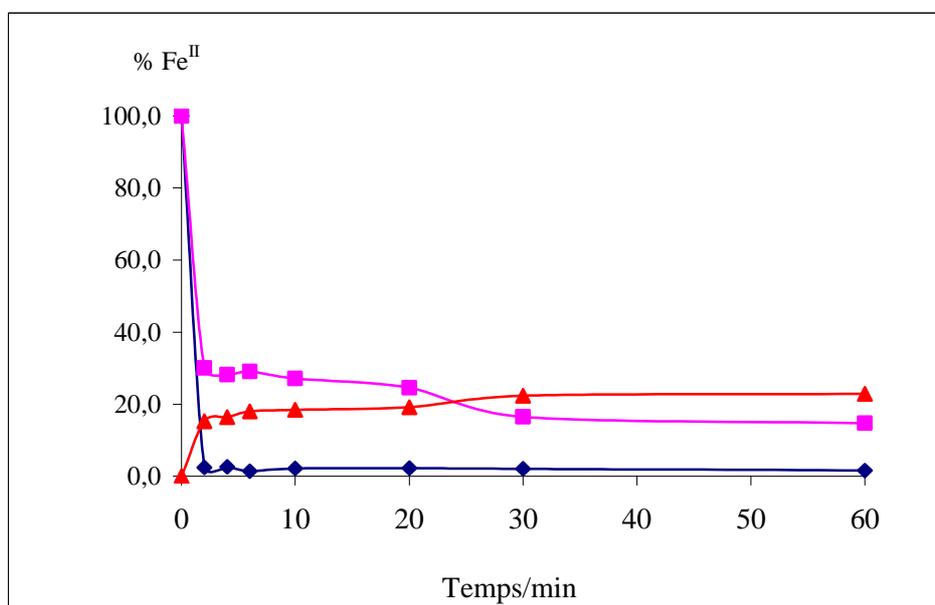
Fer ( $\mu\text{M}$ )	$k'_1 \times 10^5 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k'_2 \times 10^5 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\epsilon'_1 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	$\epsilon'_2 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
<b>Fe<sup>II</sup></b>				
25 (460)	171 ( $\pm 7$ )	0,42 ( $\pm 001$ )	12800 ( $\pm 10$ )	0
25 (380)	171	0,37 ( $\pm 0,15$ )	9070	0
(330)		6,3 ( $\pm 0,1$ ) a)	12170	24010
50 (460)	71 ( $\pm 1$ )	–	7140 ( $\pm 10$ )	0
50 (380)	71	4,00 ( $\pm 0,01$ )	13570	0
(330)			11660	21010
<b>Fe<sup>III</sup></b>				
25 (460)	39 ( $\pm 1$ )	–	7950 ( $\pm 10$ )	0
25 (380)	39	4,90 ( $\pm 0,02$ )	11630	0
(330)		4,90	12170	16680
50 (460)	54 ( $\pm 1$ )	–	6730 ( $\pm 10$ )	0
50 (380)	54	4,11 ( $\pm 0,02$ )	13270	0
(330)			12400	21090

a) constante de vitesse d'autoxydation 'directe' (quercétine libre)

Quand la quercétine est en excès, on peut noter que A(460 nm) ne varie quasiment pas et que les valeurs de  $k'_2$  correspondantes sont négligeables (nulles ou très faibles) (Tableau 13). En conséquence, l'autoxydation de la quercétine, caractérisée par l'augmentation de l'absorbance à 330 nm et la diminution simultanée de A(380 nm) (**Figure 11d**), implique essentiellement la forme libre.

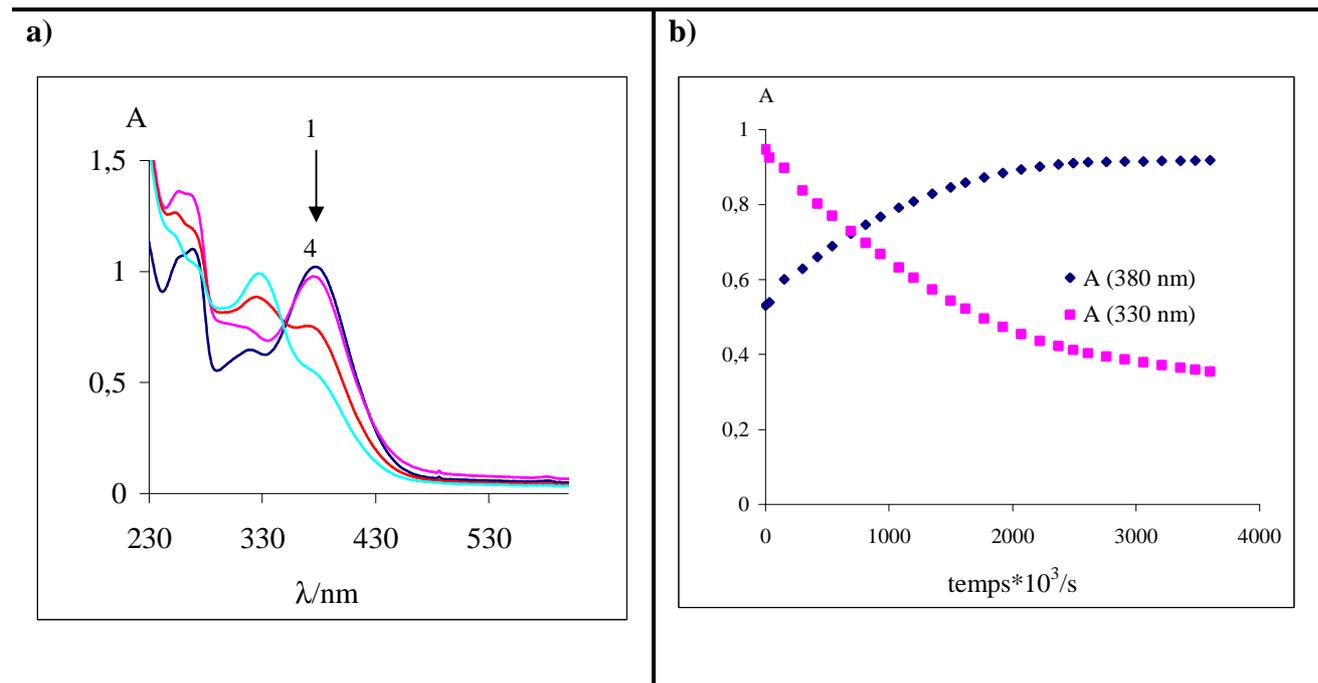
Dans le cas de l'autoxydation de la quercétine en présence de Fe<sup>III</sup>, la constante de vitesse apparente  $k'_1$  augmente linéairement avec la concentration de Fe<sup>III</sup> (**Tableaux 10 et 12**) et varie de  $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  à  $18 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Avec Fe<sup>II</sup>, une dépendance de ce type n'est pas observée. Concernant la constante de vitesse  $k'_2$ , nous remarquons qu'elle ne dépend ni de la concentration ni du degré d'oxydation du fer. Sa valeur mesure la sensibilité du complexe quercétine-fer à l'autoxydation.

En comparaison avec l'autoxydation de la quercétine en absence de métal ajouté ( $k \cong 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ), on peut conclure que la quercétine liée aux ions du fer est moins réactive que la forme libre. En d'autres termes, la complexation du fer par la quercétine protège faiblement la quercétine de l'autoxydation. Puisque  $k'_2$  ne dépend pas du degré d'oxydation du fer, il peut être suggéré que le complexe quercétine- $\text{Fe}^{\text{II}}$  se transforme en le complexe quercétine- $\text{Fe}^{\text{III}}$  dès les premières minutes qui suivent le mélange des réactifs. Nous avons confirmé cette suggestion par l'étude de l'autoxydation du  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en présence ou en absence de quercétine. Ainsi, l'indicateur ferrozine, qui forme avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$  un complexe stable intensément coloré (voire chapitre 1, partie II), nous a permis de calculer la concentration de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  accumulée dans le tampon phosphate (**Figure 13**).



**Figure 13.** Variation de la concentration de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en fonction du temps dans le tampon phosphate 0,01 M (pH 7,4, 37°C) en présence ou en absence de quercétine (100 µM). ♦  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , ■  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-QH}_2$ , ▲  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-QH}_2$ .

En absence de quercétine, la durée de vie de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans le tampon phosphate n'excède pas 2 minutes. En présence de quercétine (1 *equiv.*), l'état redox du fer est essentiellement le même (environ 80%  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) quelques minutes après mélange des réactifs que l'on parte de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Ainsi, la quercétine ne protège que marginalement  $\text{Fe}^{\text{II}}$  de l'autoxydation.



**Figure 14.** Autoxydation de la quercétine ( $5 \times 10^{-5}$  M) en présence d'EDTA ( $5 \times 10^{-4}$  M) après addition d'1 équiv.  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans un tampon phosphate (0,01 M) (pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ ). Fig. a : **1** = 0 min, **2** = 4min, **3** = 1h, **4** = 2h. Fig. b : variation de A(380 nm) et A(330 nm) en fonction du temps pendant l'addition d'1 équiv. de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  à une solution de la quercétine ( $50\mu\text{M}$ ).

L'autoxydation de la quercétine en présence d'ions du fer a été également étudiée en présence d'EDTA (10 equiv.). Dans ces conditions, aucune bande d'absorption de complexe ( $\lambda > 400$  nm) n'a été détectée (**Figure 14**). La complexation de la quercétine par le fer n'a donc pas lieu. Seule, l'autoxydation de la quercétine libre est observée ; elle apparaît faiblement accélérée par les ions du fer. L'analyse cinétique simultanée des absorbances à 330 et 380 nm montre que la réaction s'effectue apparemment en deux étapes: la première étape bimoléculaire (constante de vitesse apparente du second ordre  $k'_1$ ) pourrait impliquer la formation d'un complexe labile QM qui absorbe à 380 nm. La seconde étape serait alors la réaction du complexe QM avec le dioxygène pour former QS (constante de vitesse apparente du premier ordre  $k'_2$ ) qui n'absorbe pas à 380 nm.

Les valeurs des constantes de vitesse  $k'_1$  et  $k'_2$  ainsi que des coefficients d'absorption molaires de QM ( $\epsilon'_1$ ) et QS ( $\epsilon'_2$ ) sont rapportées dans les **Tableaux 13et 14**.

**Tableau 13.** Autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence d'EDTA et de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.

$\text{Fe}^{\text{II}}$ ( $\mu\text{M}$ ) a)	$k'_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k'_2 \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon'_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon'_2$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
25(380)	10,6 ( $\pm$ 3,0)	25 ( $\pm$ 4)	14470	0
(330)			15650	22120
50 (380)	5,4 ( $\pm$ 0,3)	19,1 ( $\pm$ 0,8)	13820	0
(330)			20080	25370
100 (380)	2,6 ( $\pm$ 0,3)	21,9 ( $\pm$ 2,2)	11340	0
(330)			23430	26770
150 (380)	1,8 ( $\pm$ 0,4)	24,1 ( $\pm$ 5,5)	11970	0
(330)			28330	28840

a) entre parenthèses, longueur d'onde d'analyse (en nm)

**Tableau 14.** Autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence d'EDTA et de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C

$\text{Fe}^{\text{III}}$ ( $\mu\text{M}$ ) a)	$k'_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k'_2 \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon'_1$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon'_2$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
25(380)	12,7 ( $\pm$ 4,8)	31 ( $\pm$ 7)	16660	0
(330)			17100	24570
50 (380)	5,8 ( $\pm$ 0,3)	22,6 ( $\pm$ 1,0)	13280	0
(330)			19290	24570
100 (380)	2,4 ( $\pm$ 0,3)	19,5 ( $\pm$ 2,0)	10680	0
(330)			25720	28440
150 (380)	1,4 ( $\pm$ 0,4)	17,7 ( $\pm$ 3,5)	9150	0
(330)			30940	33430

a) entre parenthèses, longueur d'onde d'analyse (en nm)

Les résultats des tableaux 13 et 14 montrent que les valeurs de  $k'_1$  et  $k'_2$  ne dépendent pas de l'état redox du fer. La valeur de  $k'_1$  diminue avec l'augmentation de la concentration des ions du fer, ce qui peut s'expliquer par la réversibilité de la formation du complexe labile (QM). De plus, la constante  $k'_2$  est approximativement indépendante de la concentration totale du métal. Elle peut être considérée comme une mesure de la sensibilité de la quercétine à l'autoxydation initiée par le complexe fer-EDTA dans le tampon phosphate. Les valeurs de  $k'_2$  varient de  $2 \times 10^{-4}$  à  $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . On peut donc conclure que l'autoxydation de la quercétine est trois à quatre fois plus rapide en présence du complexe EDTA-fer.

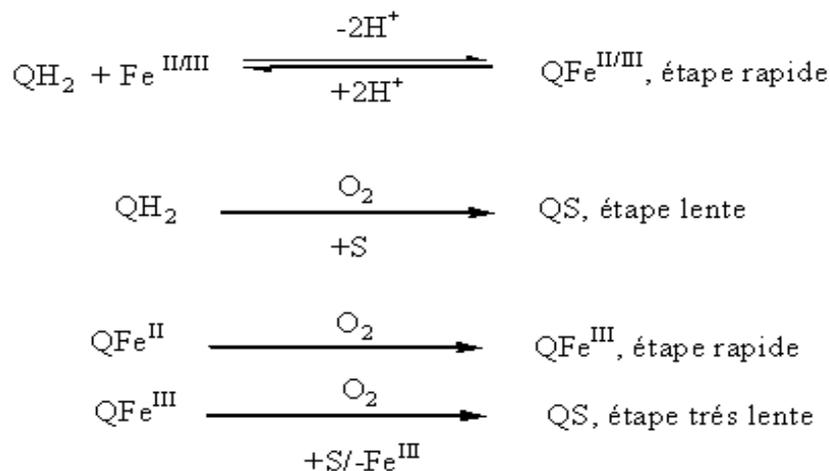
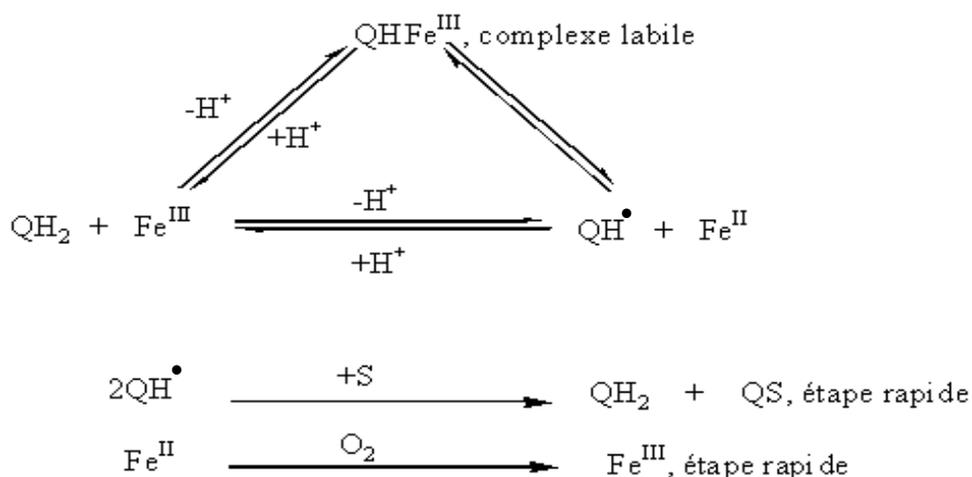
Quand l'autoxydation de la quercétine a lieu dans le tampon phosphate en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (avec ou sans EDTA), les EOR éventuellement formées pendant l'autoxydation rapide du  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ne semblent pas accélérer d'une façon significative la consommation de la quercétine. En effet, l'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  n'est pas plus rapide qu'en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

L'ensemble de ces résultats montre que les ions du fer n'accélèrent l'autoxydation de la quercétine qu'en l'absence de complexe stable quercétine-fer.

Le potentiel redox du couple  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  dépend fortement de pH du milieu réactionnel. Ainsi  $E^\circ(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$  diminue de 0,77 V à pH= 0 à 0,11 V à pH neutre,<sup>7</sup> ce qui signifie que  $\text{Fe}^{\text{III}}$  devient un oxydant moins puissant à pH neutre (du fait des déprotonations successives du complexe  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ ). La diminution du potentiel  $E^\circ$  devient encore plus importante en présence d'ions phosphate qui ont une plus grande affinité pour  $\text{Fe}^{\text{III}}$  que pour  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Ceci est aussi vraie dans le cas de la complexation fer-EDTA ( $\log K = 25$  pour  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\log K = 14,3$  pour  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ). Ainsi, le potentiel  $E^\circ$  pour le couple  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{EDTA})/\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$  est de 0,12 V. Puisque le potentiel redox du couple  $\text{QH}^\bullet/\text{QH}_2$  est de 0,33 V à pH= 7,<sup>9</sup> le transfert direct d'électrons de la quercétine vers  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (en présence ou absence d'EDTA) est un processus thermodynamiquement défavorable (fortement réversible s'il a lieu).

En présence d'EDTA (absence de complexe stable), l'autoxydation de la quercétine en présence des ions du fer peut être initiée par deux réactions différentes: soit un transfert direct et fortement réversible d'électrons de la quercétine vers  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ou, plus vraisemblablement, *via* la formation d'un complexe labile de type monocatécholate ( $\text{QHFe}^{\text{III}}$ ) qui, en raison de son champ de ligand faible, maintiendrait l'ion métallique dans un état de haut spin électronique favorisant l'interaction avec  $\text{O}_2$  et l'autoxydation consécutive (**Schéma 2**).

<sup>9</sup> Bors W. et coll., 1995. *Free Radical. Biol. Med.*, 19, 45–52.

**Sans EDTA****Avec EDTA**

**Schéma 2.** Mécanisme proposé pour l'autoxydation de la quercétine en présence des ions du fer avec ou sans EDTA

Les deux mécanismes ont été rapportés dans la littérature avec d'autres ligands à groupement catéchol.<sup>10,11</sup>

<sup>10</sup> Hynes MJ., Coinceanainn MO., 2001. *J. Inorg. Chem.*,85, 131–142.

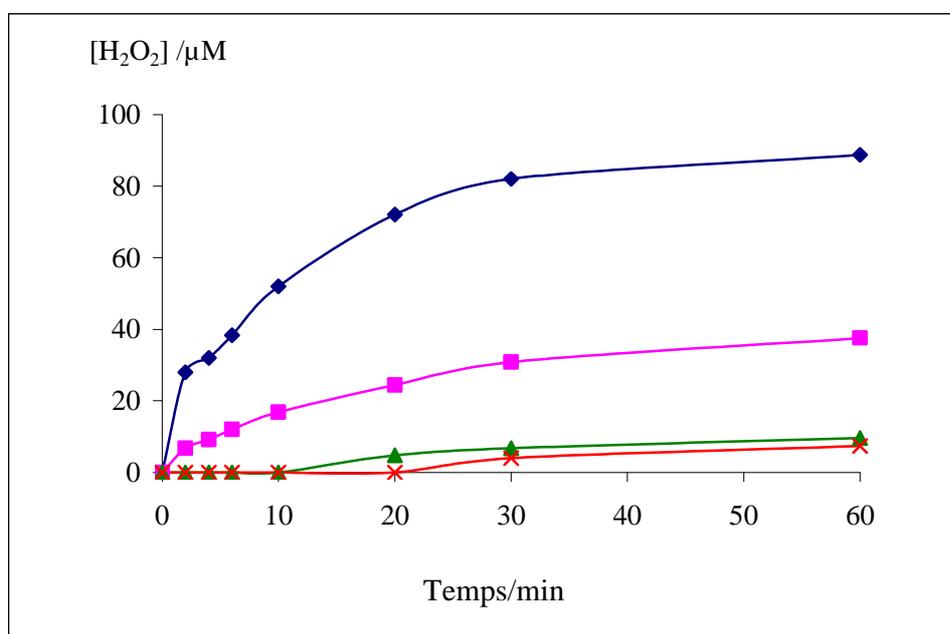
<sup>11</sup> Jameson GNL., Linert W., 2001 *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* 569–575.

Dans notre analyse cinétique, la mise en évidence d'un complexe labile intermédiaire dans l'autoxydation de la quercétine est plus en faveur du deuxième mécanisme.

En présence d'EDTA, on peut supposer que l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  n'est pas cinétiquement déterminante puisque  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et  $\text{Fe}^{\text{III}}$  accélèrent l'autoxydation de la quercétine avec la même efficacité.

Les réactions probablement impliquées dans l'autoxydation de la quercétine en présence des ions du fer avec ou sans EDTA sont résumées sur le **schéma 2**.

En présence d'un équivalent d'ions du fer, une faible quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est accumulée sur une heure de réaction (voir **figure 15**) (Méthode fox 2).

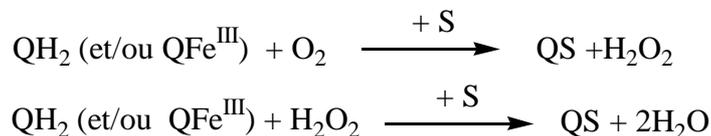


**Figure 15.** Production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans une solution de quercétine ( $100 \mu\text{M}$ ) en présence d'ion métallique (1 equiv.) (Tampon phosphate  $0,01 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7,4$ ,  $37^\circ\text{C}$ ).  $\blacklozenge$   $\text{QH}_2\text{-Cu}^{\text{I}}$ ,  $\blacksquare$   $\text{QH}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ ,  $\blacktriangle$   $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-QH}_2$ ,  $\times$   $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-QH}_2$ .

La concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produite en présence des ions du fer ne dépasse pas  $10^{-5} \text{ M}$ , ce qui peut s'expliquer par la décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formé initiée par les ions du fer (réaction de Fenton). Les EOR produits (en particulier, le radical hydroxyle) pourraient être eux-mêmes des initiateurs de l'oxydation de la quercétine. Ces résultats sont en accord avec la mise en évidence du radical hydroxyle par RPE (en présence d'un piège à spin) lors de l'autoxydation

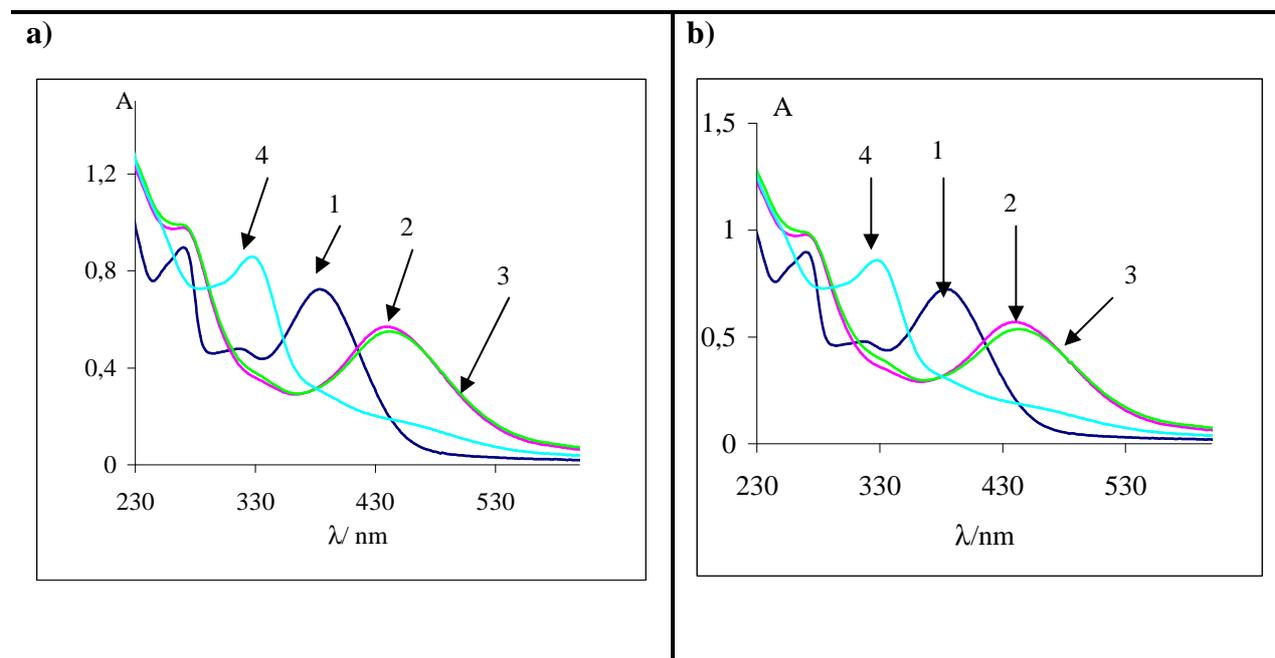
de la quercétine en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -EDTA (tampon tris, pH 8,2, 25°C),<sup>12</sup> Le signal RPE était intensifié par la superoxyde dismutase et supprimé par la catalase, ce qui confirme que  $\text{H}_2\text{O}_2$  est bien le précurseur du radical hydroxyle dans de telles conditions.

En conséquence, l'autoxydation de la quercétine en présence des ions du fer peut combiner les deux réactions suivantes :



### 2-2-2-3 Autoxydation de la quercétine initiée par les ions du cuivre à pH 7,4

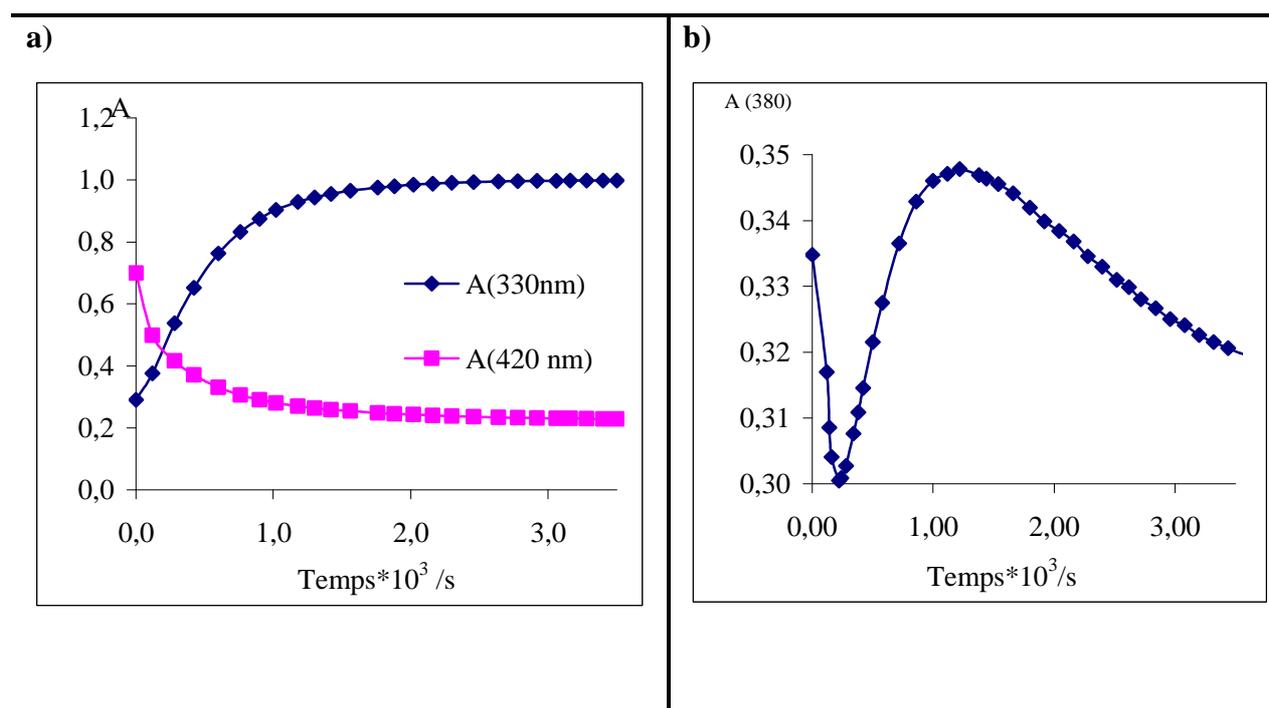
Des changements spectraux qui suivent l'addition d'ions du cuivre à une solution de quercétine dans un tampon phosphate neutre montrent la formation rapide ( $t < 1$  min) du complexe quercétine-cuivre (large bande d'absorption entre 420 et 460 nm). Suit un déclin plus lent de l'absorbance du complexe qui est cependant beaucoup plus rapide qu'avec les ions du fer (**Figure 16 et 17**). Il a également été montré que l'autoxydation du 1,2,4-benzènetriol est plus rapide en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  qu'en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .<sup>13</sup>



**Figure 16.** Autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (a) ou de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (b) (2 équiv.) dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). 1= 0min, 2= 2min, 3= 3min, 4=60min

<sup>12</sup> Canada AT, et coll., 1990. *Free Radical. Biol Med.*, 9, 441–449.

<sup>13</sup> Zhang L, Bandy B, Davison AJ., 1996. *Free Radical. Biol Med*, 20, 495–505.



**Figure 17.** Variation de A(330 nm), A(420 nm) (partie a) et de A(380 nm) (partie b) lors de l'autoxydation de la quercétine (50 μM) en présence de 2 équiv. de Cu<sup>I</sup> (pH 7,4, 37°C).

La décroissance de A(420 nm) (rapport molaire cuivre/quercétine > 1) qui traduit la consommation du complexe est simultanément associée à la croissance de l'absorbance à 330 nm qui indique la formation des produits d'oxydation de la quercétine.

Avec Cu<sup>II</sup>, A(330 nm) ne varie pas au cours de l'étape rapide de complexation, ce qui suggère que complexation et autoxydation sont cinétiquement découplées. Les variations de A(420 nm) et A(330 nm) au cours de l'étape d'autoxydation sont donc simultanément analysées pour extraire la constante de vitesse apparente d'autoxydation de la quercétine ( $k_a$ ) en présence de Cu<sup>II</sup> (**Tableau 15**).

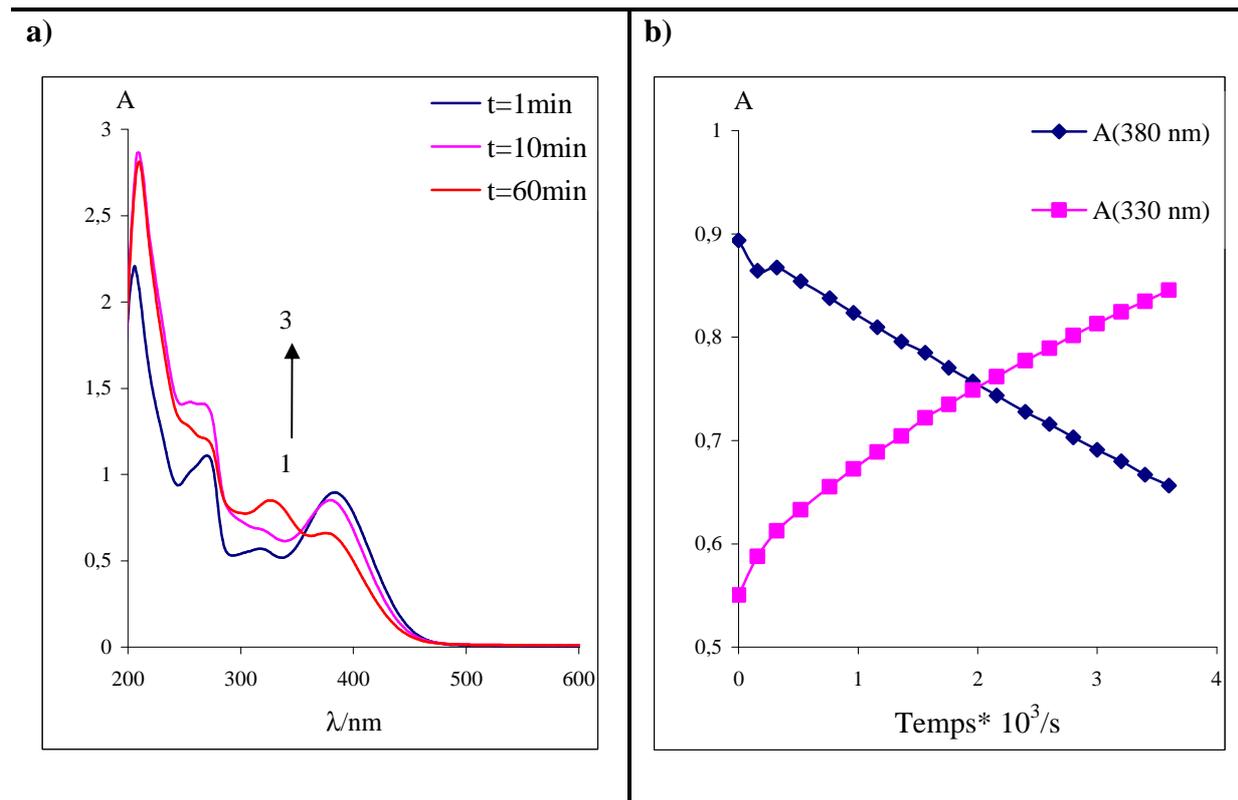
**Tableau 15.** Paramètres de la réaction d'autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).

$\text{Cu}^{\text{II}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_a \times 10^5$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\epsilon_{\text{QS}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
50(330)	27,9 ( $\pm 0,4$ )	33210
(420)		2650
75 (330)	51,2 ( $\pm 0,6$ )	23680
(420)		3220
100 (330)	85.5 ( $\pm 0,3$ )	17210
(420)		3550
125 (330)	69,4 ( $\pm 0,4$ )	22820
(420)		4500
150 (330)	60,8 ( $\pm 0,5$ )	26170
(420)		4790
200(330)	75,5 ( $\pm 0,5$ )	22960
(420)		5200

La constante de vitesse d'autoxydation  $k_a$  varie entre  $3 \times 10^{-4}$  et  $9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ; elle est indépendante de la concentration totale de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Quand la réaction est répétée en présence d'EDTA (10 équiv.), la complexation de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  par la quercétine n'a pas lieu (absence de bande d'absorption au dessus de 400 nm, **figure 18**).

L'apparition des produits d'oxydation de la quercétine (absorption à 330 nm) est associée à la consommation de la quercétine (absorption à 380 nm). L'analyse cinétique simultanée de  $A(330 \text{ nm})$  et  $A(380 \text{ nm})$  permet de déterminer la constante de vitesse apparente d'autoxydation ( $k_a$ ) (**Tableau 16**).



**Figure 18.** Autoxydation de la quercétine (50 $\mu$ M) en présence de Cu<sup>II</sup> (1 *équiv.*) et d'EDTA (10 *equiv.*) dans un mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). **1** = 1min, **2** = 10min, **3** = 60min.

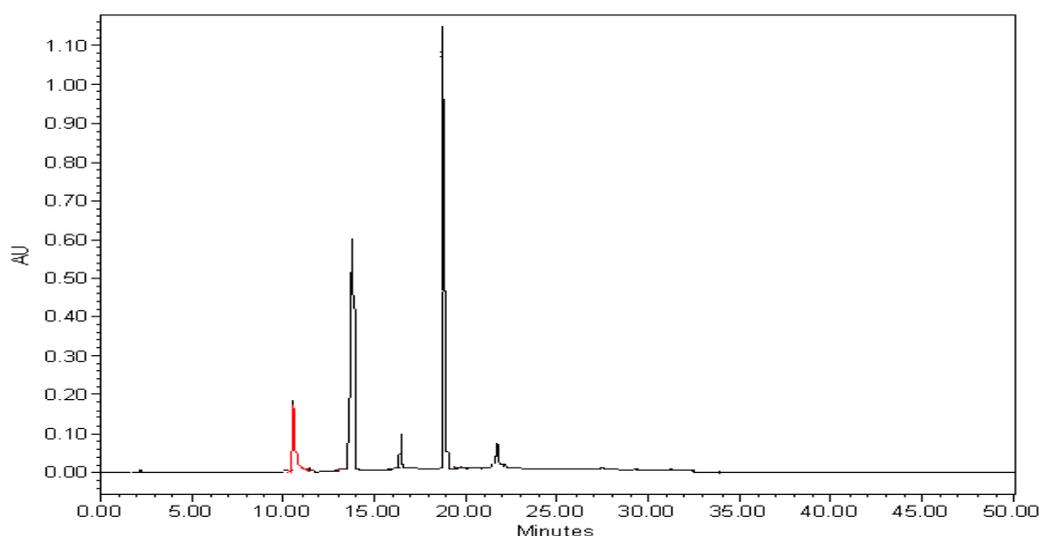
**Tableau 16.** Paramètres de la réaction d'autoxydation de la quercétine (50  $\mu$ M) en présence de Cu<sup>II</sup> et d'EDTA (10 *equiv.*) dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C)

Cu <sup>II</sup> ( $\mu$ M)	$k_a \times 10^5$ (s <sup>-1</sup> )	$\epsilon_{QS}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
50(330)	18,8 ( $\pm$ 0,9)	23220
(380)		9770
100 (330)	14,3 ( $\pm$ 0,7)	25000
(380)		6500
150 (330)	21,6 ( $\pm$ 0,9)	21660
(380)		7600
200(330)	9,0 ( $\pm$ 0,1)	29780
(380)	0	0

La valeur de  $k_a$  est quasiment constante ( $1-2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) et nettement plus faible qu'en l'absence d'EDTA. À la différence du cas des ions du fer, inhiber la complexation des ions du cuivre par la quercétine se traduit par une inhibition partielle de l'autoxydation, ce qui implique que le complexe quercétine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  un l'intermédiaire dans le mécanisme d'autoxydation de la quercétine en absence d'EDTA.

Durant l'autoxydation de la quercétine initiée par  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée sur une heure est plus importante qu'avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Ainsi, la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit dans un mélange équimolaire ( $10^{-4} \text{ M}$ ) de quercétine et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est d'environ  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  (**Figure 15**). En outre, le dosage de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  au cours de l'autoxydation (à l'aide de l'indicateur bathocuproïne qui forme avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  un complexe intensément coloré) montre que  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est rapidement réduit en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (**Figure 20**), en accord avec les données de la littérature.<sup>1</sup>

Nous avons également analysé par CLHP-UV-visible et CLHP-MS les produits d'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  après 7h de réaction (**Figure 19**, **tableau 17**). Les analyses confirment bien la formation du mélange de produits d'oxydation (QS) et de leurs complexes avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (tableau 19).



**Figure 19.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine. Autoxydation sur 7h de la quercétine (0.01 M) initiée par (2 équiv.)  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans un mélange de tampon phosphate (0.01M)/ MeOH, pH 7.4, 37°C.

**Tableau 17.** Analyse HPLC-MS de l'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans un mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) après 7h de réaction (pH 7,4, 37°C). a) Non identifié

$t_{\text{R}}$ (min)	m/z	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Structure proposée
10,37	ND a)	ND	ND
14, 02	380, 317	292	$\text{Cu}^{\text{I}}\text{QH}_2\text{O}$ , $\text{QH}_2\text{O}$
16,75	331	292	QMeOH
19,1	412, 349	292	$\text{Cu}^{\text{I}}\text{QH}_2\text{OMeOH}$ , $\text{QH}_2\text{OMeOH}$
22.09	301, 179	254, 370	$\text{QH}_2$

En présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , l'autoxydation de la quercétine est encore plus rapide qu'en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (**Figure 16**). Une décroissance rapide de  $A(460 \text{ nm})$  avec croissance simultanée de  $A(330 \text{ nm})$  est observée. Cependant, l'étude cinétique à 380 nm (absorption maximale de la quercétine) montre clairement (**fig. 16 b**) que l'autoxydation de la quercétine est un processus complexe à plusieurs étapes. L'analyse cinétique quantitative de  $A(380 \text{ nm})$  requiert l'hypothèse que le complexe quercétine- $\text{Cu}^{\text{I}}$  se transforme successivement en trois nouveaux produits  $\text{P}_1$ ,  $\text{P}_2$ , et  $\text{P}_3$  avec des constantes apparentes de premier ordre qui sont respectivement notées  $k'_1$ ,  $k'_2$  et  $k'_3$ . Ensuite, les variations simultanées de  $A(460 \text{ nm})$  et  $A(330 \text{ nm})$  sont analysées en fixant  $k'_1$  à sa valeur qui déduite de l'analyse à 380 nm pour obtenir des valeurs affinées de  $k'_2$ .

Les valeurs des paramètres ( $k'_1$ ,  $\epsilon'_1$ ), ( $k'_2$ ,  $\epsilon'_2$ ) et ( $k'_3$ ,  $\epsilon'_3$ ) sont reportées dans le **tableau 19**.

**Tableau 18.** Paramètre de la réaction d'autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).

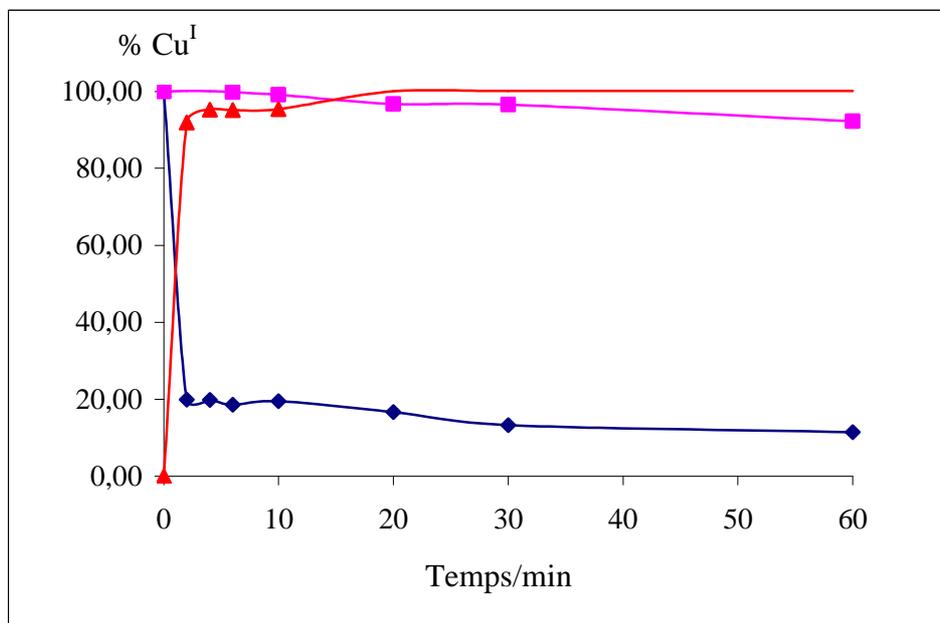
$\text{Cu}^{\text{I}} (\mu\text{M})$	$k'_1 \times 10^4 (\text{s}^{-1})$	$k'_2 \times 10^5 (\text{s}^{-1})$	$k'_3 \times 10^5 (\text{s}^{-1})$	$\epsilon'_i (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
50(380)	174 ( $\pm 5$ )	–	–	5780
50(330)	174	75 ( $\pm 2$ )	4,0 ( $\pm 0,1$ )	24090, 0
(460)				9200, 420, 0
100(380)	118 ( $\pm 5$ )	284 ( $\pm 8$ )	4,3 ( $\pm 0,1$ )	5410, 7240,0
100(330)	118	226 ( $\pm 1$ )	–	19930
(420)				10110, 2320
125(380)	111 ( $\pm 5$ )	318 ( $\pm 11$ )	4,6 ( $\pm 0,1$ )	5190, 7240, 0
125 (330)	111	242 ( $\pm 1$ )	–	19840
(420)				10270, 2410
150(380)	96 ( $\pm 5$ )	390 ( $\pm 18$ )	4,4 ( $\pm 0,1$ )	5370, 7540, 0
150(330)	96	261 ( $\pm 1$ )	–	20280, 0
(420)				10370, 2610, 0

Les valeurs de  $k'_1$ ,  $k'_2$  et  $k'_3$  sont respectivement de  $1-2 \times 10^{-2}$ ,  $1-3 \times 10^{-3}$  et  $4-5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Le produit  $\text{P}_1$  absorbe modérément à 330 nm et possède un coefficient d'absorption molaire élevé à 460 nm. Il doit s'agir d'un complexe de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dérivé de QM par réarrangements rapides dans la sphère de coordination. Le coefficient d'absorption molaire à 330 nm de  $\text{P}_1$  est pris égal à celui de la quercétine pour les calculs. Puisque l'absorbance à 330 nm augmente d'une façon très rapide au cours de la formation de  $\text{P}_2$ , nous supposons que  $k'_2$  peut être considérée comme la constante de vitesse apparente ( $k_a$ ) de l'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . Le produit  $\text{P}_2$  absorbe fortement à 330 nm et très faiblement au dessus de 400 nm. Par conséquent, le produit  $\text{P}_2$  est identifié au mélange QS de produits d'oxydation de la quercétine.

Enfin, les produits d'oxydation QS peuvent chélater les ions du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  par l'intermédiaire de leurs groupements catéchol et/ou carbonyle et subir une autoxydation en de nouveaux produits  $\text{P}_3$  ( $k'_3$ ).

Dans le tampon phosphate (pH=7,4), l'autoxydation du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est rapide et spontanée. Simultanément, une production assez faible de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui tend à se stabiliser après 15 min, peut être quantifiée.



**Figure 20.** Variation de la concentration du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en fonction du temps dans le tampon phosphate 0,01 M (pH =7,4, 37°C) en présence ou en absence de quercétine (50  $\mu\text{M}$ ).  $\blacklozenge$   $\text{Cu}^{\text{I}}$ ,  $\blacksquare$   $\text{QH}_2\text{-Cu}^{\text{I}}$ ,  $\blacktriangle$   $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-QH}_2$ .

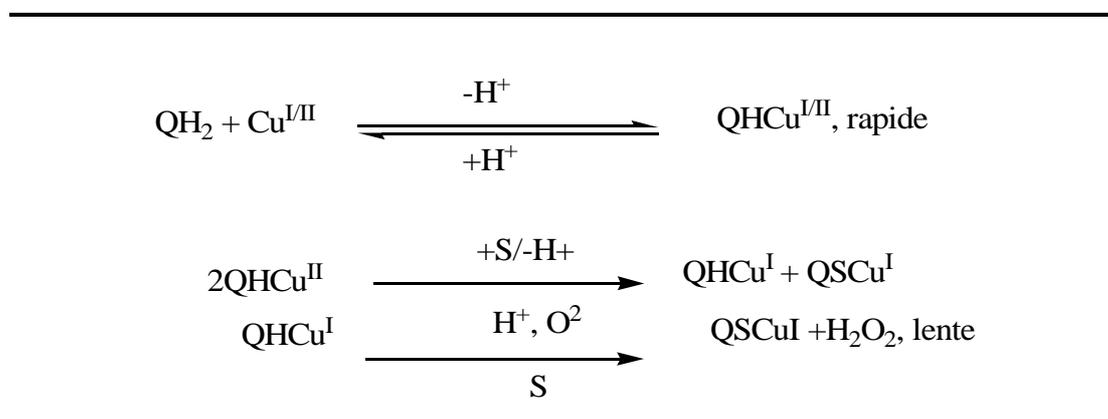
L'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  permet de produire une concentration quasi-stoechiométrique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 15).

En l'absence de quercétine, l'autoxydation de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est rapide (**Figure 20**). Ce processus est inhibé en présence de quercétine (1 equiv.) et  $\text{Cu}^{\text{I}}$  reste stable tout au long de l'autoxydation. On peut donc conclure que les produits d'oxydation de la quercétine forment aussi des complexes stables avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  et inhibent ainsi l'autoxydation de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , ce que confirment les analyses par CHLP-UV-MS.

Bien que  $\text{Cu}^{\text{II}}$  soit un oxydant plus faible que  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dans des conditions très acides ( $E^\circ(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}) = 0,77 \text{ V}$ ,  $E^\circ(\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}) = 0,34 \text{ V}$  à pH 0), il reste aussi oxydant que  $\text{Fe}^{\text{III}}$  à pH neutre ( $E^\circ(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}) = 0,11 \text{ V}$ ,  $E^\circ(\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}) = 0,15 \text{ V}$  à pH 7) en raison de ses propriétés hydrolytiques plus faibles.<sup>8</sup> De plus, les complexes du cuivre sont généralement de coordinence 4 et de géométrie tétraédrique ( $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) ou plan-carré ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) tandis que les ions du fer présentent généralement un nombre de coordination de six et un environnement octaédrique.

Dans une étude sur l'autoxydation du 1,2,4-benzène-triol initiée par  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,<sup>13</sup> les auteurs ont montré que la réaction est insensible à la superoxyde dismutase contrairement à l'autoxydation en absence de métal ajouté ou après l'addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Ainsi,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  n'est pas impliqué dans l'autoxydation du 1,2,4-benzène-triol en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . La réaction procède vraisemblablement par transfert direct de deux électrons au sein du complexe métallique. On outre, une publication détaillée sur l'autoxydation du groupement catéchol en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a montré que l'étape limitante de l'oxydation est bien le transfert intramoléculaire d'électrons au sein du complexe  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -catécholate.<sup>14</sup>

Puisque  $\text{Cu}^{\text{I}}$  est stable au cours de la réaction, on peut proposer que l'autoxydation intervienne au niveau du complexe quercétine- $\text{Cu}^{\text{I}}$  après éventuelle réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  au sein du complexe (**Schéma 3**).



**Schéma 3.** Mécanisme proposé de l'autoxydation de la quercétine en présence d'ion du cuivre.

Le peroxyde d'hydrogène étant produit de façon quasi-stoechiométrique au cours de l'autoxydation de la quercétine en présence du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (**Figure 15**), il semble que les complexes de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (à la différence des complexes des ions du fer) présents dans le mélange réactionnel soient incapables de décomposer  $\text{H}_2\text{O}_2$  formé (réaction de Fenton).

On peut dresser un tableau récapitulatif concernant les constantes de vitesse apparentes d'autoxydation de la quercétine avec ou sans ion métallique ajouté.

<sup>14</sup> Kamau P., Jordan RB., 2002. *Inorg. Chem.*, 41, 3076–3083.

**Tableau 19.** Constantes de vitesse de complexation métallique et d'autoxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).

	$k_1 \times 10^{-2} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ a)	$k_2 \times 10^{-2} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ b)	$k'_1 \times 10^4 (\text{s}^{-1})$ c)	$k_a \times 10^5 (\text{s}^{-1})$ d)
Quercétine seule	–	–	–	6
$\text{Fe}^{\text{III}}$	20-40	0,5-2	4-18	2-4
$\text{Fe}^{\text{II}}$	79-120	10-20	3-17	2-4
$\text{Fe}^{\text{III}}$ -EDTA	–	–	–	20-30
$\text{Fe}^{\text{II}}$ -EDTA	–	–	–	20-30
$\text{Cu}^{\text{II}}$	40-80	–	300-400	30-90
$\text{Cu}^{\text{I}}$	130-170	–	100-200	100-400
$\text{Cu}^{\text{II}}$ -EDTA	–	–	–	10-20

a) complexation métal-quercétine de stoechiométrie 1:1, b) complexation métal-quercétine de stoechiométrie 2:1, c) réarrangement dans la sphère de coordination (sans oxydation du ligand), d) autoxydation du ligand

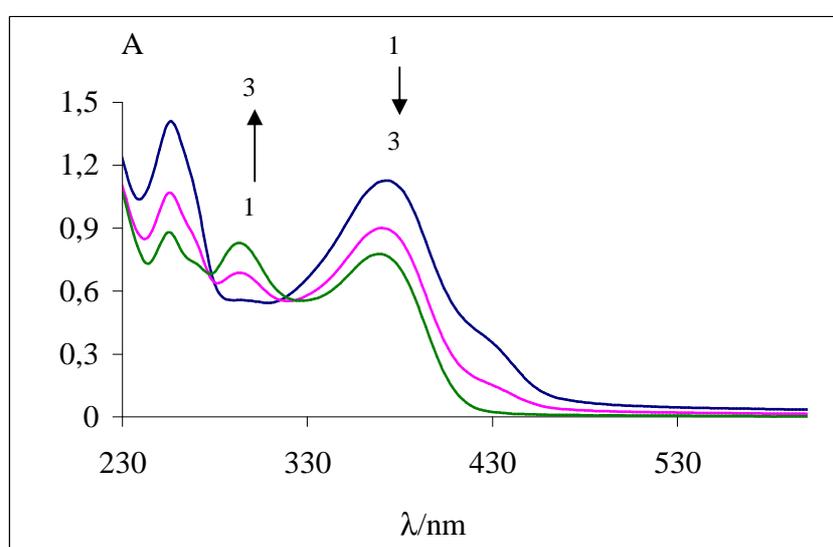
Il est nécessaire de souligner que l'ensemble des analyses cinétiques a essentiellement pour but de décrire les différents processus induits par les interactions de la quercétine avec des ions du cuivre ou du fer en dissociant complexation et processus redox. Fort probablement, plusieurs processus élémentaires interviennent au cours de l'autoxydation de la quercétine: autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le cas de l'autoxydation initiée par les ions du fer, réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , coordination de  $\text{O}_2$  et transfert d'électrons... Cependant, en raison des propriétés spectrales différentes de la quercétine, ses complexes métalliques et ses produits d'oxydation, la séparation approximative des cinétiques de complexation et d'autoxydation est possible. Ainsi, d'après les valeurs de  $k_a$ , la sensibilité de la quercétine à l'autoxydation en présence ou absence d'ion métallique dans un tampon phosphate à pH neutre suit l'ordre suivant :  $\text{Cu}^{\text{I}} > \text{Cu}^{\text{II}} > \text{sans métal} > \text{Fe}^{\text{II}} \cong \text{Fe}^{\text{III}}$ .

Les complexes quercétine-fer sont faiblement réactifs en oxydo-réduction sans doute en raison de leur faible spin électronique. En revanche, les complexes quercétine-cuivre sont beaucoup plus réactifs et capables de réduire rapidement  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec oxydation simultanée du ligand. Les complexes de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  sont plus réactifs que les complexes de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , malgré la réduction relativement rapide de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  au sein des complexes.

Cette dernière étape est donc vraisemblablement cinétiquement déterminante dans le processus d'autoxydation de la quercétine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

### 2-2-3 Oxydation de la quercétine par $\text{Fe}^{\text{III}}$ à pH fortement acide

L'addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  à une solution de quercétine dans un mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1) n'induit aucun phénomène de complexation mais permet l'apparition progressive de la bande d'absorption des produits d'oxydation (QS), détectée à 293 nm dans ce milieu, avec diminution simultanée de la bande d'absorption de la quercétine libre à 370 nm (**Figure 21**).



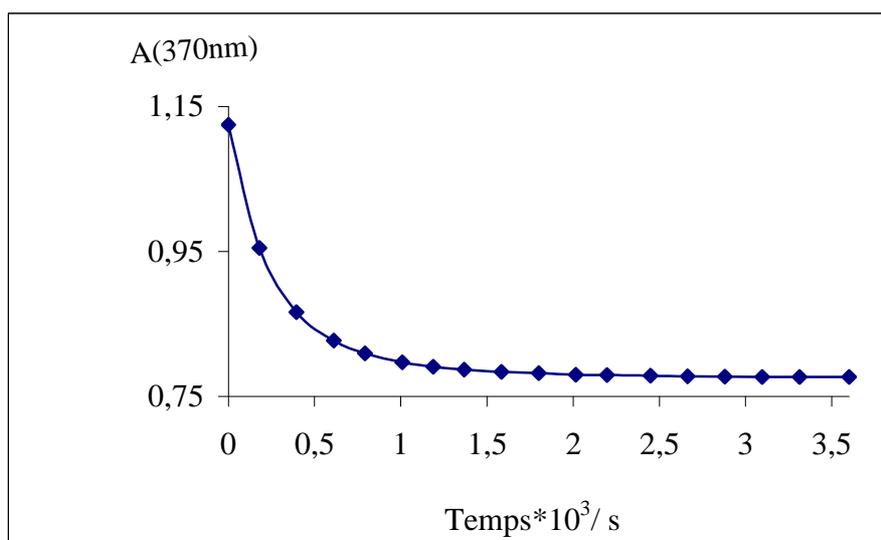
**Figure 21.** Oxydation de la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) par  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) dans un mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1) (pH 1.4, 37°C). **1** = 1 min , **2** = 5min , **3** = 60 min

Dans des conditions anaérobies (réaction sous  $\text{N}_2$ ), l'évolution est la même alors qu'aucune réaction n'est observée avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Ainsi,  $\text{Fe}^{3+}$  oxyde directement la quercétine libre sans participation du dioxygène et avec formation de  $\text{Fe}^{2+}$  stable en milieu acide. Il ne s'agit donc pas d'un phénomène d'autoxydation. La réduction de complexes colorés de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en solution acide est à la base de tests de l'activité réductrice des phénols et autres antioxydants.<sup>15</sup>

<sup>15</sup> Pulido R. et coll. 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396–3402.

Un modèle cinétique a été déjà mis au point pour analyser quantitativement le déclin de  $A(370\text{ nm})$  au cours du temps. Il s'inspire du modèle mis au point dans l'équipe pour l'analyse des réactions de transfert d'atome H des polyphénols vers le radical DPPH.<sup>16</sup> Ainsi, nous supposons que la quercétine se compose de  $n$  unités réductrices identiques ( $R$ ) capables de transférer un électron vers  $\text{Fe}^{\text{III}}$  de manière irréversible et avec la même constante de vitesse  $k$  :  $R + \text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow R_{\text{ox}} + \text{Fe}^{\text{II}}$

Le nombre  $n$  représente donc la stœchiométrie de la réaction, c'est-à-dire le nombre d'ions  $\text{Fe}^{\text{III}}$  réduits par une molécule de quercétine. La réaction est conduite en excès de quercétine (rapport molaire  $\text{Fe}^{\text{III}}$ /quercétine = 1-5) de sorte qu'une fraction de quercétine persiste en fin de réaction comme le montre l'absorbance résiduelle à 370 nm (**Figure 22**). Dans ces conditions, on admet que  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est intégralement converti en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  quand le plateau à 370 nm est atteint (l'absorption des ions du fer est négligeable à 370 nm de même que celle des produits d'oxydation de la quercétine).



**Figure 22.** Variation de l'absorbance à 370 nm de la quercétine en fonction du temps après addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (2,5 équiv.) (Mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1), pH 1,4, 37°C).

<sup>16</sup> Goupy P. et coll., 2003 *J. Agric. Food Chem.*, 51, 615–622.

L'analyse quantitative est basée sur les équations suivantes :

$$A = \varepsilon [\text{QH}_2] = \varepsilon[\text{R}]/n$$

$$-d[\text{R}]/dt = -d[\text{Fe}^{\text{III}}]/dt = k[\text{R}] [\text{Fe}^{\text{III}}]$$

Les concentrations initiales de quercétine et  $\text{Fe}^{\text{III}}$  sont respectivement  $(\text{R})_0 = nA_0/\varepsilon$  ( $A_0$ : absorbance initiale) et  $(\text{Fe}^{\text{III}})_0 = C$ . La vitesse initiale de consommation de la quercétine est définie comme suit :

$k(\text{R})_0(\text{Fe}^{\text{III}})_0 = k n (\text{QH}_2)_0(\text{Fe}^{\text{III}})_0 = k_1(\text{QH}_2)_0(\text{Fe}^{\text{III}})_0$ ,  $k_1$  désignant la constante de vitesse de transfert du 1<sup>er</sup> électron de la quercétine vers  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Ainsi,  $k$  peut être remplacé par  $k_1/n$ .

L'analyse cinétique permet d'accéder aux valeurs optimisées des 2 paramètres  $k_1$  et  $n$  (tableau 21):

**Tableau 20.** Réduction de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par la quercétine (50  $\mu\text{M}$ ) dans le mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1) (37°C).  $\varepsilon(\text{quercétine}, 370 \text{ nm}) = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\text{Fe}^{\text{III}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$n$
50	55 ( $\pm 1$ )	7,34 ( $\pm 0,02$ )
75	49 ( $\pm 1$ )	7,12 ( $\pm 0,04$ )
125	82 ( $\pm 1$ )	7,26 ( $\pm 0,01$ )
250	89,0 ( $\pm 0,3$ )	6,67 ( $\pm 0,01$ )

Le tableau ci-dessus appelle les remarques suivantes :

- Les valeurs de  $k_1$  et de  $n$  sont relativement indépendantes de la concentration de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , ce qui conforte la validité du modèle
- Les valeurs de  $n$  obtenues montrent clairement que la quercétine subit une oxydation très poussée dans ces conditions. Une seule molécule de quercétine peut réduire sept équivalents de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  après une heure de réaction sans participation de dioxygène. La valeur de  $n$  peut même être considérée comme une limite inférieure car un léger déclin de  $A(370 \text{ nm})$  se poursuit au-delà d'une heure.

Les valeurs de  $n$  obtenues sont en bon accord avec celles rapportées pour la réduction du radical DPPH ( $n = 5$ )<sup>16</sup> et de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ( $n = 9$ ) par la quercétine<sup>1</sup>.

### 2-2-4 Conclusion

La quercétine est le flavonoïde le plus abondant dans le règne végétal. C'est de plus un composé oxydable (réducteur) et qui possède une grande capacité de complexation d'ions métalliques. Cependant, ces interactions et les processus d'oxydation qui peuvent en découler dépendent fortement de la nature de l'ion métallique ainsi que de la nature et du pH du tampon. Notre travail a permis de préciser les points suivants :

En milieu fortement acide, la complexation quercétine-fer n'est pas observée mais la quercétine réduit rapidement 7 équivalents de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , un oxydant fort dans ces conditions.

Dans des conditions légèrement acides (tampon acétate à pH 5), la quercétine se lie réversiblement avec les ions du fer. L'autoxydation est très lente.

En milieu neutre (tampon phosphate à pH 7,4), la complexation des ions du fer ou du cuivre par la quercétine est rapide et essentiellement irréversible. L'ordre d'addition du métal et de la quercétine affecte la cinétique de complexation en conséquence de la participation des ions phosphate à la complexation. Les complexes fer-quercétine sont relativement inertes et réagissent plus lentement avec le dioxygène que la quercétine libre. Cependant, l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  reste rapide dans les complexes. Les complexes cuivre-quercétine s'oxydent rapidement avec production de peroxyde d'hydrogène et de complexes impliquant  $\text{Cu}^{\text{I}}$  et les produits d'oxydation. La réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  est probablement l'étape cinétiquement déterminante du processus.

**Références bibliographiques**

- [1] Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H. et Jennings K.R., 2002. *Free Rad. Res.* ,36, 1199–1208.
- [2] Escandar G.M. et Sala L.F., 1991. *Can. J. Chem.* ,69, 1994–2001.
- [3] Engelmann M.D., Hutcheson R., Cheng IF., 2005. *J Agric Food Chem* ,53, 2953–2960.
- [4] Welch KD., Davis TZ., Aust SD., 2002. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397, 360–369.
- [5] Jungbluth G., Ruhling I., Ternes W., 2000. *J Chem Soc Perkin Trans 2*,1946–1952.
- [6] Krishnamachari V., Levine LH., Pare PW., 2002. *J Agric Food Chem* ,50, 4357–4363.
- [7] Jovanovic SV., Steenken S., Hara Y., Simic MG., 1996. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 2497–2504.
- [8] Miller DM., Buettner GR., Aust SD., 1990. *Free Radical Biol. Med.*, 8, 95–108.
- [9] Bors W., Michel C., Schikora S., 1995. *Free Radical Biol. Med.*,19, 45–52.
- [10] Hynes MJ., Coinceanainn MO., 2001. *J. Inorg. Chem.*, 85, 131–142.
- [11] Jameson GNL., Linert W., 2001. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans 2*, 569–575.
- [12] Canada AT., Giannella E., Nguyen TD., Mason RP., 1990. *Free Radical. Biol Med.*, 9, 441–449.
- [13] Zhang L., Bandy B., Davison AJ., 1996. *Free Radical Biol. Med.*, 20, 495–505.
- [14] Kamau P., Jordan RB., 2002. *Inorg. Chem* ., 41, 3076–3083.
- [15] Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. 2000. *J Agric. Food Chem.*, 48, 3396–3402
- [16] Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O., 2003 *J Agric. Food Chem.*, 51, 615–622.

---

## CHAPITRE 2-3

### Interactions de la Rutine avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation

---

La rutine est un 3-O- $\beta$ -glycoside de la quercétine (**Figure 1a**). La partie glycosidique de la rutine est le disaccharide rutinose (D-Glc- $\alpha$ -1,6-L-Rha). La rutine est présente dans de nombreuses plantes, fruits et légumes. Le thé noir, les pommes et les agrumes en sont particulièrement riches. Au cours de la digestion, la rutine est métabolisée en son aglycone par la microflore intestinale.

La rutine est un inhibiteur de la peroxydation lipidique initiée par les ions de métaux de transition.<sup>1,2,3,4</sup> Negre-Salvayre et *coll.* ont montré que la rutine inhibe l'effet pro-oxydant d' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique contre le stress induit par l'oxydation des lipoprotéines.<sup>5</sup> Des activités antimutagène et anti-inflammatoire ont aussi été mises en évidence.<sup>6</sup>

L'efficacité antioxydante de la rutine est typiquement plus faible que celle de son aglycone quercétine.<sup>7,8</sup> Malheureusement, la valeur thérapeutique potentielle de la quercétine est restreinte en raison de son activité cytotoxique et mutagène qui pourrait être liée à sa capacité à produire des EOR par autoxydation.<sup>5</sup> Par conséquent des travaux ont été entrepris pour améliorer l'activité antioxydante de la rutine. Ainsi, les complexes de la rutine et des ions de métaux de transition se sont révélés plus efficaces que la rutine en raison de leur activité de type superoxyde dismutase.<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Afanas'ev I.B. et *coll.*, 1989. *Biochem.Pharmacol.*, 38., 1763-1769.

<sup>2</sup> Murota K. et *coll.*, 2004. *Agric. Food Chem.*, 52, 1907-1912.

<sup>3</sup> Chung J.-H. et *coll.*, 1991. *Korean J.Pharmacol.*, 27, 69-80.

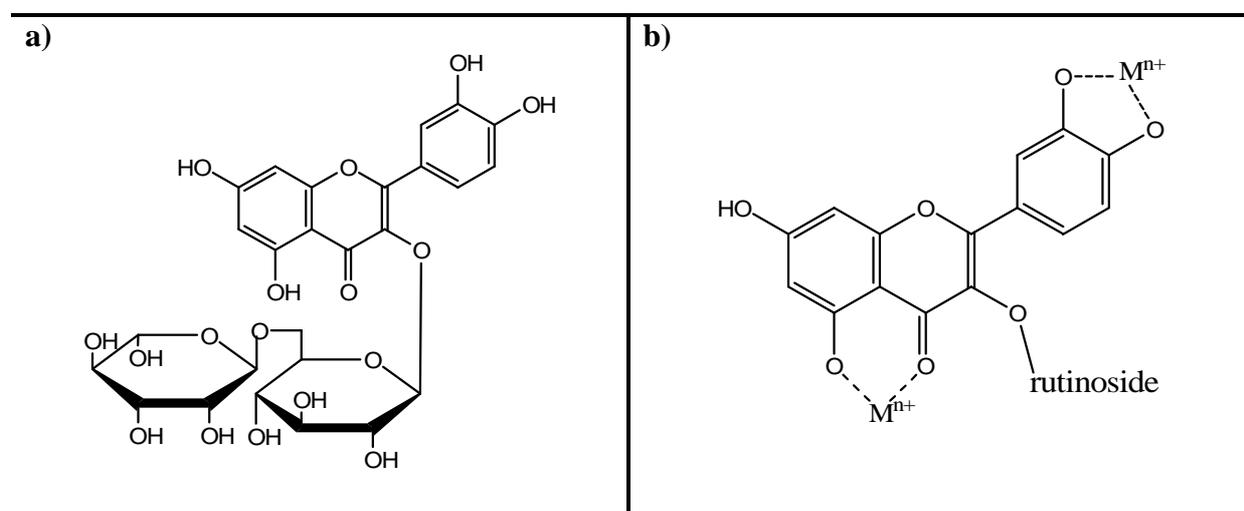
<sup>4</sup> Afanas'eva I.B. et *coll.*, 2001. *Biochem. Pharmacol.*, 61) 677-684.

<sup>5</sup> Negre-Salvayre A. et *coll.*, 1991. *Pharmacology*, 42, 262-272.

<sup>6</sup> de Souza R.F.V., De Giovanni W.F., 2004. *Redox Rep.*, 9, 97-104.

<sup>7</sup> Korkina L.G., Afanas'ev I.B., 1997. *Ad. Pharmacol.(San Diego, Calif.)*, 38, 151-163.

<sup>8</sup> Simić A. et *coll.*, 2007. *Molecules*, 12, 2327-2340.



**Figure 1.** a) Structure chimique de la rutine. b) Sites de complexation métallique de la rutine

Des travaux sur la complexation métallique de la rutine ont été rapportés.<sup>9, 10, 11, 12, 13, 14</sup> La rutine est capable de complexer les ions métalliques *via* deux sites de complexation: le groupement 5-hydroxy-4-carbonyle et le groupement *ortho*-dihydroxybenzène (catéchol) (**Figure 1b**).

Esparza et *coll.* ont effectué une étude électrochimique et théorique de la complexation de la rutine par  $Cu^{II}$  et  $Zn^{II}$ .<sup>12</sup> Ils en ont déduit que le 3-rutinoside peut aussi participer à la complexation métallique et que la rutine est capable de chélater à la fois trois ions métalliques.

Les complexes métalliques ont aussi été caractérisés par spectrométrie de masse.<sup>15</sup> Dans le cas de la complexation de la rutine par  $Cu^{II}$ , quatre complexes de différentes stoechiométries pourraient être produits, tandis que la complexation de  $Zn^{II}$  et de  $Fe^{II}$  par la rutine donnent seulement deux complexes de stoechiométrie 1:1 et 1:2.

<sup>9</sup> Malešev D., Kuntić V., 2007. *J. Serbian Chem. Soc.*, 72, 921-939.

<sup>10</sup> Kostyuk V.A. et *coll.*, 2007. *Cell. Mol. Biol.*, 53, 62-69.

<sup>11</sup> Kang J. et *coll.*, 2005. *Indian J. Chem. - Section A Inorg., Phys., Theo. Anal. Chem.*, 44, 2010-2014.

<sup>12</sup> Esparza I. et *coll.*, 2005. *Anal. Chim. Acta*, 543, 267-274.

<sup>13</sup> Mira L. et *coll.*, 2004. *Free Radical Res.*, 36, 1199-1208.

<sup>14</sup> Guo M. et *coll.*, 2007. *Dalton T.*, 43, 4951-4961.

<sup>15</sup> Bai Y. et *coll.*, 2004. *Anal. Sci.*, 20, 1147-1151.

L'oxydation de la rutine en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ou de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans un tampon phosphate (pH 8,0, 97°C) a été étudiée par spectroscopie UV-visible et HPLC.<sup>16</sup> Dans ces conditions, l'oxydation est plus rapide en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

La partie glycosidique de la rutine est responsable de la forte stabilité de la rutine. Le tableau 1 montre bien l'influence du sucre sur l'acidité et surtout sur le caractère réducteur de l'aglycone. En particulier, à pH neutre, la rutine est un mélange de forme neutre et de monoanion alors que la quercétine est un mélange de monoanion et dianion. La rutine est donc moins réductrice ou moins oxydable que la quercétine d'où une bien moins grande sensibilité à l'autoxydation en l'absence d'ion métallique ajouté.

**Tableau 1.** Les valeurs  $\text{pK}_a$  de E de la rutine et la quercétine

	Quercétine	Rutine
$\text{pK}_a$ a) <sup>17</sup>	5.54, 6.95, 8.21,	6.95, 8.30, 10.04
	9.77 (11.0)	(10.9)
$E^0$ (pH 3) b) <sup>18</sup>	-	1.02
$E^0$ (pH 7)	0.33	0.60
$E^0$ (pH 13.5)	-0.04	0.17

a) Escandar et Sala, 1991 (20°C, force ionique = 0.1 M) b)  $E^0$  : potentiel standard apparent du couple  $\text{ArOH}/\text{ArO}^\bullet$ , en V à 20°C (réf. = électrode normale à  $\text{H}_2$ ), Jovanovic *et al.*, 1996

Peu d'études cinétiques sur la complexation et l'autoxydation de la rutine ont été réalisées.<sup>19</sup> On note également l'absence de travaux sur l'identification des produits d'oxydation de la rutine. Afin de mettre en évidence l'influence de la glycosylation en position 3, il nous a paru intéressant d'étendre notre travail sur les interactions de la quercétine avec les ions du fer et du cuivre<sup>20</sup> au cas de la rutine dans les mêmes conditions.

<sup>16</sup> Makris D.P., Rossiter J.T., 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3830-3838.

<sup>17</sup> Escandar GM, Sala LF, 1991. *Can. J. Chem.*, 69, 1994-2001.

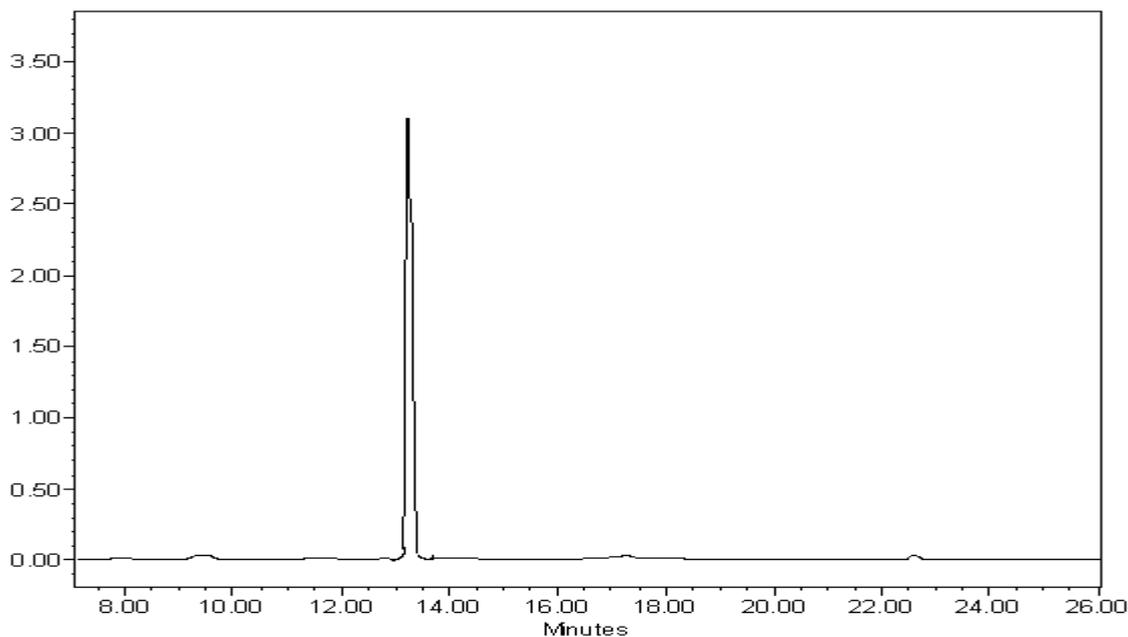
<sup>18</sup> Jovanovic SV. et coll., 1996. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2497-2504.

<sup>19</sup> Mahal H.S. et coll., 2005. *J. Phys. Chem. B*, 109, 24197-24202.

<sup>20</sup> EL Hajji H. et coll., 2006. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.

### 2-3-1 Stabilité de la rutine à p H 7.4, 37°C

En absence d'ion métallique, les analyses HPLC-UV ont montré que la rutine présente une grande stabilité dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C) sur 10 h (**Figure 2**). La présence du groupement rutinoside en position 3 diminue donc considérablement la sensibilité de l'aglycone quercétine à l'autoxydation.



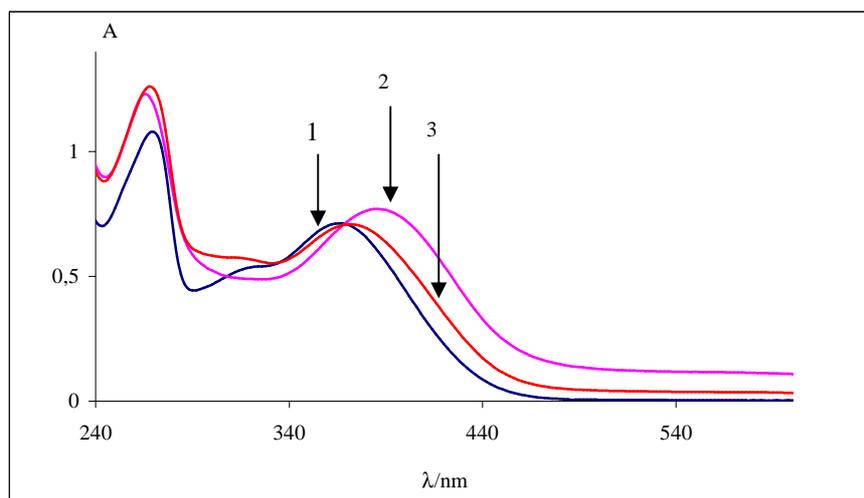
**Figure 2.** Analyse CLHP-UV des produits d'oxydation de la rutine  $10^{-3}$  M . Autoxydation sur 10 h de la rutine dans le tampon phosphate pH 7.4, 37°C.

### 2-3-2 Interaction de la rutine avec des ions du fer et du cuivre : Complexation

La complexation a été suivie par spectroscopie UV-visible dans les conditions habituelles (mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C).

#### 2-3-2-1 Complexation rutine-Fer à pH 7,4

En absence d'ion métallique et dans le tampon phosphate, la rutine est caractérisée par deux bandes d'absorption avec des maxima à 270 nm et 370 nm qui correspondent respectivement aux cycles A et B. L'addition croissante d'ions du fer à la solution de la rutine provoque l'apparition d'une nouvelle bande vers 390 nm caractéristique du complexe (**Figure 3**).

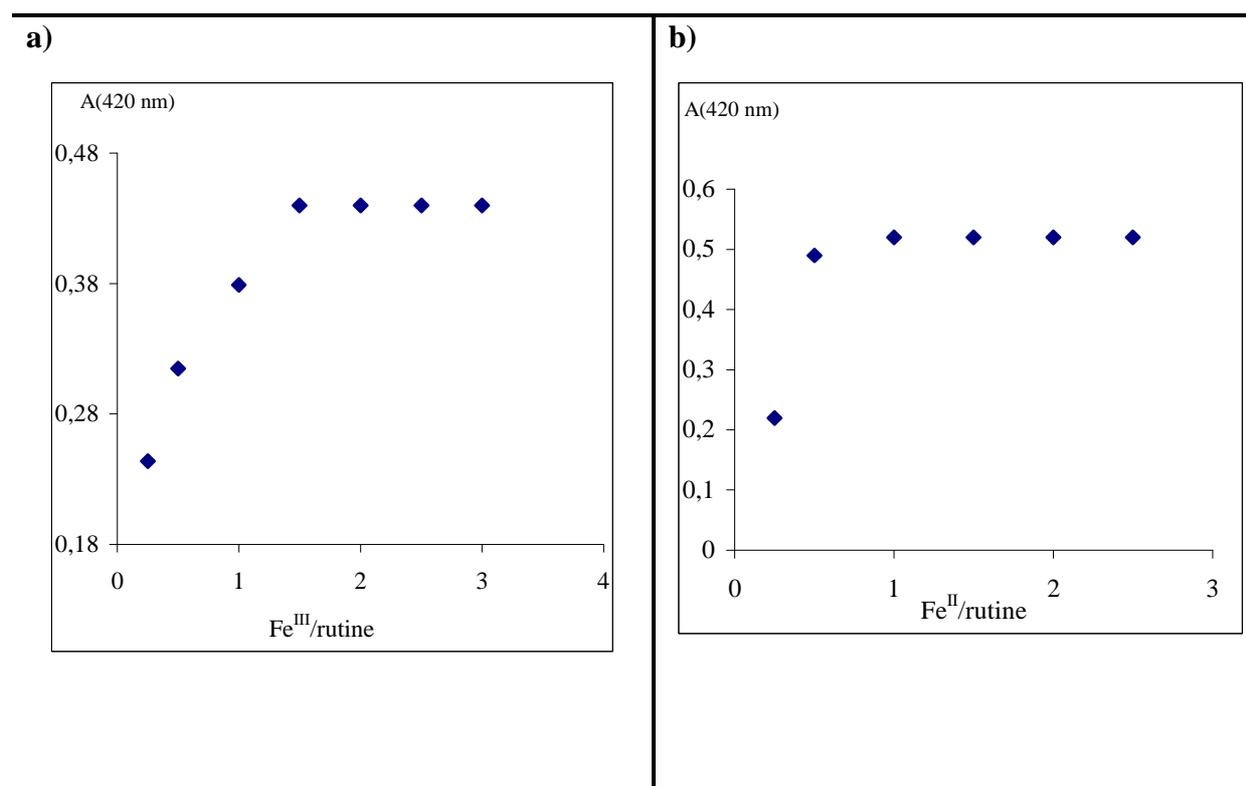


**Figure 3.** Complexation de la rutine (50 $\mu$ M) par 1 *équiv.* de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> dans le tampon phosphate /MeOH (1/1) à pH =7.4 et T= 37°C. **1** = rutine, **2**= Fe<sup>II</sup>/rutine, **3** = Fe<sup>III</sup>/rutine.

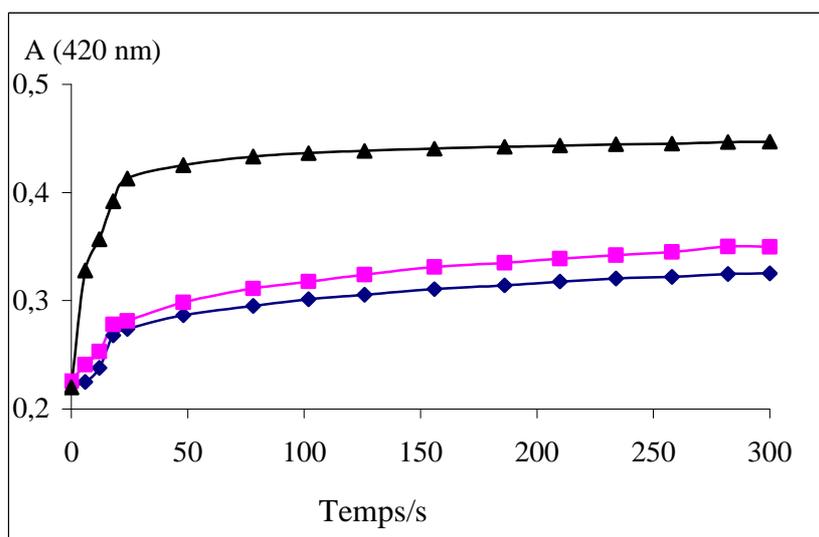
#### Complexation rutine-Fe<sup>III</sup>

En fin de complexation, l'absorbance du complexe rutine-Fe<sup>III</sup> à 420 nm augmente linéairement avec la concentration totale de Fe<sup>III</sup> (**Figure 5**). Pour un rapport molaire Fe<sup>III</sup>/rutine supérieur à 1,  $A_{\text{final}}(420 \text{ nm})$  atteint rapidement sa valeur maximale.

La variation de  $A_{\text{final}}(420 \text{ nm})$  en fonction du rapport molaire Fe<sup>III</sup>/rutine (**Figure 4**) suggère que le complexe est de stœchiométrie 1:1. Au-delà d'un équivalent de Fe<sup>III</sup>, l'absorbance du complexe est saturée.



**Figure 4.** Confirmation de la stoechiométrie 1 :1 pour : a) le complexe rutine (50 $\mu$ M)-Fe<sup>III</sup>.  
b) rutine (50 $\mu$ M)-Fe<sup>III</sup> (Tampon phosphate 0,01M/MeOH 1/1 pH =7.4, 37°C).



**Figure 5.** Suivi cinétique de la complexation rutine-Fe<sup>III</sup> (tampon phosphate 0,01M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).  $\blacklozenge$  Fe<sup>III</sup>/rutine =0,5,  $\blacksquare$  Fe<sup>III</sup>/rutine =1,  $\blacktriangle$  Fe<sup>III</sup>/rutine =2. rutine =50 $\mu$ M.

La complexation de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par la rutine est relativement lente et peut être divisée en deux étapes (Figure 5) : une première rapide qui pourrait correspondre à la formation d'un complexe labile  $(\text{rutine-Fe}^{\text{III}})_1$  qui évolue dans la deuxième étape en un complexe plus stable  $(\text{rutine-Fe}^{\text{III}})_2$ . On peut donc schématiser la complexation rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$  par deux réactions successives et quasi-irréversibles:



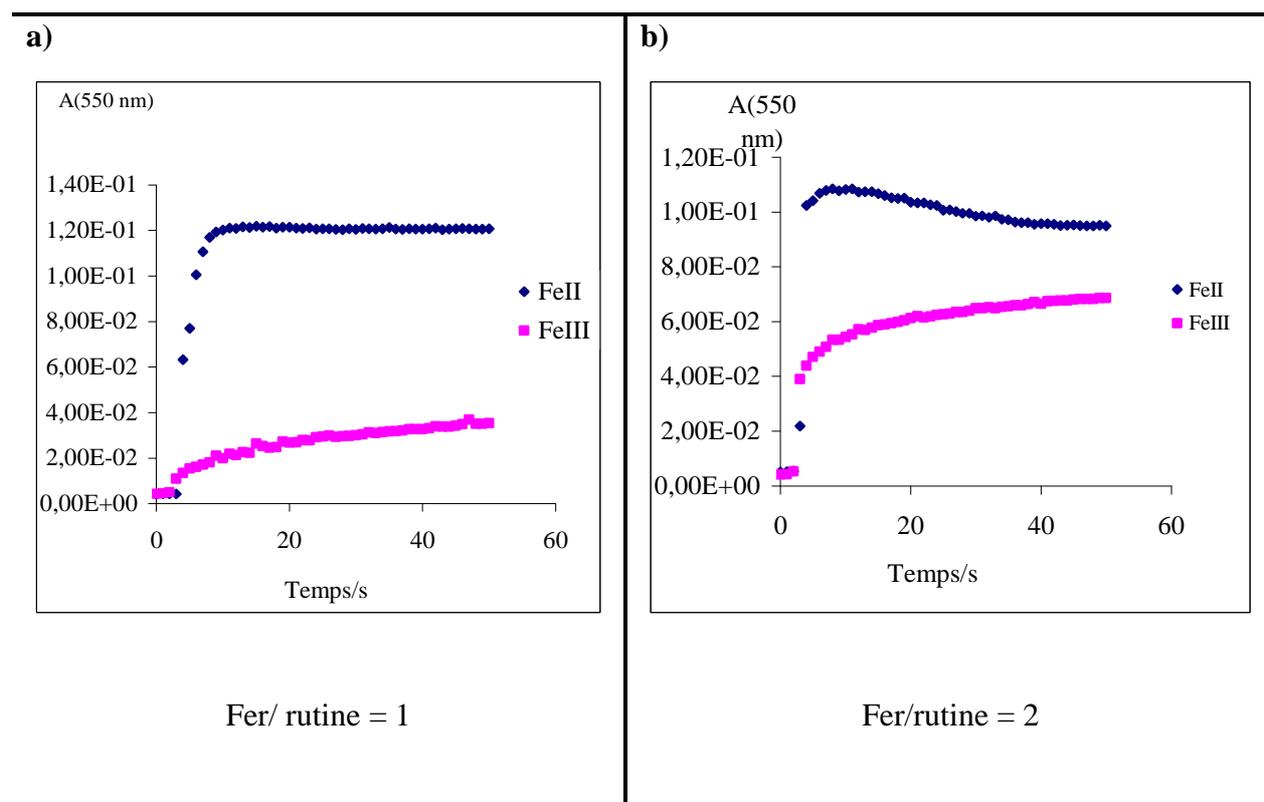
Une analyse quantitative a été réalisée sur 5 min à 420 nm et 550 nm pour déterminer les paramètres de la réaction de complexation du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par la rutine. On a reporté les valeurs de  $(k_1, \epsilon_1)$  et  $(k_2, \epsilon_2)$  qui correspondent respectivement aux complexes  $(\text{rutine-Fe}^{\text{III}})_1$  et  $(\text{rutine-Fe}^{\text{III}})_2$  avec l'hypothèse que la stœchiométrie est de type 1:1 (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Complexation  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -rutine dans le tampon phosphate à pH 7,4 et 37°C. Suivi spectroscopique à 420 ou 550 nm sur 5 min. Concentration de rutine = 50  $\mu\text{M}$ . a) complexation rapide

Rapport molaire rutine/ $\text{Fe}^{\text{III}}$	$k_1 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_2 / \text{s}^{-1}$	$\epsilon_1 / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_2 / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
$\lambda$ (nm)				
0,25; 420	3000	50 ( $\pm 3$ )	5580 ( $\pm 20$ )	8200 ( $\pm 70$ )
0,5 ; 420	4040 ( $\pm 170$ )	61 ( $\pm 2$ )	6590 ( $\pm 30$ )	8990 ( $\pm 40$ )
0,5 ; 550	4900 ( $\pm 600$ )	59 ( $\pm 6$ )	680 ( $\pm 20$ )	1440 ( $\pm 30$ )
1 ; 420	2090 ( $\pm 100$ )	39 ( $\pm 4$ )	6220 ( $\pm 30$ )	7560 ( $\pm 90$ )
1 ; 550	1060 ( $\pm 200$ )	34 ( $\pm 20$ )	510 ( $\pm 50$ )	940 ( $\pm 150$ )
1,5 ; 420	3040 ( $\pm 70$ )	78 ( $\pm 3$ )	7620 ( $\pm 20$ )	8950 ( $\pm 20$ )
1,5 ; 550	3600 ( $\pm 220$ )	62 ( $\pm 6$ )	950 ( $\pm 10$ )	1490 ( $\pm 20$ )
2 ; 420	2040 ( $\pm 50$ )	104 ( $\pm 4$ )	7480 ( $\pm 20$ )	8660 ( $\pm 10$ )
2 ; 550	1810 ( $\pm 60$ )	81 ( $\pm 4$ )	950 ( $\pm 10$ )	1410 ( $\pm 10$ )
2,5 ; 420	1590 ( $\pm 30$ )	117 ( $\pm 5$ )	7850 ( $\pm 20$ )	8730 ( $\pm 10$ )
2,5 ; 550	1560 ( $\pm 50$ )	86 ( $\pm 4$ )	1120 ( $\pm 10$ )	1480 ( $\pm 10$ )
3 ; 420	1620 ( $\pm 20$ )	113 ( $\pm 5$ )	8300 ( $\pm 10$ )	8950 ( $\pm 10$ )
3 ; 550	2000 ( $\pm 80$ )	57 ( $\pm 9$ )	1290 ( $\pm 10$ )	1620 ( $\pm 20$ )
5 ; 420 a)	-	-	-	9800
5 ; 550 a)	-	-	-	1780

Les valeurs de  $k_1$  et  $k_2$  ne présentent pas de dépendance significative en fonction de la concentration totale de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Elles sont en accord acceptable selon que l'analyse a lieu à 420 ou à 550 nm. Le complexe (rutine- $\text{Fe}^{\text{III}})_1$  ( $k_1 = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) se transforme rapidement en complexe stable (rutine- $\text{Fe}^{\text{III}})_2$  ( $k_2 = 4.12 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Le réarrangement du 1<sup>er</sup> complexe en le second peut être dû à la coordination d'ions phosphate.

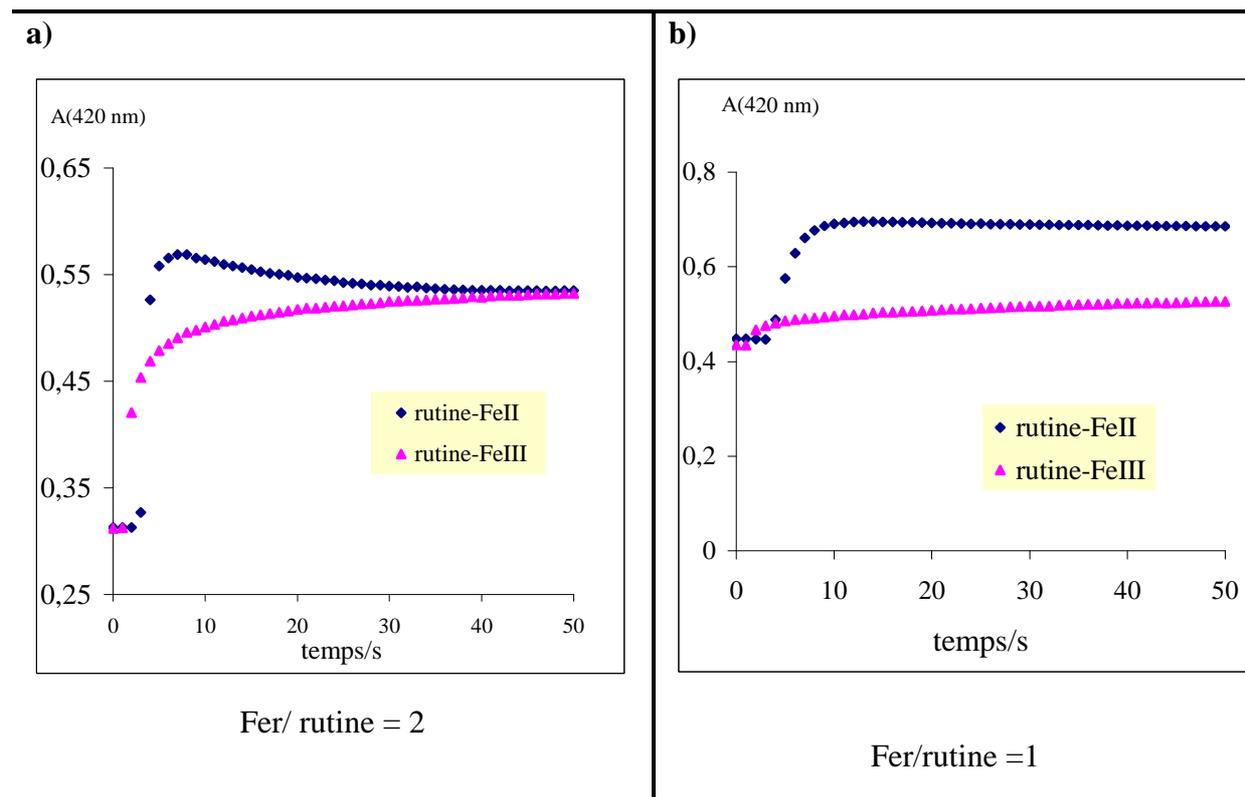
Quand au  $\rho = 1$ , le complexe de rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  à 550 nm est lent après l'étape rapide de complexation (**Figure 6a**). Au contraire quand  $\rho > 1$  le complexe à 550 nm se transforme rapidement au deuxième complexe qui est produit par l'autoxydation rapide de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ou par réarrangement du 1<sup>er</sup> complexe en deuxième, probablement en raison de la présence des ions phosphates (**Figure 6b**).



**Figure 6.** Suivi cinétique de la complexation de la rutine par les ions du fer dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. a) Fer/rutine = 1. b) Fer/rutine = 2

### Complexation rutine-Fe<sup>II</sup>

L'ajout de Fe<sup>II</sup> à une solution de rutine produit des complexes rutine-Fe<sup>II</sup> qui absorbent dans le domaine 390-400 nm (**Figure 3**). Le suivi spectroscopique de la variation de A(420 nm) en fonction du temps montre que la complexation de Fe<sup>II</sup> par la rutine est plus rapide que la complexation de Fe<sup>III</sup> (**Figure 7**), probablement en raison d'une compétition plus forte de la rutine avec les ions phosphate pour Fe<sup>III</sup>.



**Figure 7.** Suivi cinétique de la complexation de la rutine (50 µM) par les ions du fer dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. a) Fer/rutine = 2. b) Fer/rutine = 1.

Quand le rapport molaire rutine/fer est inférieur à 1, la complexation de Fe<sup>III</sup> apparaît lente. La complexation de Fe<sup>II</sup> est beaucoup plus rapide et conduit à un complexe stable en quelques secondes. En revanche, quand le rapport molaire rutine/fer est supérieur ou égal à 1, la complexation de Fe<sup>II</sup> conduit à un premier complexe qui évolue rapidement en un second comme le montre le déclin de A(420 nm). Au bout d'une minute, les absorbances à 420 nm tendent vers une valeur commune pour les deux états redox, ce qui suggère un état identique en accord avec une autoxydation rapide de Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup>.

L'analyse cinétique peut être conduite à 388 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du complexe Fe<sup>II</sup>-rutine, ou à 420 nm pour comparaison avec la complexation Fe<sup>III</sup>-rutine (plus facile à détecter à cette longueur d'onde), ou encore à 300 nm où les ions du fer absorbent fortement. Elle a été conduite sur 45 secondes pour cerner au mieux le phénomène rapide de complexation puis répétée sur 2 minutes pour mieux mettre en évidence l'évolution éventuelle des complexes. Ces analyses permettent de déterminer les paramètres des différentes étapes ( $k_i$ ,  $\epsilon_i$ ) (tableaux 3a, 3b et 3c). On note  $\rho$  le rapport molaire polyphénol/ion métallique.

**Tableau 3a.** Complexation Fe<sup>II</sup>-rutine (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 420 nm sur 45 s ou 2 min. Concentration de rutine = 50  $\mu$ M. a) 3 étapes apparentes, lente croissance de A(420 nm) après 50 s non traitée.

$\rho$	$10^{-3}k_1 / M^{-1}s^{-1}$	$10^3k_2 / s^{-1}$	$\epsilon_1 / M^{-1}cm^{-1}$	$\epsilon_2 / M^{-1}cm^{-1}$
0,25 ; 2 min	7,9 ( $\pm$ 0,2)	-	20690 ( $\pm$ 30)	-
0,5 ; 2 min	9,1 ( $\pm$ 0,9)	-	16390 ( $\pm$ 220)	-
1 ; 2 min	6,3 ( $\pm$ 0,5)	119 ( $\pm$ 6)	15980 ( $\pm$ 470)	11060 ( $\pm$ 20)
1 ; 45 s	6,9 ( $\pm$ 1,1)	186 ( $\pm$ 20)	15650 ( $\pm$ 1160)	9890 ( $\pm$ 70)
1,5 ; 2 min a)	9,7 ( $\pm$ 0,7)	234 ( $\pm$ 16)	11870 ( $\pm$ 310)	9680 ( $\pm$ 10)
1,5 ; 45 s	11,0 ( $\pm$ 0,6)	253 ( $\pm$ 11)	11350 ( $\pm$ 210)	9340 ( $\pm$ 10)
2 ; 2 min a)	20,5 ( $\pm$ 0,4)	66 ( $\pm$ 3)	9640 ( $\pm$ 20)	8740 ( $\pm$ 10)
2 ; 45 s	13,3 ( $\pm$ 0,4)	195 ( $\pm$ 9)	10410 ( $\pm$ 70)	9190 ( $\pm$ 10)
2,5 ; 2 min a)	-	147 ( $\pm$ 2)	-	-
2,5 ; 45 s	8,6 ( $\pm$ 0,2)	133 ( $\pm$ 6)	9970 ( $\pm$ 40)	8770 ( $\pm$ 10)
3 ; 2 min a)	-	181 ( $\pm$ 3)	-	-
3 ; 45 s	-	93 ( $\pm$ 2)	-	-

**Tableau 3b.** Complexation Fe<sup>II</sup>-rutine (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 388 ou 300 nm sur 45 s et analyse cinétique de la 2<sup>e</sup> étape seulement. Concentration de rutine = 50 µM. a) absorbance maximale à la fin de l'étape rapide:  $\epsilon_1 = 14370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  à 388 nm. b)  $A_f$ : absorbance finale à 300 nm.

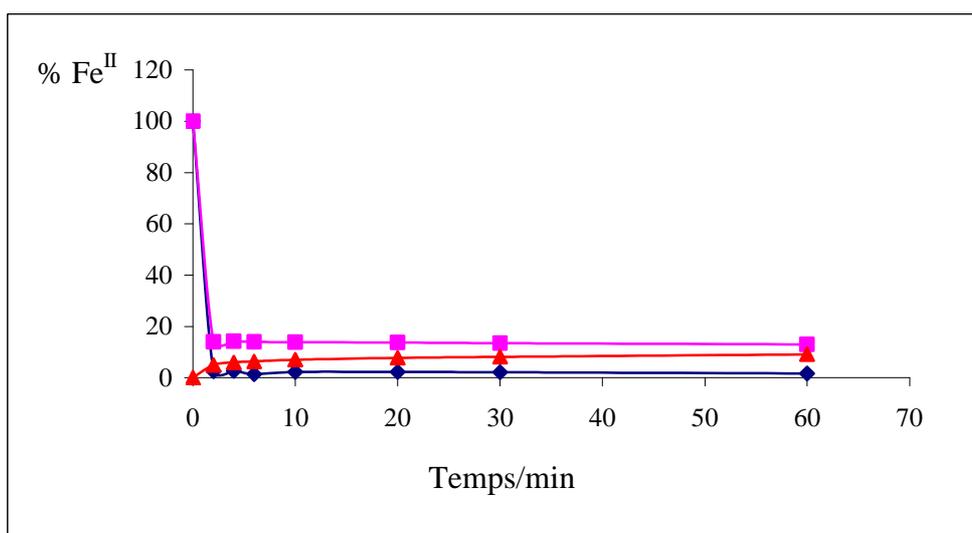
$\rho, \lambda / \text{nm}$	$A_1$ a)	$10^3 k_2 / \text{s}^{-1}$	$\epsilon_2 / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ or $A_f$ b)
1 ; 388	0,711	70 ( $\pm$ 2)	13730 ( $\pm$ 20)
1 ; 300 c)	-	191 ( $\pm$ 7)	0,472
1,5 ; 388	0,713	166 ( $\pm$ 10)	14070 ( $\pm$ 10)
1,5 ; 300 c)	-	120 ( $\pm$ 3)	0,527
2 ; 388	0,728	147 ( $\pm$ 3)	14290 ( $\pm$ 10)
2 ; 300 c)	-	144 ( $\pm$ 4)	0,590
2,5 ; 388	0,719	75 ( $\pm$ 2)	13920 ( $\pm$ 10)
2,5 ; 300 c)	-	129 ( $\pm$ 4)	0,640
3 ; 388	0,721	82 ( $\pm$ 2)	14160 ( $\pm$ 10)
3 ; 300 c)	-	125 ( $\pm$ 3)	0,702

**Tableau 3c.** Complexation Fe<sup>II</sup>-rutine (2<sup>e</sup> étape, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique sur 2 min. Concentration de rutine = 50 µM. a) absorbance à la fin de l'étape rapide de complexation. b)  $A_f$ : absorbance finale.

$\rho, \lambda / \text{nm}$	$10^3 k_2 / \text{s}^{-1}$	$10^3 k_3 / \text{s}^{-1}$	$A_1$ a)	$A_f$ b)
0,25 ; 388	-	-	0,664	id
0,25 ; 300	-	-	0,435	id
0,5 ; 388	71 ( $\pm$ 8)	13 ( $\pm$ 3)	0,741	0,720
0,5 ; 300	149 ( $\pm$ 12)	9 ( $\pm$ 1)	0,461	0,474
1 ; 388	80 ( $\pm$ 3)	2 ( $\pm$ 4)	0,770	0,723
1 ; 300	251 ( $\pm$ 8)	15,7 ( $\pm$ 0,7)	0,527	0,560
1,5 ; 388	193 ( $\pm$ 51)	44 ( $\pm$ 2)	0,727	0,704
2,5 ; 388	142 ( $\pm$ 2)	-	0,658	0,643
2,5 ; 300	218 ( $\pm$ 4)	23,4 ( $\pm$ 0,8)	0,476	0,613
3 ; 388	163 ( $\pm$ 6)	16 ( $\pm$ 4)	0,629	0,615
3 ; 300	208 ( $\pm$ 4)	24,5 ( $\pm$ 0,7)	0,444	0,651
4 ; 300	183 ( $\pm$ 3)	23,2 ( $\pm$ 0,4)	0,645	0,841

Les résultats des tables appellent les commentaires suivants :

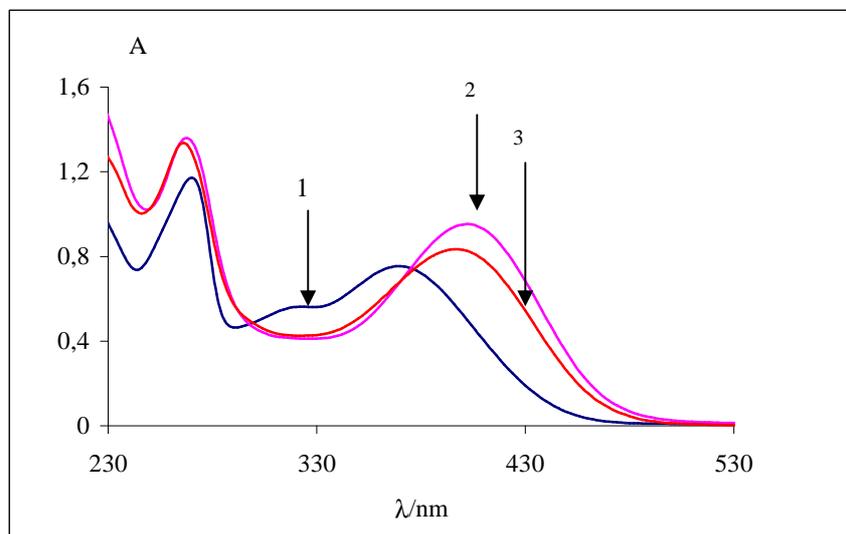
- Quand  $\rho$  passe de valeurs inférieures à des valeurs supérieures à 1, la valeur de  $\epsilon_1(420 \text{ nm})$  passe de  $2 \times 10^4$  à  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  comme si un nouveau complexe était formé. En outre, pour  $\rho < 1$ , une seule étape est observée comme si  $\text{Fe}^{\text{II}}$  était peu sensible à l'autoxydation dans le complexe. Ces résultats pourraient traduire la formation de complexes  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -rutine stables de stœchiométrie 1:2 voire 1:3.
- La complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par la rutine est complète en 5 secondes environ après addition du  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . En conséquence, seul l'ordre de grandeur de  $k_1$  peut être estimé :  $k_1 \cong 5\text{-}10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .
- Au delà de l'étape de complexation, l'analyse à 388, 420 et 300 nm montre l'apparition d'une deuxième étape rapide quand  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est en excès. Cette étape pourrait correspondre à l'autoxydation du complexe rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}$  en rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Nous obtenons l'ordre de grandeur suivant pour la constante de vitesse apparente du 1<sup>er</sup> ordre :  $k_2 = 7\text{-}25 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (tableaux 3a, 3b), d'où une période de demi-vie de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  lié ( $\text{Ln}2/k_2$ ) estimée à  $7 (\pm 4) \text{ s}$ . Le dosage de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  confirme que l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est rapide avec ou sans la rutine (**Figure 8**). Un bon accord est observé entre les valeurs de  $\epsilon_2(420 \text{ nm})$  (**Tableaux 2 et 3a**), ce qui suggère que les complexes de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  correspondants sont identiques bien que formés selon des voies différentes (liaison directe de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ou liaison de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  puis autoxydation).
- L'analyse sur 2 min permet même de distinguer une 3<sup>e</sup> étape lente ( $k_3 = 2\text{-}3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**Tableau 3c**) qui pourrait être liée à un réarrangement dans la sphère de coordination de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  dû aux ions de phosphate.



**Figure 8.** Autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) en absence ou en présence de rutine (1 équiv.) (tampon phosphate pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ ).  $\blacklozenge$   $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\blacksquare$  rutine+  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\blacktriangle$  rutine+  $\text{Fe}^{\text{III}}$

### 2-3-2-2 Complexation rutine-cuivre à pH 7,4

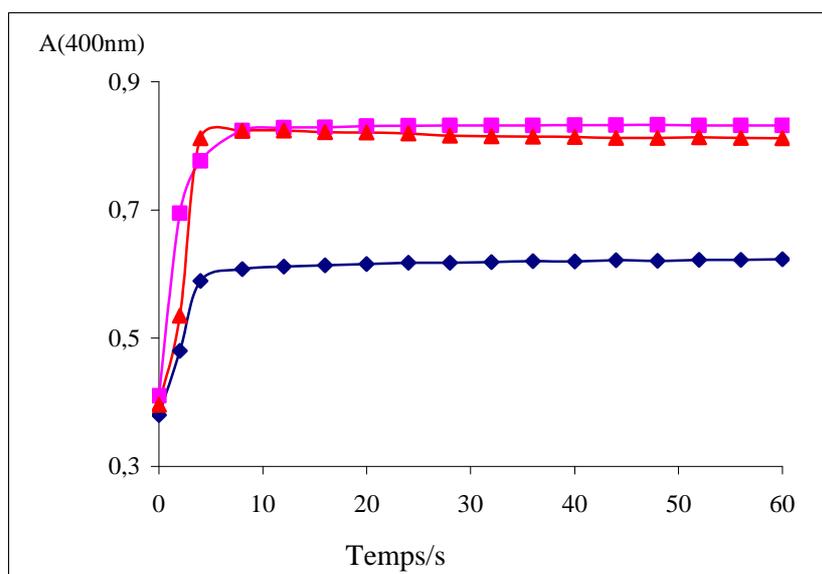
L'ajout de concentrations croissantes de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{II}}$  à une solution de rutine produit des changements plus importants dans le spectre UV de la rutine que dans le cas des ions du fer (**Figure 9**).



**Figure 9.** Complexation de la rutine (50  $\mu\text{M}$ ) par 2 *equiv.*  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. Complexation de rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$ / $\text{Cu}^{\text{II}}$  sur une minute. **1**= rutine, **2** = rutine/  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , **3** = rutine/  $\text{Cu}^{\text{II}}$

#### Complexation rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$

Quand la complexation est suivie sur 1 minute au maximum d'absorption du complexe (400 nm) et dans le cas  $\rho \leq 1$  (**Figure 10**), une seule étape est observée et un palier est très rapidement atteint (au bout des 10 premières secondes). Le déclin de A (400 nm) qui traduit la réduction  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans le complexe ou l'oxydation de ligand après la complexation, n'est pas observée. Il semble donc que le complexe formé soit stable dans ces conditions.

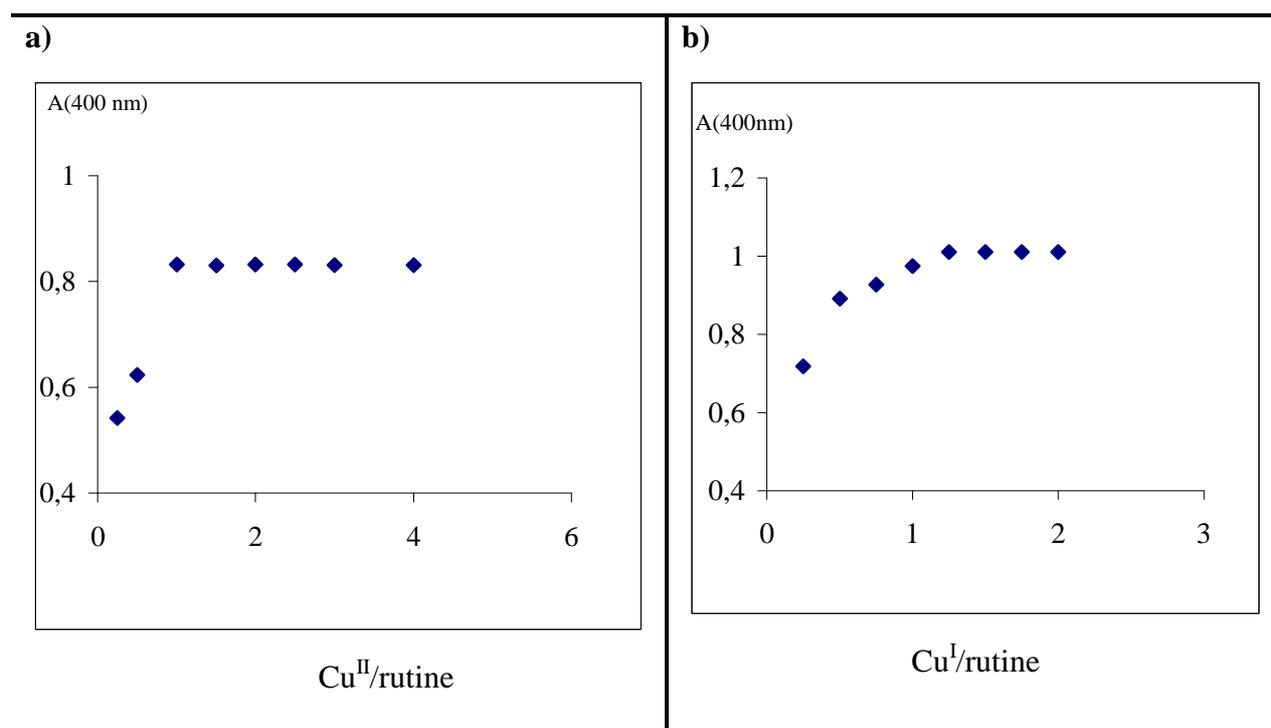


**Figure 10.** Suivi cinétique de la complexation rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  à pour différents rapports molaires rutine/ $\text{Cu}^{\text{II}}$  (Tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).  $\blacklozenge$   $\rho=0.5$ ,  $\blacksquare$   $\rho=1$ ,  $\blacktriangle$   $\rho=2$ .

Pour  $\rho > 1$ , deux étapes sont observées, une étape rapide liée à la complexation (complète en 5 s environ) suivie par une deuxième étape où l'absorbance à 400 nm commence à diminuer lentement, ce qui pourrait s'interpréter par la réduction du complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  en le complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

A 210 nm, les ions du cuivre présentent une bande d'absorption ( $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) qui pourrait permettre de mettre en évidence des éventuels changements dans l'état redox ou la coordination du centre métallique. Le suivi cinétique à 210 nm sur 1 min montre que  $A(210 \text{ nm})$  croît rapidement au cours de la complexation puis reste inchangée (**Figure 13**). A partir des valeurs finales de l'absorbance à 210 nm, on peut estimer la valeur du coefficient d'absorption molaire apparent des ions du cuivre en présence de rutine ( $\epsilon'$ ) en utilisant l'équation suivante :  $A_f = A_0(\text{rutine}) + \epsilon' \cdot C$ . On en déduit :  $\epsilon' = 1820 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . L'absorbance des ions du cuivre à 210 nm est fortement abaissée par la complexation.

La variation de l'absorbance finale à 400 nm en fonction de la concentration de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  suggère que le complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  est de stœchiométrie 1:1 (**Figure 11 a**).



**Figure 11.** Tracé de l'absorbance finale du complexe en fonction du rapport molaire Cu/rutine. Complexes rutine-Cu<sup>II</sup> (11 a) et rutine-Cu<sup>I</sup> (11 b) (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).

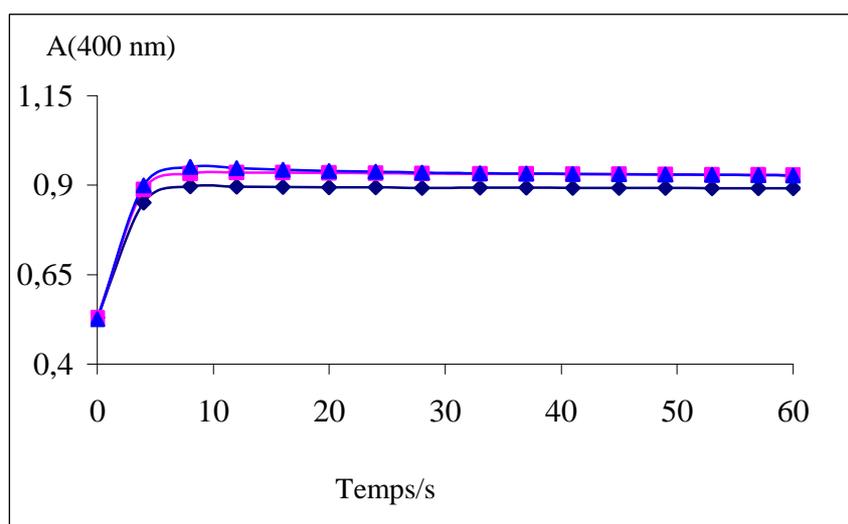
L'ordre de grandeur de la constante de vitesse  $k_1$  de formation du complexe peut être estimé dans l'hypothèse de la formation d'un seul complexe de stœchiométrie 1:1 (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Complexation Cu<sup>II</sup>-rutine dans un tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C. Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 min. Concentration de la rutine = 50  $\mu$ M.

Rapport molaire rutine/Cu <sup>II</sup>	$10^{-3}k_1 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\epsilon_1 / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
0,5	17,2 ( $\pm$ 0,7)	17140 ( $\pm$ 30)
1	43,5 ( $\pm$ 1,7)	16790 ( $\pm$ 20)
1,5	28,4 ( $\pm$ 1,5)	16770 ( $\pm$ 20)

### Complexation rutine-Cu<sup>I</sup>

Le suivi cinétique à 400 nm montre que la complexation est rapide (terminée en quelques secondes), ce qui ne permet pas d'estimer la valeur de la constante de vitesse correspondante (**Figure 12**).

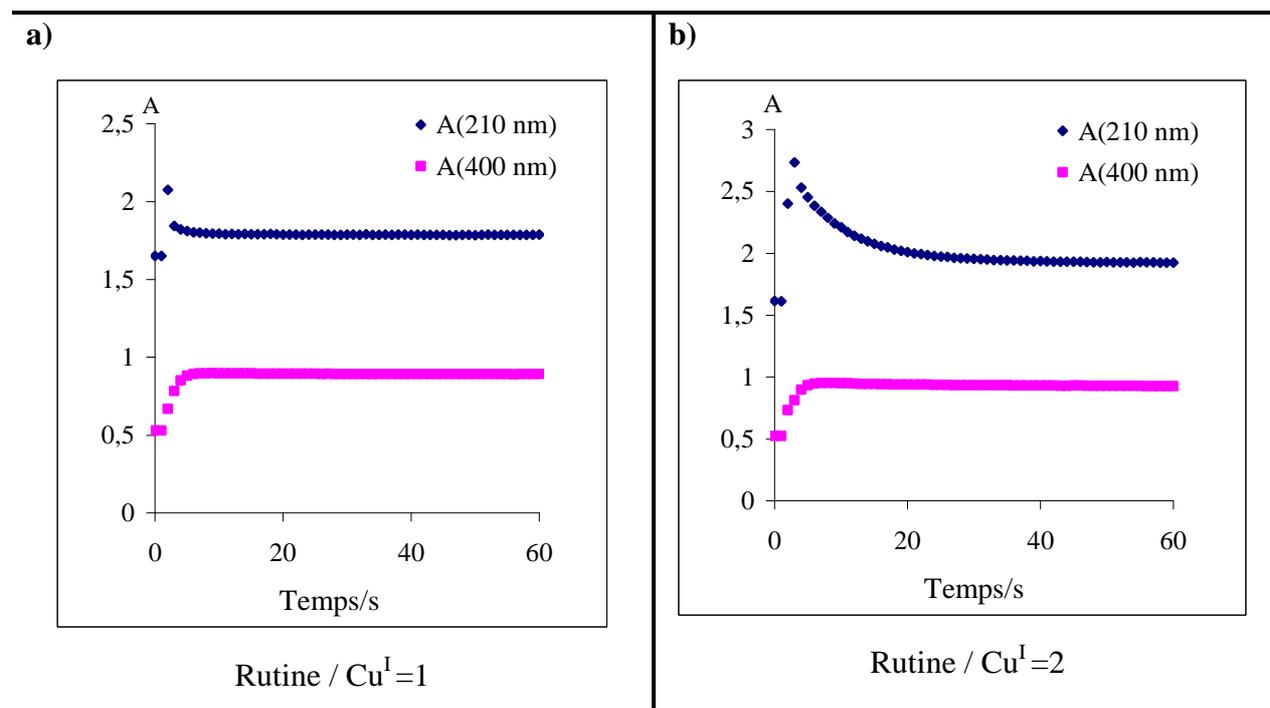


**Figure 12.** Suivi cinétique de la complexation rutine-Cu<sup>I</sup> pour différents rapports molaires Cu<sup>I</sup>/rutine (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C). ♦  $\rho = 0,5$  ; ■  $\rho = 1$ , ▲  $\rho = 2$ .

En excès de rutine ( $\rho \leq 1$ ), A(400 nm) et A(210 nm) sont couplés (**Fig. 13a**) alors qu'en excès d'ion métallique ( $\rho > 1$ ), ils sont partiellement découplés : au delà de la complexation rapide, un déclin monoexponentiel (constante de vitesse apparente  $k_2$ ) relativement lent de A(210 nm) est observé alors que A(400 nm) reste stable. Au terme du déclin de A(210 nm), l'absorbance finale est proche de celle obtenue après addition d'une concentration identique de Cu<sup>II</sup> (**Figure 13 b**). Ainsi, l'excès de Cu<sup>I</sup> semble jouer un rôle important dans l'évolution du complexe initial. Il pourrait s'agir d'un transfert d'électron du complexe Cu<sup>I</sup>-rutine vers Cu<sup>I</sup>-O<sub>2</sub> avec formation du complexe Cu<sup>II</sup>-rutine. Une réaction de ce type a déjà été proposée dans le mécanisme d'oxydation du catéchol en présence de Cu<sup>II</sup>.<sup>21</sup>

<sup>21</sup> Kamau P, Jordan RB., 2002. *Inorg.Chem.*, 41, 3076-3083

A partir des valeurs de  $A(210 \text{ nm})$  au terme de l'étape rapide de complexation, on peut estimer la valeur du coefficient d'absorption molaire apparent des ions du cuivre en présence de rutine par la relation  $A_f = A_0(\text{rutine}) + \epsilon' C$ . On obtient :  $\epsilon' = 4280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . L'absorbance de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  est donc peu modifiée par complexation ( $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pour les ions du cuivre dans le tampon phosphate).



**Figure 13.** Complexation de la rutine par  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . Variation de  $A(400 \text{ nm})$  et de  $A(210 \text{ nm})$  en fonction du temps (tampon phosphate (0,01 M)/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).

L'analyse du déclin de  $A(210 \text{ nm})$  permet d'estimer la valeur de  $k_2$  (**Tableau 5**).

**Tableau 5.** Evolution du complexe  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -rutine en présence d'un excès de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 210 nm sur 1 min. Concentration de rutine = 50  $\mu\text{M}$ .

Rapport molaire $\text{Cu}^{\text{I}}$ /rutine	$k_2 / \text{s}^{-1}$
1,25	0,127 ( $\pm 0,007$ )
1,5	0,164 ( $\pm 0,002$ )
2	0,125 ( $\pm 0,001$ )

### 2-3-2-3 Conclusion

Pour tous les ions métalliques étudiés, la complexation de la rutine se traduit par de forts déplacements bathochromes vers 400-450 nm.

La complexation métallique de la rutine dans le tampon phosphate à pH neutre est plus rapide particulièrement avec les ions du cuivre. Au-delà d'un équivalent d'ion métallique, la formation du complexe semble totale, en accord avec une stoechiométrie 1:1 et une réaction quasi-irréversible. L'affinité de la rutine est plus forte pour les ions du cuivre que pour les ions du fer. Ceci peut probablement traduire une compétition plus faible entre la rutine et les ions phosphate pour les ions du cuivre voire un changement de site de complexation, si les ions du cuivre se lient au groupement 5-hydroxy-4-carbonyl malgré la forte liaison hydrogène intramoléculaire dans laquelle est engagé ce groupement. De plus l'addition des ions du cuivre à une solution de rutine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), provoque un déplacement bathochrome ( $\Delta\lambda=40$  nm) plus important que dans le cas des ions du fer (10-20 nm). Le tableau 6 pourrait être l'occasion de faire le point sur les  $\lambda_{\max}$  des différents complexes de la rutine et la quercétine ainsi les constantes de vitesse de complexation.

**Tableau 6.** Les longueurs d'ondes maximales ( $\lambda_{\max}$ ) et les constantes de vitesse des complexes lors de complexation de la rutine et la quercétine par  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ .

	n(équivalent)					$k_1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
	0	0,5	1	1,5	2	
Quercétine- $\text{Fe}^{\text{II}}$	268-380	268-400	268-400	268-408	268-424	$5-10 \times 10^3$
Quercétine- $\text{Fe}^{\text{III}}$	268-380	268-380	268-380	268-382	268-386	$2-4 \times 10^3$
Quercétine- $\text{Cu}^{\text{I}}$	268-380	272-422	274-428	276-430	280-436	$13-17 \times 10^3$
Quercétine- $\text{Cu}^{\text{II}}$	266-380	266-380	266-396	272-434	272-435	$4-8 \times 10^3$
Rutine - $\text{Fe}^{\text{II}}$	268-370	268-388	268-388	268-388	268-388	$5-10 \times 10^3$
Rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$	268-370	268-370	268-372	268-376	268-380	$1-5 \times 10^3$
Rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$	268-370	268-400	268-402	268-404	268-410	$> 5 \times 10^4$
Rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$	268-370	268-390	268-394	268-396	268-402	$2-5 \times 10^4$

Les déplacements bathochromes sont beaucoup plus importants dans le cas des interactions de la quercétine avec les ions métalliques, en particulier avec  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ , que dans le cas des interactions de la rutine avec les ions du fer et cuivre. Ceci peut être expliqué par la complexation d'ion cuivre par la quercétine via le groupement 3-hydroxyl-4-carbonyl, catéchol et le groupement 5-hydroxy-4-carbonyle. De plus les constantes de complexation de la quercétine par  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  sont faibles que les constantes des complexes rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  et rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ . La partie glycoside de la rutine permet d'augmenter forcément la constante apparente de formation du complexe.

En excès de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , deux réactions ont été observées après l'étape rapide de complexation. Une première réaction relativement rapide qui pourrait correspondre à l'autoxydation du complexe rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}$  en rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$  et une deuxième réaction lente qui traduit le réarrangement du complexe rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$  en un complexe plus stable. Dans le cas de la complexation de la rutine par  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , un réarrangement dans la sphère de coordination semble également intervenir.

Après complexation rapide de la rutine par  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , l'autoxydation du complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$  en rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  est détectée, en présence d'un excès de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  tandis qu'une seule étape de complexation est observée dans le cas rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Quand la rutine est en excès, il semble que les complexes rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}$  et rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$  soient stables sur les intervalles de temps courts qui sont utilisés dans l'étude de complexation.

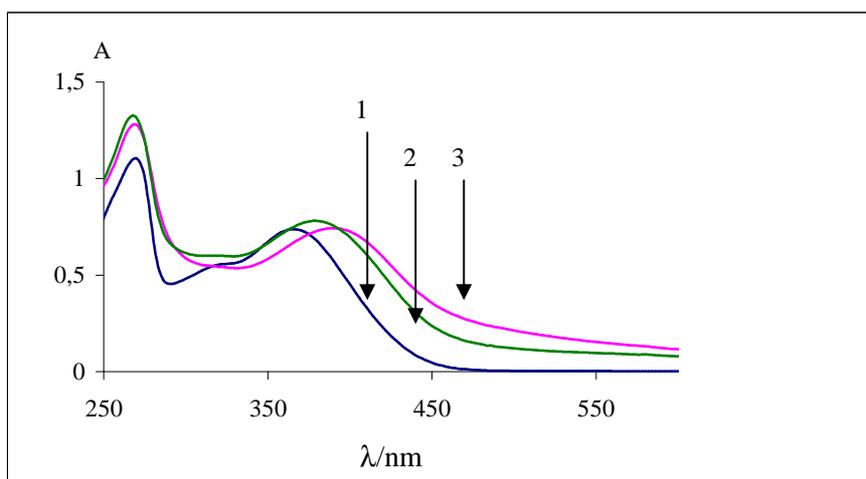
La rutine est capable de chélater les ions du cuivre via le groupement 5-hydroxy-4-carbonyle ou le noyau catéchol alors que la liaison des ions du fer au seul noyau catéchol reste la plus probable. Lors des premières minutes qui suivent la complexation, l'autoxydation de la rutine au sein des complexes semble négligeable (sur la base de la stabilité de l'absorption des complexes à  $\lambda \geq 400$  nm).

### 2-3-3 Interaction de la rutine avec des ions du fer et du cuivre: Oxydation

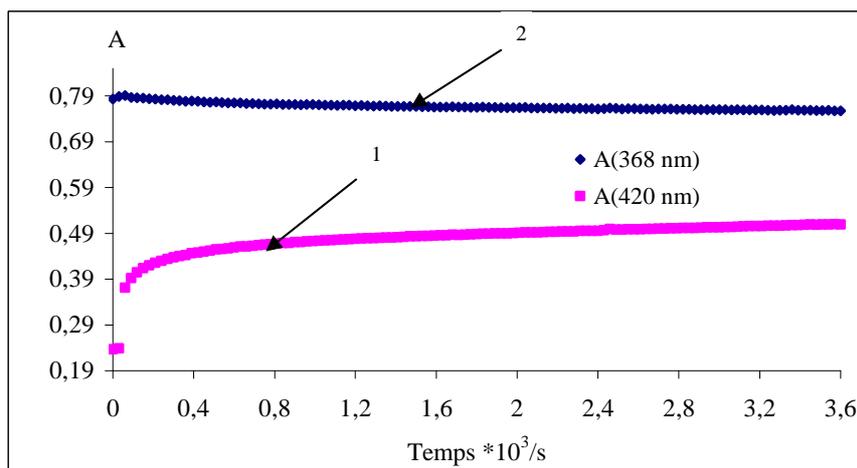
#### 2-3-3-1 Autoxydation de la rutine initiée par les ions du fer.

##### Sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

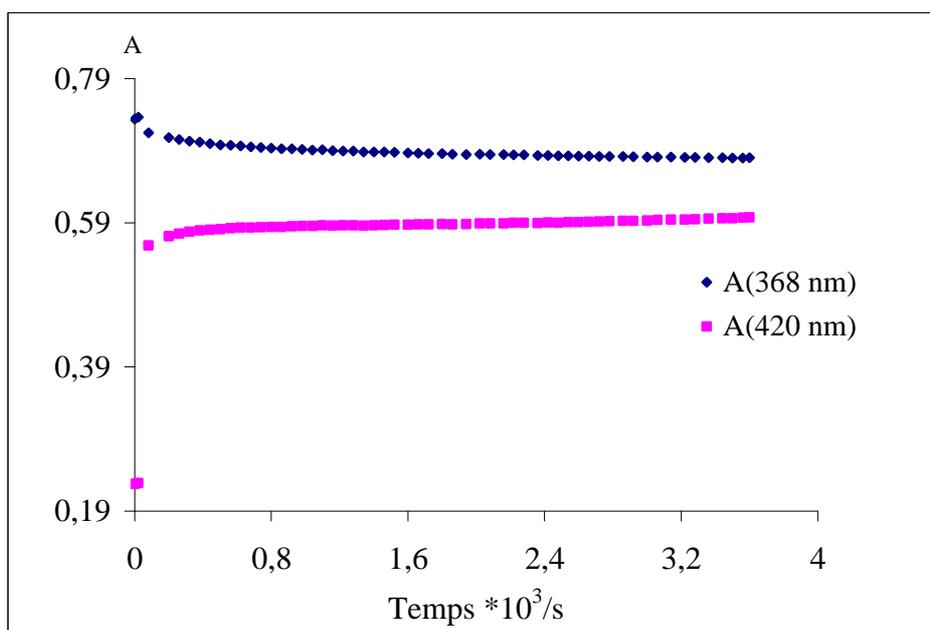
L'autoxydation de la rutine initiée par les ions du fer a été suivie sur une heure par spectroscopie UV-visible (**Figures 14, 15 et 16**).



**Figure 14.** Autoxydation sur 1 h de la rutine (50μM), initiée par 1 *equiv.* Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup> dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. **1** = rutine, **2**= rutine-Fe<sup>III</sup>, **3** = rutine-Fe<sup>II</sup>.



**Figure 15.** Suivi cinétique de l'autoxydation de la rutine (50μM) en présence de Fe<sup>III</sup> (1 *equiv.*). **1**= A( 420 nm), **2**= A(368 nm)

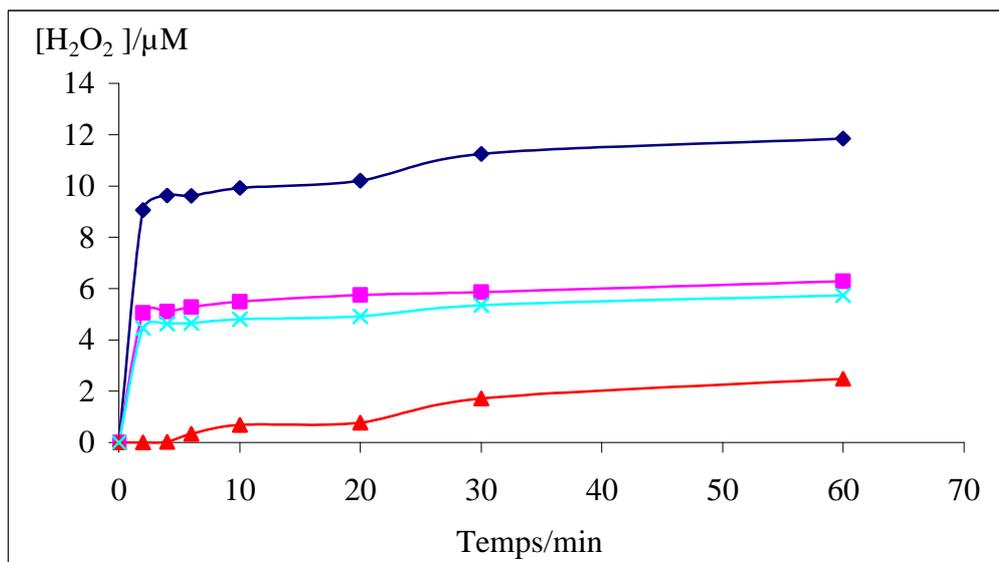


**Figure 16.** Suivi cinétique de l'autoxydation de la rutine (50µM) en présence de Fe<sup>II</sup> (1 équiv.).

Après addition des ions du fer, le suivi cinétique sur une heure ne met en évidence que des changements spectraux mineurs qui suggèrent que l'autoxydation de la rutine est négligeable.

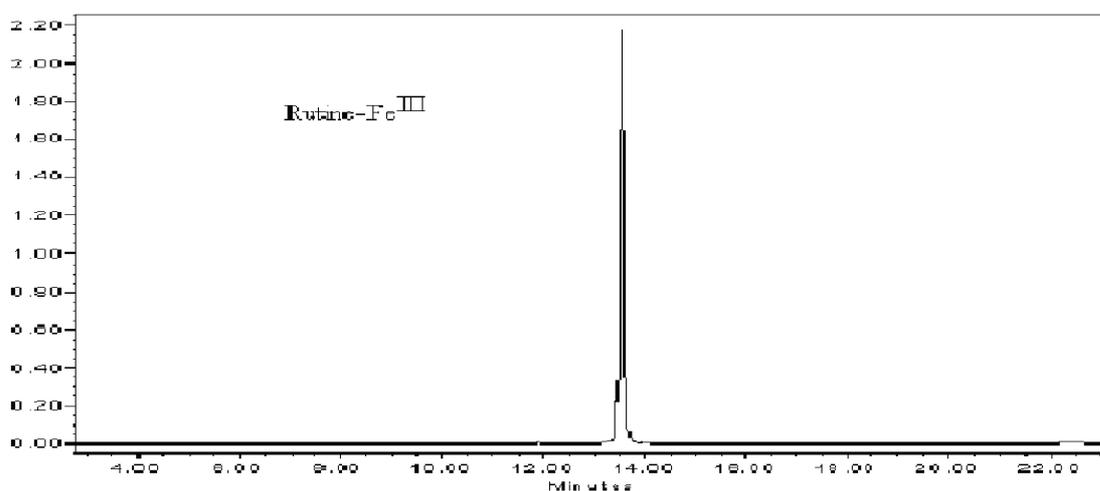
Le dosage de Fe<sup>II</sup> par la méthode à la ferrozine confirme que l'autoxydation de Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup> est rapide avec ou sans rutine dans le tampon phosphate (**Figure 8**). La réduction de Fe<sup>III</sup> par la rutine n'est pas observée. Malgré l'autoxydation rapide de Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup>, la valeur de A(420 nm) une heure après l'addition de Fe<sup>II</sup> reste nettement plus forte qu'après l'addition de Fe<sup>III</sup> (**Figs 14 & 15**). Il semble donc qu'une étape très lente se manifeste encore dans le mécanisme de complexation de Fe<sup>III</sup> par la rutine. L'amorce d'une précipitation (avec diffusion d'une partie de la lumière incidente) n'est pas exclue.

Les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produites sur une heure par l'autoxydation de la rutine (50 µM) amorcée par les ions du fer (1 equiv.) sont faibles (**Figure 17**) : au plus 5% en présence de Fe<sup>III</sup> et au plus 10-12% pour Fe<sup>II</sup>.



**Figure 17.** Concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulées lors de l'autoxydation de la rutine ( $100 \mu\text{M}$ ) en présence d'ion métallique (1 equiv.) (tampon phosphate, pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ ).  $\blacktriangle$  rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\times$  rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\blacksquare$  rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\blacklozenge$  rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

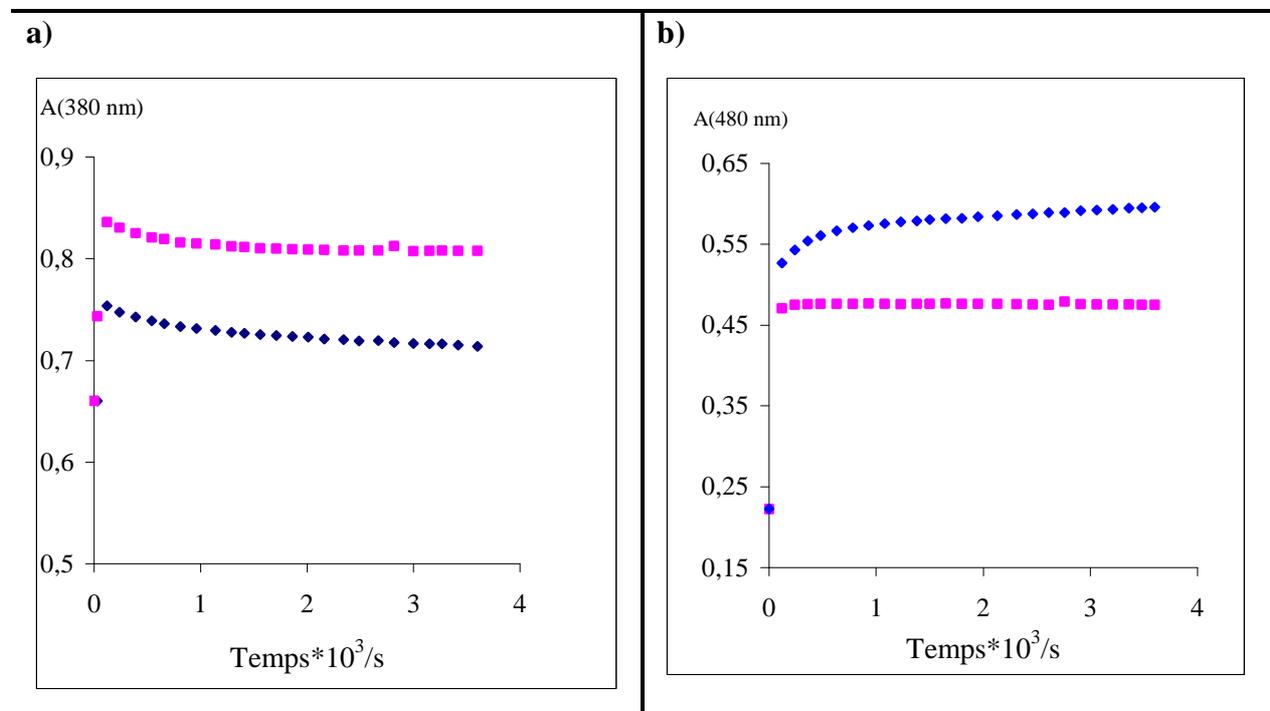
Malgré l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et la production possible d'espèce oxygénées réactives (EOR), l'oxydation de la rutine en présence des ions du fer semble marginale. Les analyses HPLC-UV confirment que le complexe rutine- $\text{Fe}^{\text{III}}$  reste stable sur 7h (**Figure 18**).



**Figure 18.** Analyse CLHP-UV-DAD d'oxydation de la rutine ( $10^{-3}\text{M}$ ) en présence 2 equiv  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Autoxydation de la rutine en présence  $\text{Fe}^{\text{III}}$  pendant 7h dans le tampon phosphate pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ .

Avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'influence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 équiv.) sur la stabilité du complexe rutine-Fe<sup>II</sup> a été étudiée (Figure 19).



**Figure 19.** Suivi cinétique d'oxydation de la rutine (50  $\mu$ M) en présence 3 *équiv* de Fe<sup>II</sup> avec et sans 10 *équiv* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 37°C et pH 7.4. ■ En absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ◆ En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pour un rapport molaire Fe<sup>II</sup>/rutine  $\leq 1$ , le complexe, dont l'absorbance à 380 nm est suivie sur 1h, est quasiment stable. L'influence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas observée dans ce cas.

Pour un rapport molaire Fe<sup>II</sup>/rutine  $\geq 1$ , l'addition de 10 équivalents de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accélère l'oxydation du complexe. L'absorbance à 480 nm augmente avec décroissance simultanée de l'absorbance du complexe à 380 nm. Le suivi spectroscopique montre que l'oxydation s'effectue en deux étapes. Une première étape rapide qui correspond à la complexation et une seconde étape lente qui pourrait correspondre à l'oxydation du complexe rutine-fer.

Les variations de  $A(480 \text{ nm})$  en fonction du temps et pour différentes concentrations de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sont analysées selon un modèle biexponentiel (**Tableau 7**). Dans cette approche,  $k_1$  est une constante de vitesse apparente de complexation et  $k_2$  la constante de vitesse apparente d'oxydation.

**Tableau 7.** Oxydation du complexe  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -rutine en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (tampon phosphate à pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ ). Suivi spectroscopique à 480 nm sur 1h et analyse selon un modèle biexponentiel. Concentration de rutine =  $50 \mu\text{M}$ . Concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  =  $500 \mu\text{M}$ .

Rapport molaire rutine/ $\text{Fe}^{\text{II}}$	$10^3 k_1 / \text{s}^{-1}$	$10^5 k_2 / \text{s}^{-1}$	$A_f^{\text{a)}$
1	43 ( $\pm 2$ )	61 ( $\pm 2$ )	0,135
1,5	55 ( $\pm 2$ )	66 ( $\pm 2$ )	0,163
2	60 ( $\pm 2$ )	78 ( $\pm 2$ )	0,171
2,5	63 ( $\pm 3$ )	90 ( $\pm 3$ )	0,178
4	77 ( $\pm 3$ )	107 ( $\pm 4$ )	0,175

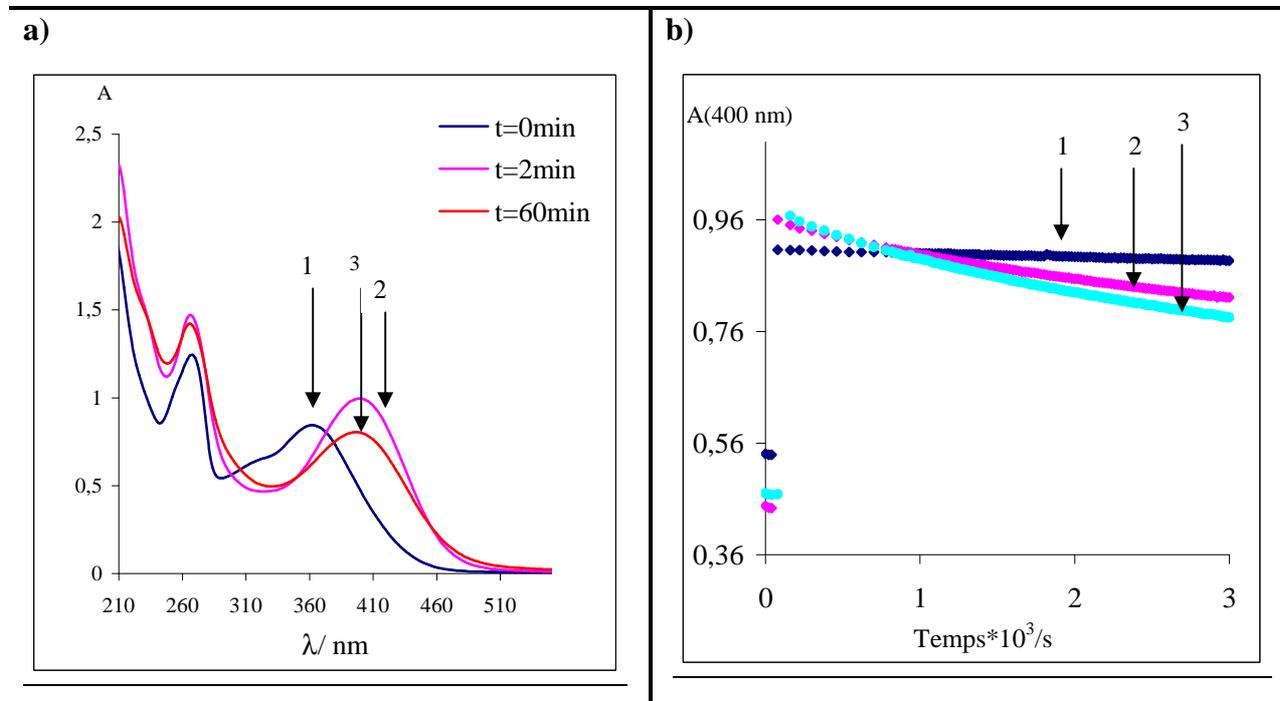
a) absorbance finale

Les valeurs présentées dans le tableau montrent que  $k_1$  et  $k_2$  dépendent de la concentration de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Dans ce système, la période de demi-vie de la rutine ( $\text{Ln}2/k_2$ ) varie de 10 à 20 min selon la concentration de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

### 2-3-3-2 Autoxydation de la rutine catalysée par les ions du cuivre

En absence de  $H_2O_2$

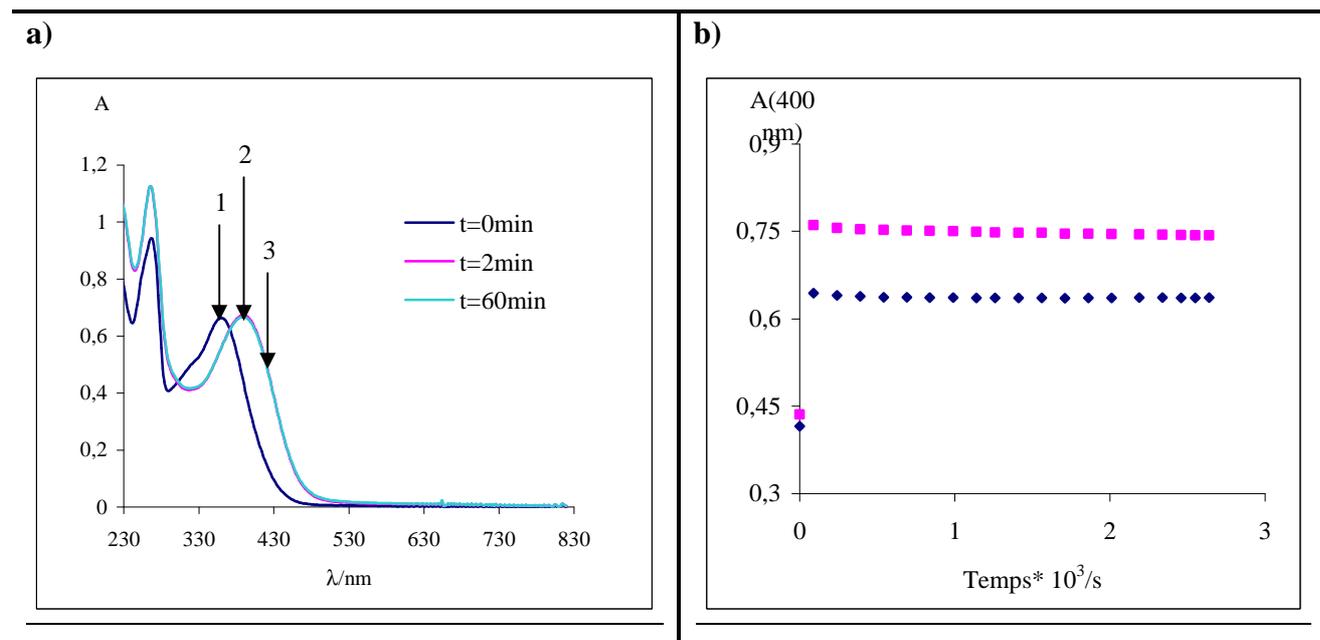
L'évolution du complexe  $Cu^I$ -rutine dans le tampon phosphate a été suivie sur une heure par spectroscopie UV-visible (**Figure 20**).



**Figure 20.** a) Autoxydation de la rutine (50 µM) en présence de  $Cu^I$  (50 µM) (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4 37°C) **1**= 0min, **2**= 2min, **3**= 60min. b) Suivi cinétique pour différents rapports molaire  $Cu^I$ /rutine. **1**= ( $\rho = 0,5$ ), **2**= ( $\rho = 1$ ), **3**= ( $\rho = 2$ ).

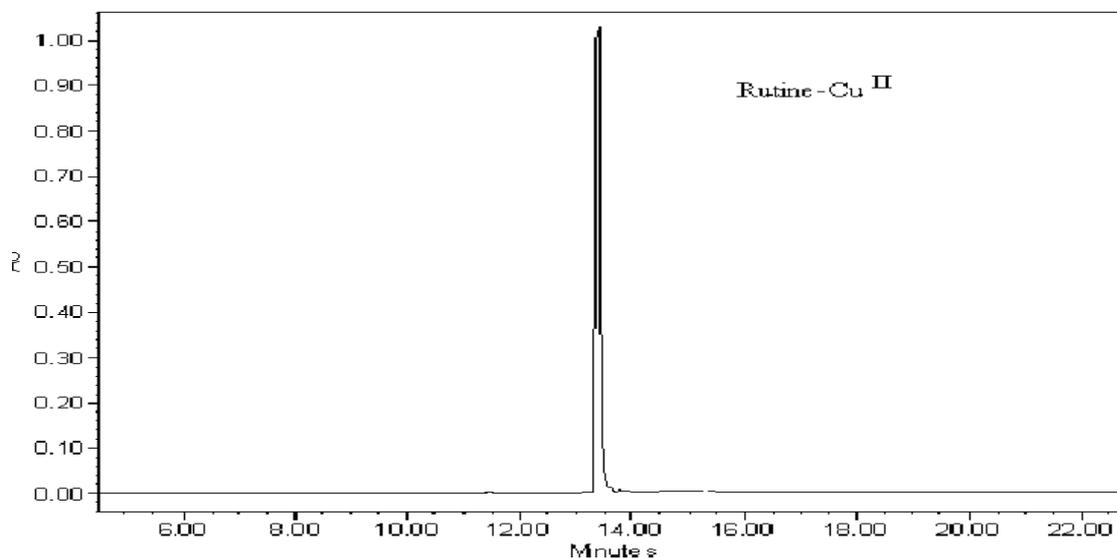
Quand  $\rho < 1$  (rutine en excès), le complexe rutine- $Cu^I$  est quasiment stable sur une heure. L'autoxydation de la rutine semble marginale dans ces conditions.

Dans  $\rho \geq 1$  ( $Cu^I$  en excès), un lent déclin est observé. Il est attribué à l'oxydation de la rutine au sein du complexe. Ce phénomène est marginal avec les complexes du fer mais aussi avec le complexe  $Cu^{II}$ -rutine (**Figure 21**).



**Figure 21.** a) Autoxydation de la rutine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4 37°C). b) Suivi cinétique pour différents rapports molaires  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /rutine.  $\blacklozenge$   $\rho=1$ ,  $\blacksquare$   $\rho=3$ .

L'analyse HPLC confirme que le complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  est stable sur 7h (**Figure 22**).



**Figure 22.** Analyse CLHP-UV-DAD d'oxydation de la rutine ( $10^{-3}\text{M}$ ) en présence 2 *equiv*  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Autoxydation de la rutine en présence  $\text{Cu}^{\text{II}}$  pendant 7h dans le tampon phosphate pH 7.4, 37°C.

L'analyse du déclin de l'absorbance du complexe rutine-Cu<sup>I</sup> à 400 nm selon un modèle biexponentiel conduit aux résultats rapportés dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8.** Autoxydation du complexe Cu<sup>I</sup>-rutine (2<sup>e</sup> étape, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 h. Concentration de rutine = 50 µM.

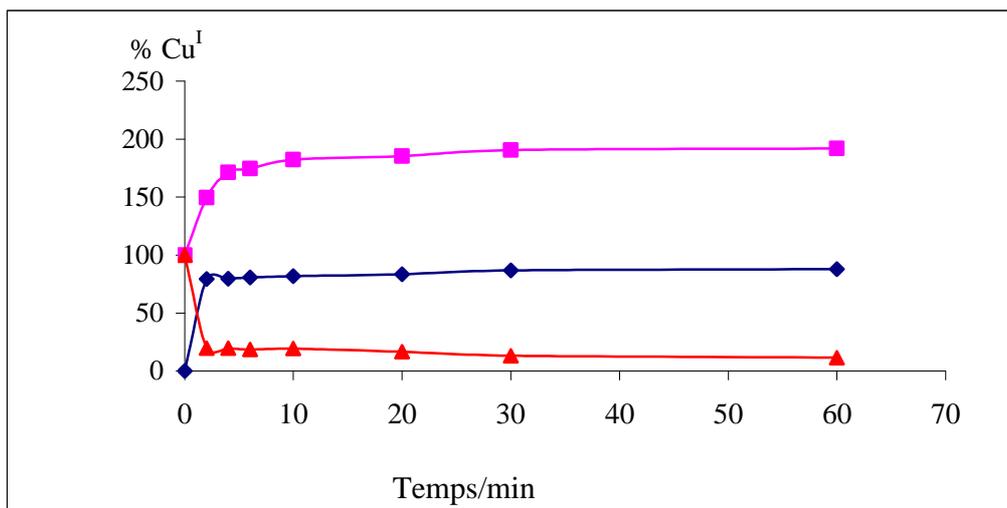
Rapport molaire rutine/Cu <sup>I</sup>	A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> k <sub>2</sub> / s <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> k <sub>3</sub> / s <sup>-1</sup>	A <sub>f</sub> <sup>b)</sup>
1	0,444, 0,960	50 (± 4)	264 (± 4)	0,708
1,5	0,449, 0,986	127 (± 4)	296 (± 3)	0,678
2	0,469, 0,991	196 (± 10)	342 (± 4)	0,681
2,5	0,447, 0,985	206 (± 10)	366 (± 3)	0,657
3	0,536, 0,988	443 (± 37)	249 (± 2)	0,646

<sup>a)</sup> absorbance maximale en fin d'étape rapide (complexation), <sup>b)</sup> absorbance finale.

La valeur de k<sub>2</sub> (5-44x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) croît linéairement avec la concentration totale de Cu<sup>I</sup> alors que k<sub>3</sub> (25-37x10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>) est indépendante de la concentration de Cu<sup>I</sup>.

L'autoxydation amorcée par Cu<sup>I</sup> nécessite au moins un équivalent de Cu<sup>I</sup> et implique une première étape rapide (complexation) avec oxydation temporaire de Cu<sup>I</sup> en Cu<sup>II</sup> (voir l'analyse à 210 nm sur 1 min) dans le complexe sans oxydation notable de la rutine.

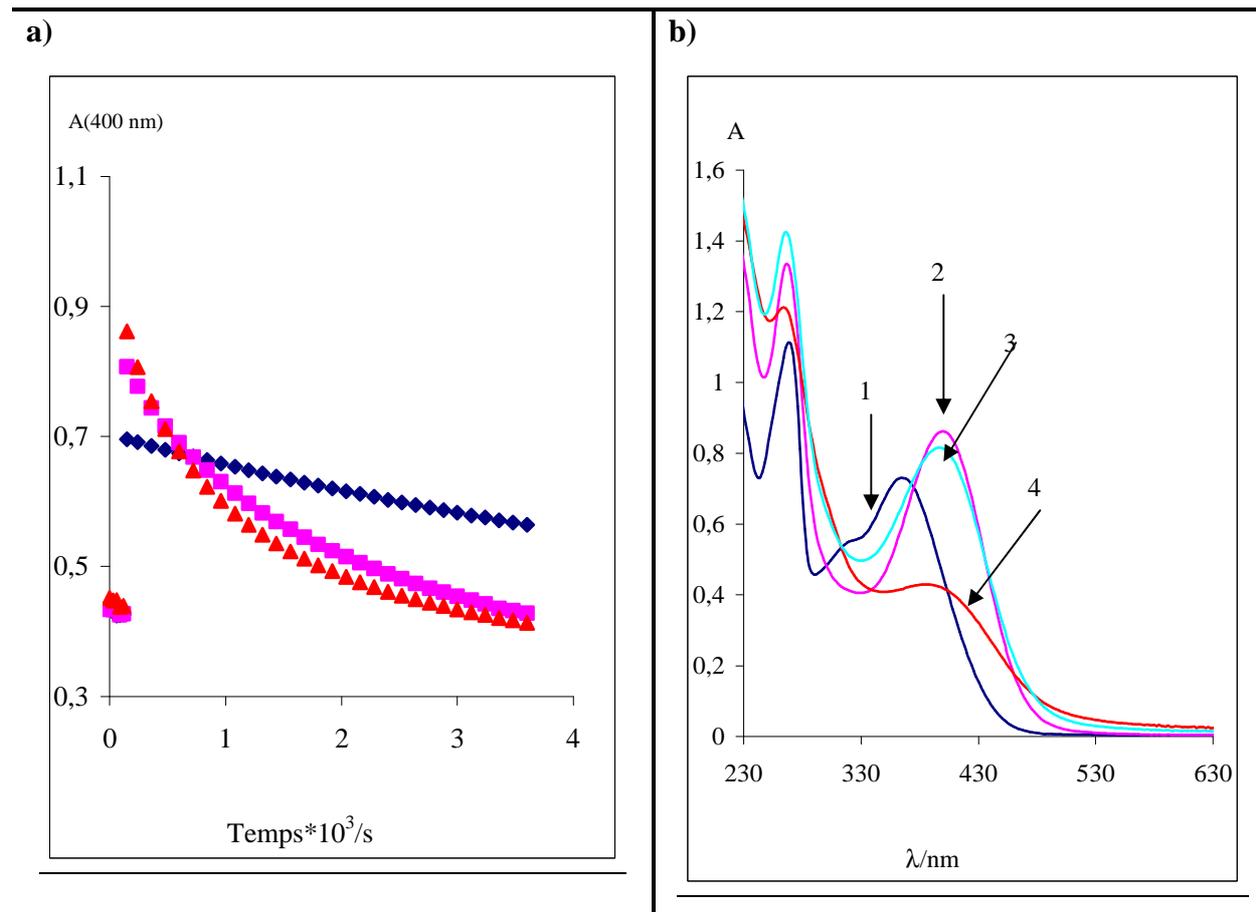
Les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulées restent faibles, au plus 10-12% et 20-25% après une heure d'autoxydation de la rutine en présence de Cu<sup>II</sup> et Cu<sup>I</sup>, respectivement (**Figure 17**). Dans le cas du système Cu<sup>I</sup>-rutine où l'autoxydation est notable, il est possible que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé soit assez rapidement décomposé (réaction de Fenton), ce qui empêcherait son accumulation. De façon inattendue, le dosage de Cu<sup>I</sup> dans le système Cu<sup>I</sup>-rutine par la méthode à la bathocuproïne (BC) conduit à des résultats absurdes (% Cu<sup>I</sup>>100%), ce qui pourrait refléter l'interaction de la rutine ou de ses produits d'oxydation avec le complexe BC-Cu<sup>I</sup> (formation d'un complexe ternaire) qui fausserait l'analyse (**Figure 23**). Quoiqu'il en soit, il semble bien que la forme stable des ions du cuivre en présence de rutine ou de ses produits d'oxydation soit bien Cu<sup>I</sup>, comme nous l'avons déjà observé avec la quercétine.



**Figure 23.** Evolution de la teneur en Cu<sup>I</sup> en absence ou en présence de rutine (1 *equiv.*) (Tampon phosphate pH 7,4, 37°C). ▲ Cu<sup>I</sup>, ■ rutine-Cu<sup>I</sup>, ◆ rutine-Cu<sup>II</sup>

#### En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Quand l'étude précédente est reprise en présence de 10 équivalents de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le déclin de l'absorbance du complexe à 400 nm apparaît beaucoup plus rapide. Il s'accompagne de la croissance de A(300 nm), ce qui pourrait correspondre à la formation des produits d'oxydation de la rutine (**Figure 24**). Là encore, on note un déclin de A(400 nm) beaucoup plus rapide quand Cu<sup>I</sup> est en excès.



**Figure 24.** a) Suivi cinétique de l'évolution du complexe rutine-Cu<sup>I</sup> en présence de différents rapports molaires Cu<sup>I</sup>/rutine et de 10 équiv. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C). ♦  $\rho = 0,5$ , ■  $\rho = 1$ , ▲  $\rho = 2$ . b) Oxydation de la rutine (50  $\mu$ M) en présence de Cu<sup>I</sup> (1 équiv.) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 équiv.). **1**= rutine (t=0 min), **2**= rutine-Cu<sup>I</sup>(t=2 min), **3**= rutine-Cu<sup>I</sup>(t= 60 min, **4** = rutine-Cu<sup>I</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>( t=60min).

L'analyse du déclin de A(400 nm) selon un modèle biexponentiel conduit aux résultats rapportés dans le **Tableau 9**. Par rapport à la réaction sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Tableau 8**), on constate que la valeur de  $k_2$  est plus faible et quasi-constante ( $k_2 = 3\text{-}4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) et que la valeur de  $k_3$  est plus élevée et peu dépendante de la concentration de Cu<sup>I</sup> quand celui-ci est en excès ( $k_3 = 6(\pm 2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

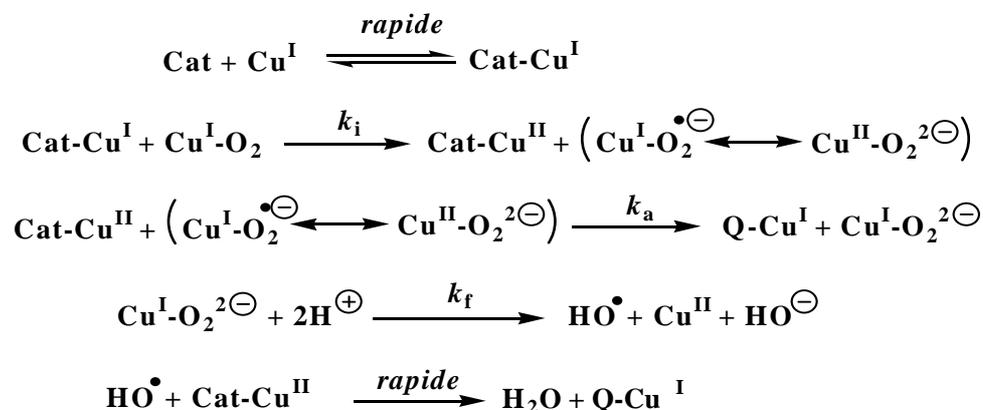
**Tableau 9.** Oxydation du complexe Cu<sup>I</sup>-rutine en présence de 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2<sup>e</sup> étape, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 h. Concentration de rutine = 50 μM.

Rapport molaire rutine/Cu <sup>I</sup>	A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> k <sub>2</sub> / s <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> k <sub>3</sub> / s <sup>-1</sup>	A <sub>f</sub> <sup>b)</sup>
1	0,427, 0,807	29 (± 1)	472 (± 5)	0,348
1,5	0,417, 0,842	43 (± 1)	750 (± 7)	0,347
2	0,439, 0,862	35 (± 1)	661 (± 5)	0,377
2,5	0,424, 0,829	36 (± 1)	619 (± 7)	0,381
3	0,419, 0,823	34 (± 1)	551 (± 7)	0,391

<sup>a)</sup> absorbance maximale en fin d'étape rapide (complexation), <sup>b)</sup> absorbance finale.

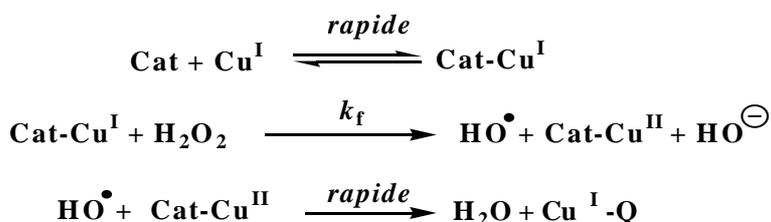
A partir de l'ensemble des données physico-chimiques, on peut proposer le mécanisme suivant pour l'oxydation de la rutine en présence de Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup>:

Sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté



Cat = noyau catéchol de la rutine, Q = noyau *o*-quinone

Avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté



**Schéma 1.** Mécanisme proposé pour l'oxydation de la rutine initiée par Cu<sup>I</sup> avec ou sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 7,4, 37°C).

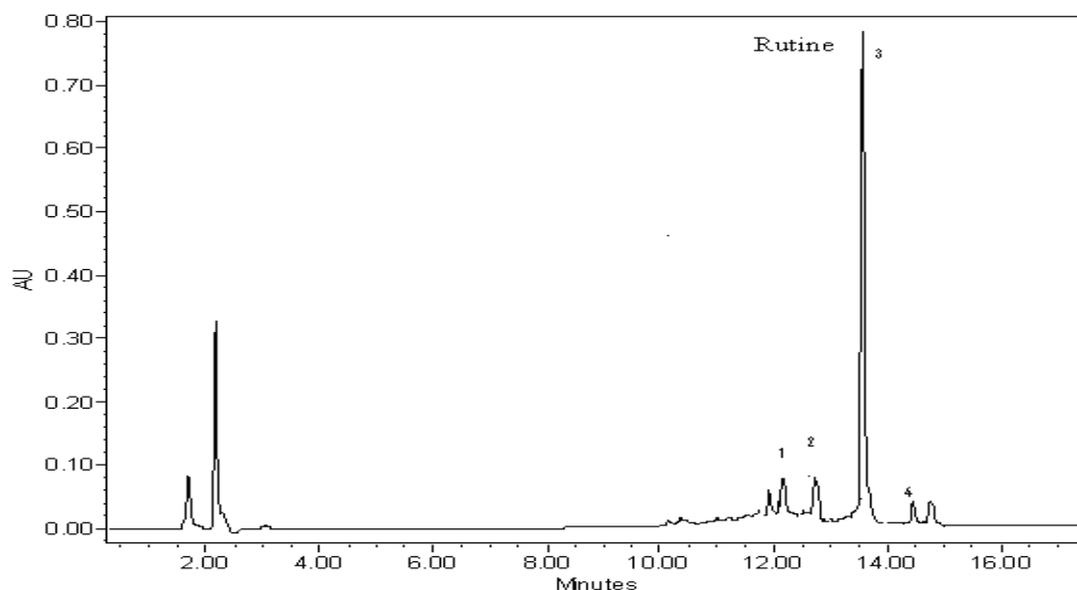
La 2<sup>e</sup> étape (constante de vitesse  $k_i$ ) permet d'expliquer l'oxydation temporaire de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et le rôle-clé d'un excès de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans l'activation de  $\text{O}_2$ . L'étape suivante (constante de vitesse  $k_a$ ) permet de justifier que les ions du cuivre sont très majoritairement au degré d'oxydation +I au cours du processus. La contribution de la réaction de Fenton (constante de vitesse  $k_f$ ) justifierait l'accumulation assez modeste de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; elle est surtout importante quand  $\text{H}_2\text{O}_2$  est ajouté d'emblée. On peut admettre que la réaction d'autoxydation (constante de vitesse  $k_a$ ) est la principale contribution à  $k_2$  et que la réaction de Fenton (constante de vitesse  $k_f$ ) est la principale contribution à  $k_3$  (plus élevée quand  $\text{H}_2\text{O}_2$  est ajoutée d'emblée).

L'autoxydation de la rutine amorcée par  $\text{Cu}^{\text{II}}$  serait cinétiquement bloquée par les réactions ci-dessous (lentes):



Avec cat = catéchol et Q = quinone

Nous avons également étudié l'oxydation de la rutine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (2 équiv.) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 équiv.) par CLHP-UV et CLHP-MS. L'échantillon est injecté directement dans la colonne après 7h d'oxydation.



**Figure 25.** Analyse HPLC-UV des produits d'oxydation de la rutine  $10^{-3}$  M dans le tampon phosphate 0.01M/ MeOH 95/5 après 7h d'oxydation à  $T=37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.4$ . Autoxydation de la rutine catalysée par 2 équiv. de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en présence de 10 équiv. de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Quatre pics de différents temps de rétention ont été détectés et identifiés sur le chromatogramme CLHP dans ces conditions (**Tableau 10**).

**Tableau 10.** Analyse par CLHP-UV-MS de l'oxydation de la rutine en présence de 2 équiv. de Cu<sup>II</sup> et de 10 équiv. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C). Analyse réalisée après 7h d'oxydation.

t <sub>R</sub> (min)	m/z	λ <sub>max</sub> (nm)	Structure proposée
12,3	639 – 611– 314	260 – 340	RMeOH ( <b>III</b> )
12,7	623 – 601– 297– 447	260 – 340	RH <sub>2</sub> O-2H ( <b>IV</b> )
13,7	609 – 607	260 – 354	Rutine ( <b>I</b> , RH <sub>2</sub> ), R ( <b>II</b> )
14,4	593 – 285	260 – 340	ND

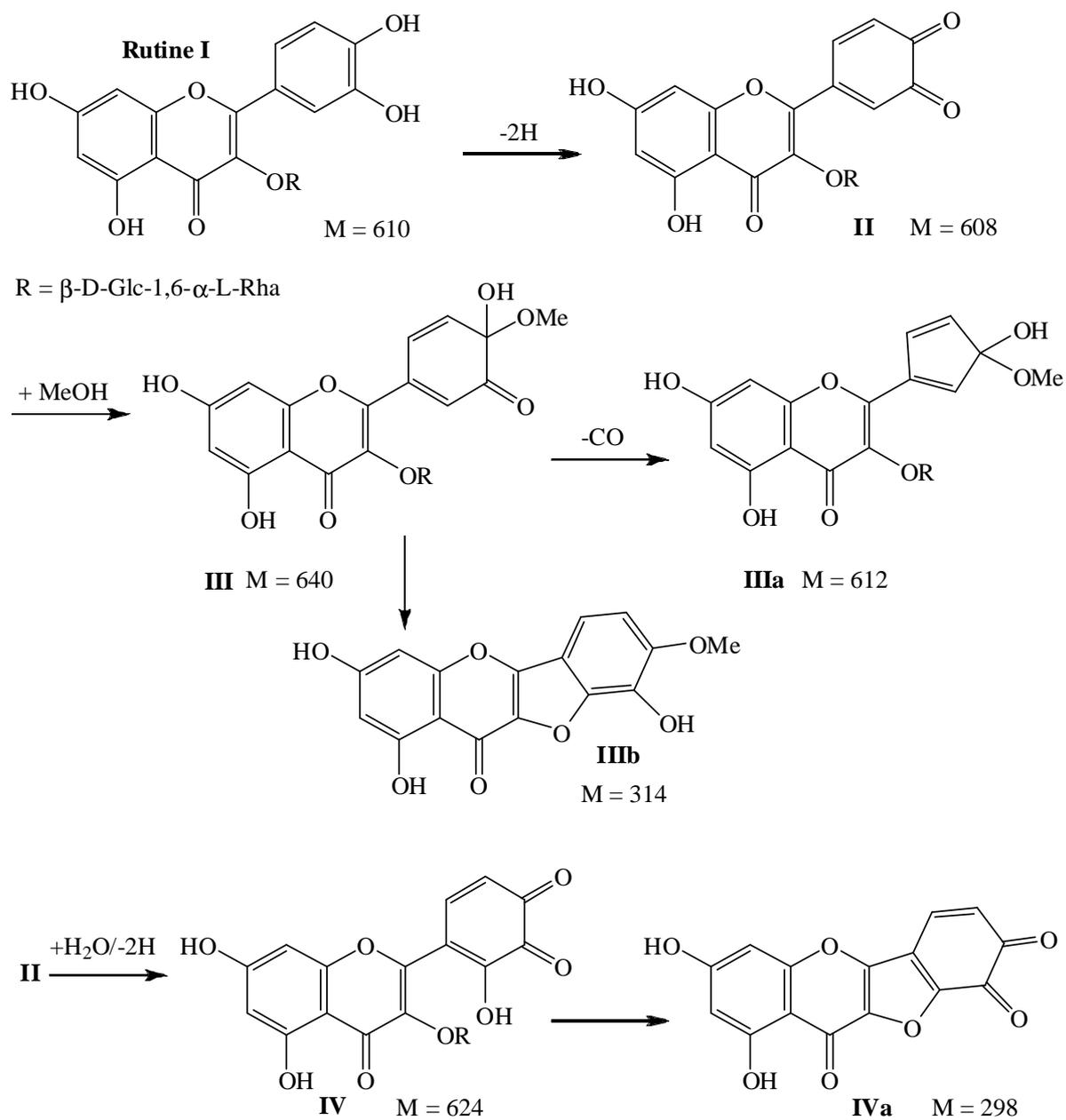
Les structures proposées pour les produits d'oxydation détectés et certains de leurs fragments sont indiquées sur le Schéma 2. Les produits **III** et **IV** correspondent à l'addition de solvant (H<sub>2</sub>O ou MeOH) sur l'*o*-quinone formée par oxydation à deux électrons de la rutine suivie d'une ré-oxydation éventuelle (produit **IV**). Les sites d'addition de solvant sont hypothétiques mais permettent de proposer une structure pour certains fragments. En outre, la présence du groupement rutinose empêche la formation d'un intermédiaire de type *p*-méthylènequinone comme dans le cas de la quercétine. Du coup, l'addition de solvant sur le cycle C avec forte déconjugaison n'a pas lieu. L'addition du solvant a vraisemblablement lieu sur le cycle B avec maintien d'une forte conjugaison d'où l'absorption des produits **III** et **IV** au dessus de 300 nm (dans les conditions acides de l'analyse CLHP).

Comme pour la quercétine, l'addition de MeOH est observée malgré sa faible proportion dans le tampon phosphate (5%).

L'oxydation électrochimique de la rutine sur anode en graphite a été récemment étudiée par voltamétrie cyclique.<sup>22</sup> Les résultats de cette étude montrent que l'oxydation de la rutine produit l'*o*-quinone *via* le transfert réversible de deux électrons et deux protons ; les produits d'oxydation détectés absorbent à 254 nm et 346 nm. En outre, l'*o*-quinone de la rutine, bien qu'instable, peut être directement mise en évidence par RMN et piégée sous forme d'un adduit stable par le benzènesulfinate de sodium.<sup>23</sup>

<sup>22</sup> He J.-B. et coll., 2007. *Electrochimica Acta*, 52, 6665–6672.

<sup>23</sup> Dangles O. et coll., 1999. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1387–1395.



**Schéma 2.** Proposition de structures pour les produits d'oxydation de la rutine et certains de leurs fragments

### 2-3-3-3 Conclusion

En absence d'ion métallique, la rutine a montré une forte stabilité dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C). En présence d'ion du fer ou de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , l'autoxydation de la rutine est marginale malgré les changements redox rapides intervenant sur les centres métalliques (oxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ). Les études par spectroscopie UV-visible et CLHP-UV confirment que les complexes rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  et rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  restent stables. En revanche, le complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{I}}$  conduit à des produits d'oxydation de la rutine surtout en présence d'un excès de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  permettant l'activation de  $\text{O}_2$ . L'addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accélère l'oxydation de la rutine du fait de la contribution de la réaction de Fenton.

Les analyses CLHP-MS ont montré que les produits d'oxydation de la rutine en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et des ions du cuivre sont des produits d'addition de solvant ( $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{MeOH}$ ) sur le cycle B de l'intermédiaire *o*-quinone résultant de l'oxydation biélectronique de la rutine.

**Références bibliographiques**

- [1] Afanas'ev I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I., 1989. *Biochem. Pharm.*, 38, 1763-1769.
- [2] Murota K., Mitsukuni Y., Ichikawa M., Tsushida T., Miyamoto S., Terao J. 2004. *Agric. Food Chem.*, 52, 1907-1912.
- [3] Chung J.-H., Lee C.-S., Shin Y.-K., Lee K.-S., 1991. *Korean. J. Pharm.*, 27, 69-80.
- [4] Afanas'eva I.B., Ostrakhovitch E.A., Mikhal'chik E.V., Ibragimova G.A., Korkina L.G., 2001. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 677-684.
- [5] De Souza R.F.V., De Giovani W.F., 2004. *Redox Rep.*, 9, 97-104.
- [6] Negre-Salvayre A., Affany A., Hariton C., Salvayre R., 1991. *Pharmacology*, 42, 262-272.
- [7] Korkina L.G., Afanas'ev I.B., 1997. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 38, 151-163.
- [8] Simić A., Manojlović D., Šegan D., Todorović M., 2007. *Molecules*, 12, 2327-2340.
- [9] Malešev D., Kuntić V., 2007. *J. Serbian Chem. Soc.*, 72, 921-939.
- [10] Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kostyuk T.V., Cherian M.G., 2007. *Cell. Mol. Biol.*, 53, 62-69.
- [11] Kang J., Su B., Lu X., 2005. *Indian J. Chem. - Section A Inorg., Phys., Theo. and Anal. Chem.*, 44, 2010-2014.
- [12] Esparza I., Salinas Í., Santamaría C., García-Mina J.M., Fernández J.M. 2005. *Anal. Chim. Acta.*, 543, 267-274.
- [13] Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florêncio M.H., Jennings K.R., 2004. *Free Radical Res.*, 36, 1199-1208.
- [14] Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., Bou-Abdallah F., Chasteen N.D., 2007. *Dalton T.*, 43, 4951-4961.
- [15] Bai Y., Song F., Chen M., Xing J., Liu Z., Liu S., 2004. *Anal. Sci.*, 20, 1147-1151.
- [16] Makris D.P., Rossiter J.T., 2000. *Agric. Food Chem.*, 48, 3830-3838.
- [17] Escandar GM., Sala LF., 1991. *Can. J. Chem.*, 69, 1994-2001.
- [18] Jovanovic SV., Steenken S., Hara Y., Simic MG., 1996. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2497-2504.
- [19] Mahal H.S., Kapoor S., Satpati A.K., Mukherjee T., 2005. *J. Phys. Chem. B.*, 109, 24197-24202.

- [20] EL Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. 2006. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.
- [21] Kamau P, Jordan RB., 2002. *Inorg. Chem.*, 41, 3076-3083
- [22] He J.-B. , Wang Y., Deng N., Zha Z.-G., Lin X.-Q., 2007. *Electrochimica Acta.*, 52, 6665-6672.
- [23] Dangles O., Fargeix G., Dufour C., 1999. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1387–1395

---

## CHAPITRE 2-4

### Interactions de l'Acide Caféique avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation

---

Les acides phénoliques, en particulier les dérivés des acides hydroxycinamiques (AHC), sont largement distribués dans les plantes. Ils sont naturellement présents dans les jus de fruits, boissons (thé, café) et les légumes.<sup>1, 2</sup> L'absorption quotidienne de l'acide caféique dans les boissons de café a été estimée à 260 mg.<sup>3</sup> Ces composés ont attiré une attention particulière en raison de leurs diverses activités biologiques et pharmaceutiques, y compris l'activité antioxydante. Il a été récemment rapporté qu'une alimentation riche en acide caféique peut mobiliser les composés endogènes liés au cuivre dans les lymphocytes de l'homme et conduisant à la dégradation oxydante de l'ADN, ce qui pourrait être responsable des propriétés anticancéreuses par clivage de l'ADN.<sup>4, 5</sup> Cependant, des effets pro-oxydants ont également été signalés (accélération de la peroxydation lipidique et/ou du clivage de l'ADN).<sup>6, 7, 8</sup>

Dans une alimentation d'origine végétale (tomate, prune, groseille, fraise,...), l'acide caféique existe plus fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides.

L'activité antioxydante des acides phénoliques et leurs dérivés dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles phénoliques, le groupement *ortho*-diphénol fournissant le pouvoir antioxydant le plus puissant. Il a déjà été démontré que l'acide caféique inhibe la peroxydation lipidique initiée par Cu<sup>2+</sup>.<sup>9</sup>

---

<sup>1</sup> Robbins R.J., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2866–2887.

<sup>2</sup> Bassil D. et coll., 2005. *Food Res. Inter.*, 38, 395-402.

<sup>3</sup> Radtke, J. et coll., 1998., *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, 190–197.

<sup>4</sup> Azmi A.S. et coll., 2006. *FEBS Lett.*, 580, 533–538.

<sup>5</sup> Bhat S.H. et coll., 2007. *Toxicol. Appl. Pharma.*, 218, 249-255.

<sup>6</sup> Sakihama Y. et coll., 2002. *Toxicology*, 177, 67–80.

<sup>7</sup> Yamanaka N., 1997. *FEBS Lett.*, 405, 186–190.

<sup>8</sup> Andueza S. et coll., 2009. *Food Resch. Inter.*, 42, 51-55.

<sup>9</sup> Zheng L-F. et coll., 2008. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 149–156.

La majorité des études rapportées sur l'activité antioxydante et la complexation métallique des polyphénols concerne les flavonoïdes. Malgré la présence des acides phénoliques en grande quantité dans le règne végétal, peu d'études ont été publiées sur les interactions des acides hydroxycinnamiques et les ions métalliques.<sup>10, 11, 12</sup>

Deux sites sont en compétition dans l'acide caféique pour complexer les ions métalliques: le groupement catéchol et le groupement carboxylate.

La complexation des ions métalliques toxiques tels que Al<sup>III</sup>, Cr<sup>VI</sup> et Pb<sup>IV</sup> par l'acide caféique a été récemment mise en évidence.<sup>13, 14</sup>

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences de la complexation des ions du fer et du cuivre par l'acide caféique sur sa stabilité à pH neutre. Notre choix s'est porté sur l'acide caféique pour les raisons suivantes:

- L'acide caféique est présent en grande quantité dans les aliments d'origine végétale. Il représente environ un tiers de la dose totale des polyphénols de l'alimentation ;
- Très peu d'études cinétiques ont été effectuées sur les interactions de l'acide caféique avec les ions du fer et du cuivre;
- Peu de travaux traitent de l'oxydation de l'acide caféique amorcée par les métaux de transition.

---

<sup>10</sup> Andjelkovic M. et coll., 2006. *Food Chem.*, 98, 23–31.

<sup>11</sup> Chvatalova K. et coll., 2008. *Food Chem.*, 106, 650–660.

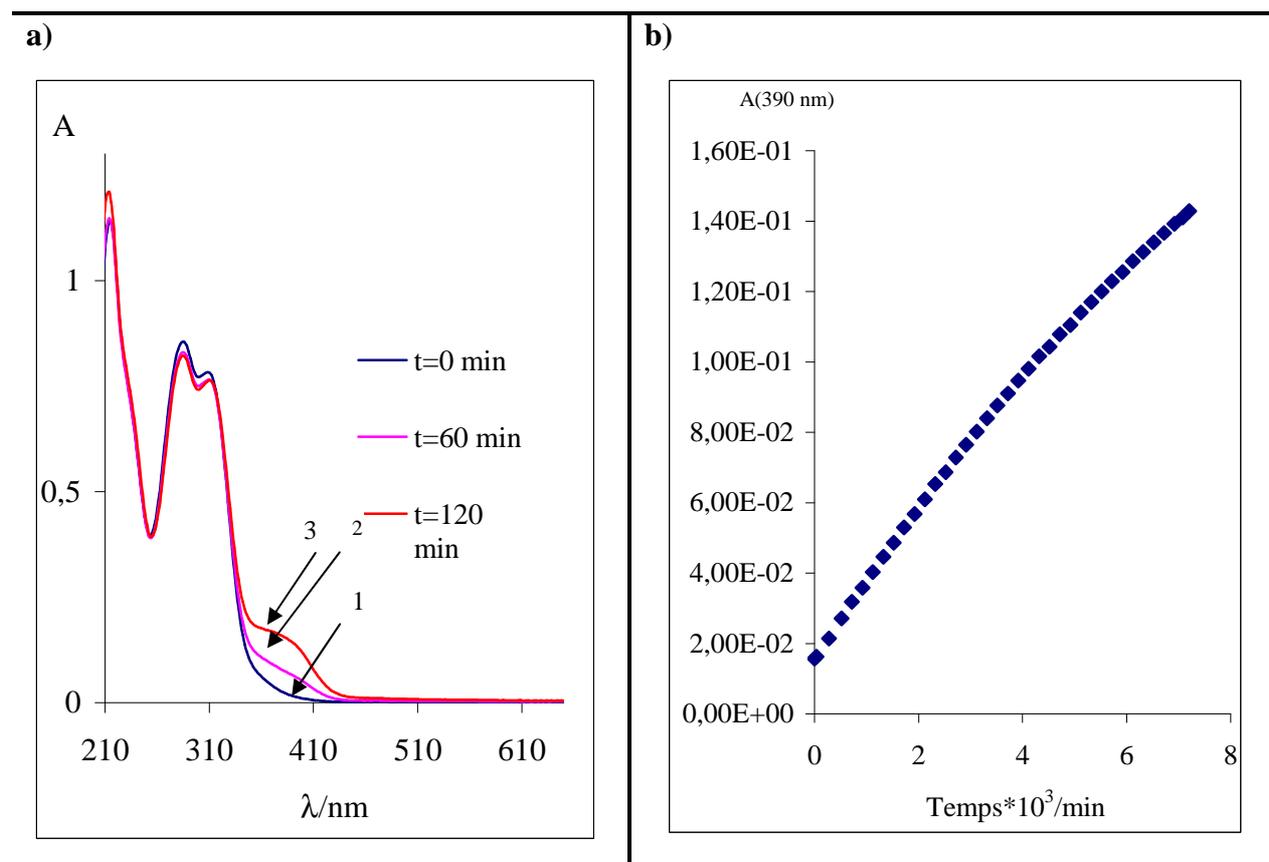
<sup>12</sup> Paiva-Martins F., Gordon, M. H., 2005 *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 2704–2709.

<sup>13</sup> Deiana S., coll., 2007. *Chemosphere*, 67, 1919–1926.

<sup>14</sup> Boilet L., et coll. 2005, *J. Phys. Chem.*, 1091952-1960.

### 2-4-1 Stabilité de l'acide caféique dans un tampon phosphate à pH 7,4 et 37°C

L'autoxydation de l'acide caféique AH<sub>2</sub>, H désignant les 2, en absence d'ion métallique ajouté a été suivie par spectroscopie UV-Visible. L'acide caféique présente deux bandes d'absorption dont les maxima sont à 285 nm et 310 nm. Sur 2h, l'autoxydation de AH<sub>2</sub> est significative (**Figure 1**). Ainsi, il y a apparition d'une nouvelle bande vers 390 nm qui correspond à la formation des produits d'oxydation. L'absorbance à 390 nm augmente d'une façon monoexponentielle, en parallèle avec la décroissance de A(285 nm) et A(310 nm).

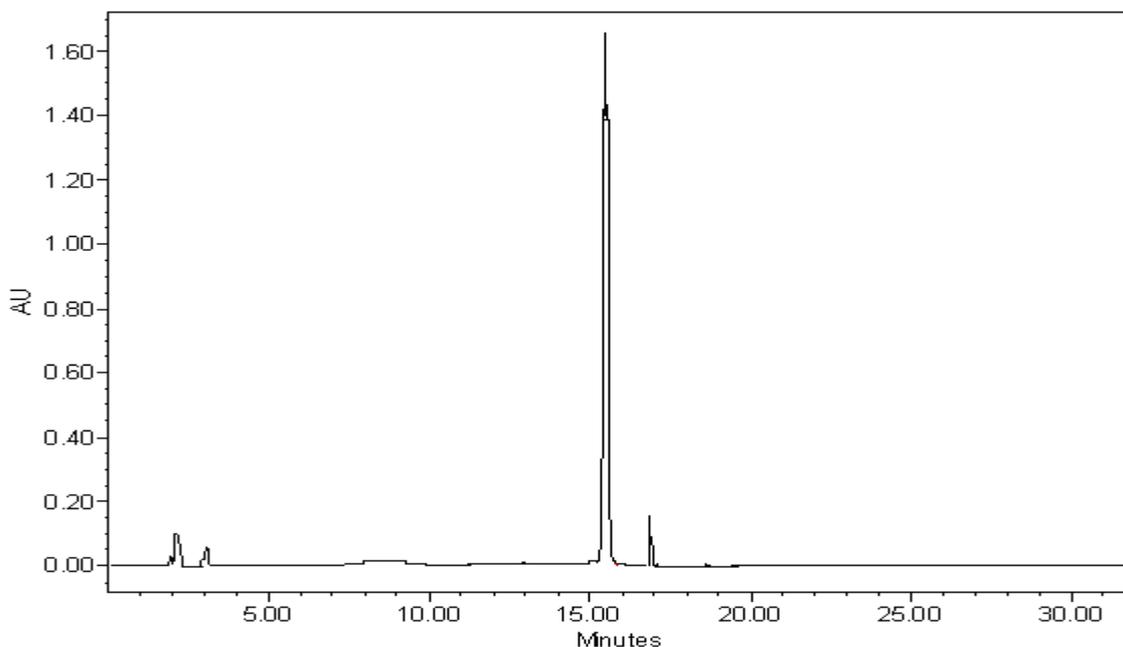


**Figure 1.** a) Autoxydation de l'acide caféique (50μM) dans un mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. b) Variation de l'absorbance des produits d'oxydation de AH<sub>2</sub> à 390 nm en fonction du temps. **1** = 0 min, **2**= 60min, **3** = 120min.

L'autoxydation de AH<sub>2</sub> dans le tampon phosphate suit une cinétique apparente de premier ordre. La valeur de la constante de vitesse d'autoxydation est  $k_{\text{obs}} = 82 (\pm 1) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Dans ces conditions, le temps de demi-vie de l'acide caféique ( $\text{Ln}2/k_{\text{obs}}$ ) est 2h 20 min.

Nous avons également étudié l'autoxydation de AH<sub>2</sub> par CLHP couplée à la spectrométrie de masse. L'échantillon est injecté directement après 7 h de réaction.

Deux pics de différents temps de rétention ont été détectés et identifiés dans le chromatogramme CLHP (**Figure 2, Figure 3, Tableau 1**).

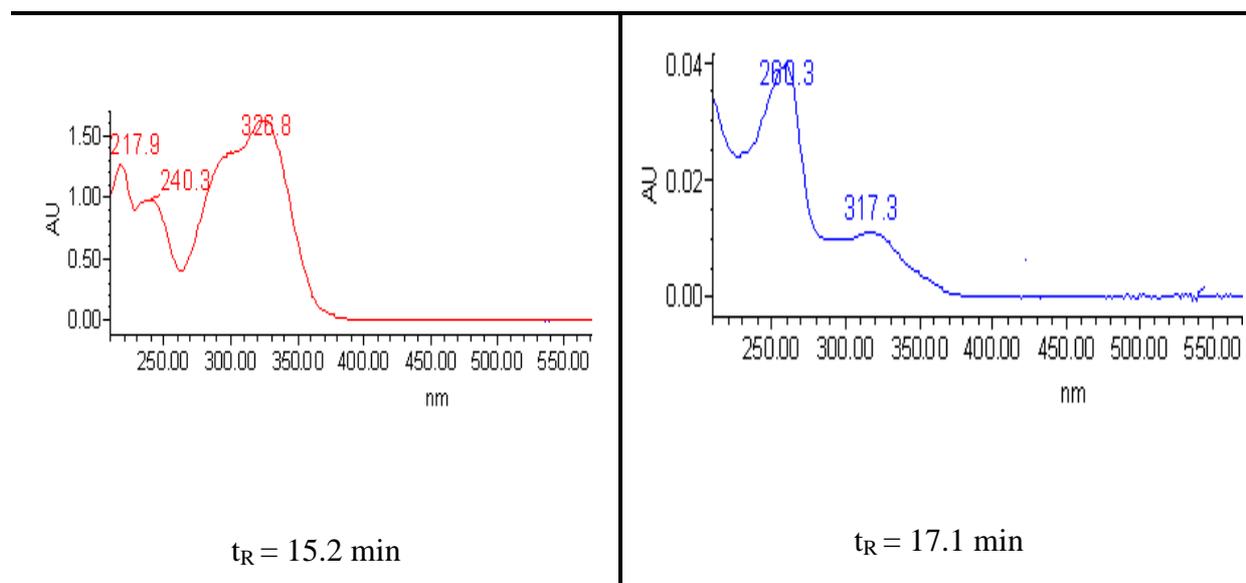


**Figure 2.** Analyse CLHP des produits d'autoxydation de l'acide caféique ( $10^{-3}$  M) après 7h de réaction dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.

**Tableau 1.** Données d'analyse HPLC-MS de l'autoxydation de l'acide caféique dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). Analyse après 7h d'autoxydation en absence d'ion métallique.

$t_R$ (min)	m/z	$\lambda_{max}$ /nm	Structure proposée
15,2	179	272, 326	AH <sub>2</sub>
17,1	311, 297, 269, 179, 177	260, 317	(AH) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> , type C-O

L'identification du pic à 17,1 min s'appuie sur les données de la littérature.<sup>15,16,17, 18</sup>



**Figure 3.** Les spectres UV-visible de l'acide caféique ( $t_R = 15.2 \text{ min}$ ) et son dimère ( $t_R = 17.1 \text{ min}$ )

Il s'agit d'un dimère (-2H) ayant subi une réaction de décarboxylation (-CO<sub>2</sub>). La présence des fragments à  $m/z = 179$  et  $177$  (acide caféique et *o*-quinone dérivée) suggèrent que le dimère présente une liaison labile de type C-O et serait donc du type biaryléther.

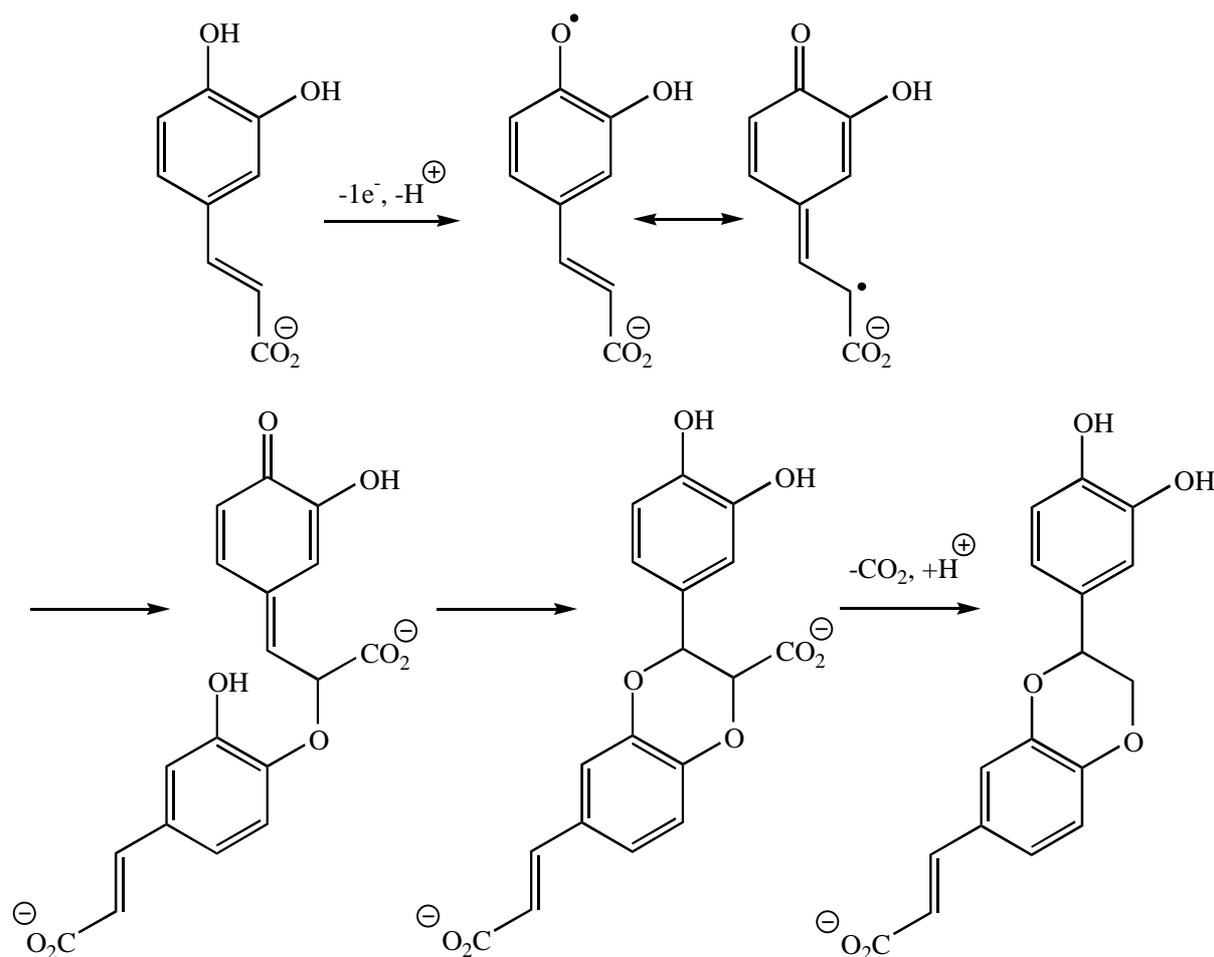
De plus, l'autoxydation de l'acide caféique s'accompagne de la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulée pendant 1h d'autoxydation d'une solution 50  $\mu\text{M}$  d'acide caféique dans le tampon phosphate à pH 7,4 est d'environ 12  $\mu\text{M}$ . En outre, à partir de la valeur de la constante cinétique apparente d'autoxydation, on peut estimer qu'un quart de l'acide caféique initial a été oxydé après une heure. La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est donc quasi-stoechiométrique dans ces conditions.

<sup>15</sup> Roche M. et coll., 2005. *Org. Biomol. Chem* 3, 423-430.

<sup>16</sup> Pati S. et coll., 2006. *J. Chrom. A.*, 1102,184-192.

<sup>17</sup> Ryuichi A. et coll., 2004. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* ,15, 1228-1236.

<sup>18</sup> Petrucci R. et coll., 2006. *Electrochimica Acta.*,52, 2461-2470.



**Schéma 1.** Mécanisme proposé pour l'autoxydation de l'acide caféique.

On peut donc considérer que le bilan de la phase initiale d'autoxydation 'spontanée' de l'acide caféique s'écrit :  $2AH_2 + O_2 \rightarrow \text{dimère } ((AH)_2\text{-CO}_2) + H_2O_2 + CO_2$

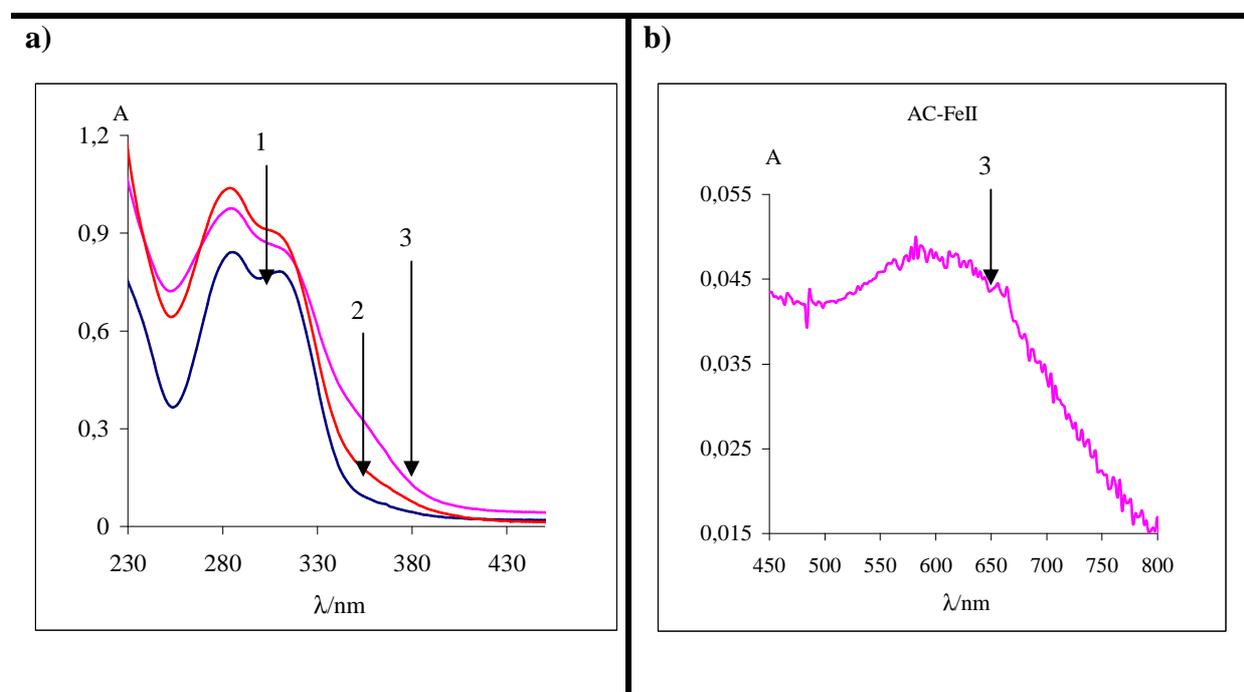
Le mécanisme débute par l'autoxydation de l'acide caféique en la semiquinone correspondante qui dimérise rapidement. Cette première étape implique des traces métalliques non identifiées pouvant provenir de l'eau ou, plus vraisemblablement, du tampon phosphate. Elle s'accompagne de la réduction de  $O_2$  en  $H_2O_2$ . Une étape de cyclisation conduisant à un cycle 1,4-dioxane présentant un groupement carboxylate labile peut alors être proposée. Ce dernier est éliminé dans l'étape finale (**Schéma 1**). Des produits de ce type ont déjà été mis en évidence dans la littérature.<sup>15, 16, 17, 18</sup>

## 2-4-2 Interaction de l'acide caféique avec les ions du fer et du cuivre : Complexation

La complexation des ions du fer et du cuivre par l'acide caféique (noté  $AH_2$ ) a été étudiée par spectroscopie UV-visible en mode cinétique pour différentes concentrations d'ion du fer ou du cuivre.

### 2-4-2-1 Complexation des ions du fer par l'acide caféique

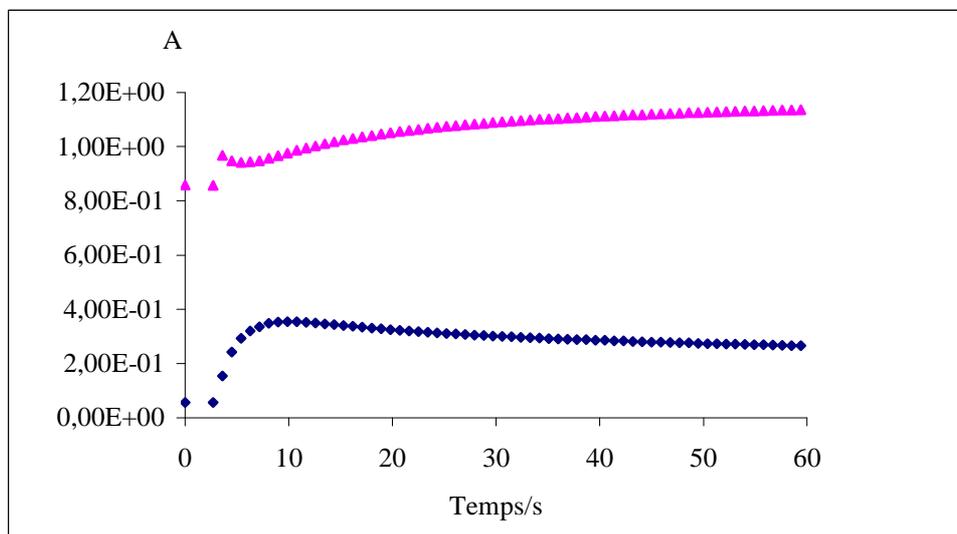
Le spectre UV-visible de l'acide caféique présente deux maxima d'absorbance dans le domaine 270-320 nm. En présence d'ions  $Fe^{II}$ , une très faible bande apparaît dans le domaine 450-650 nm (**Figure 4**). On note également le développement d'une absorption dans le domaine 340-380 nm. Ces effets indiquent que l'acide caféique forme un complexe avec les ions du fer via le noyau catéchol.



**Figure 4.** Complexation de  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $50 \mu M$ ) par l'acide caféique (1 équiv.) dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4,  $37^\circ C$ . **1**=  $AH_2$ , **2** =  $AH_2-Fe^{II}$ , **3**= $AH_2-Fe^{III}$ .

### Complexation acide caféique-Fe<sup>III</sup>

L'absorbance du complexe acide caféique-Fe<sup>III</sup> à 360 nm augmente faiblement au cours du temps et en 2 phases (**Figure 5**): une phase rapide suivie d'une phase plus lente. On note également une croissance rapide de A(285 nm) puis une décroissance lente.



**Figure 5.** Suivi cinétique de A(360 nm) et A(285 nm) lors de la complexation AH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup> (tampon phosphate 0,01M/MeOH 95/5, pH = 7,4, 37°C). Concentration de l'acide caféique = 50 μM, Fe<sup>III</sup> = 100 μM. ▲ A (285 nm), ◆ A (360 nm).

L'interaction de Fe<sup>III</sup> et de l'acide caféique se traduit par la formation rapide d'un complexe (constante de vitesse  $k_1$ ) qui évolue selon un processus du premier ordre apparent à 360 nm ( $k_2$ ) mais qui se révèle en fait biexponentiel à 285 nm ( $k_2, k_3$ ).



Les paramètres ( $k_1, \epsilon_1$ ) et ( $k_2, \epsilon_2$ ) correspondant respectivement aux complexes (AFe<sup>III</sup>)<sub>1</sub> et (AFe<sup>III</sup>)<sub>2</sub> sont rapportés dans le tableau 2. Ils sont déduits de l'analyse de A(360 nm). L'analyse de la 2<sup>e</sup> phase à 285 nm (modèle biexponentiel) fournit les constantes  $k_2$  et  $k_3$ .

**Tableau 2.** Complexation Fe<sup>III</sup>-acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 ou 285 nm sur 2 min. Concentration d'acide caféique = 50 µM. On note  $\rho$  = rapport molaire Fe<sup>III</sup>/AH<sub>2</sub>.

$\rho$ ; $\lambda$ / nm	$10^{-3}k_1 / M^{-1}s^{-1}$	$10^3k_2, 10^3k_3 / s^{-1}$	$\epsilon_1 / M^{-1}cm^{-1}$ ou $A_{final}$	$\epsilon_2 / M^{-1}cm^{-1}$
0,25 ; 360	18,6 (± 0,2)	9,0 (± 0,7)	2440 (± 10)	4220 (± 80)
0,5 ; 360	25,1 (± 0,9)	10,6 (± 0,3)	3010 (± 10)	4430 (± 20)
0,5 ; 285	-	103 (± 8)	0,92	-
		5 (± 1)		
1,0 ; 360	20,0 (± 1,6)	12,6 (± 0,5)	2390 (± 10)	3250 (± 20)
1,0 ; 285	-	164 (± 17)	1,02	-
		10 (± 1)		
1,5 ; 360	21,3 (± 0,2)	24,8 (± 0,7)	2750 (± 10)	3730 (± 10)
1,5 ; 285	-	105 (± 7)	1,11	-
		12 (± 1)		
2,0 ; 360	7,0 (± 0,3)	22,5 (± 0,7)	2940 (± 10)	3910 (± 10)
2,0 ; 285	-	130 (± 8)	1,20	-
		16 (± 1)		
2,5 ; 360	4,9 (± 0,2)	55 (± 2)	3520 (± 30)	4200 (± 10)
3,0 ; 360	3,4 (± 0,1)	65 (± 4)	3870 (± 30)	4320 (± 10)

Les résultats du tableau 2 appellent les remarques suivantes :

- La constante  $k_1$  de formation du complexe  $(AFe^{III})_1$  est assez stable pour les faibles concentrations de Fe<sup>III</sup> (de l'ordre de  $2 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ ) mais décroît nettement en excès de Fe<sup>III</sup>.
- La constante  $k_2$  (calculée à 285 nm) ne dépend pas de la concentration totale de Fe<sup>III</sup> ( $k_2 = 0.1-0.2 s^{-1}$ ), alors que  $k_3$  augmente avec cette dernière.

Ainsi, l'interaction de Fe<sup>III</sup> et de l'acide caféique conduit à la formation rapide d'un complexe (constante  $k_1$ ), qui évolue rapidement peut-être par coordination d'ions phosphate (constante  $k_2$ ). En présence d'un excès de Fe<sup>III</sup>, la participation de processus d'oxydation n'est pas exclue.

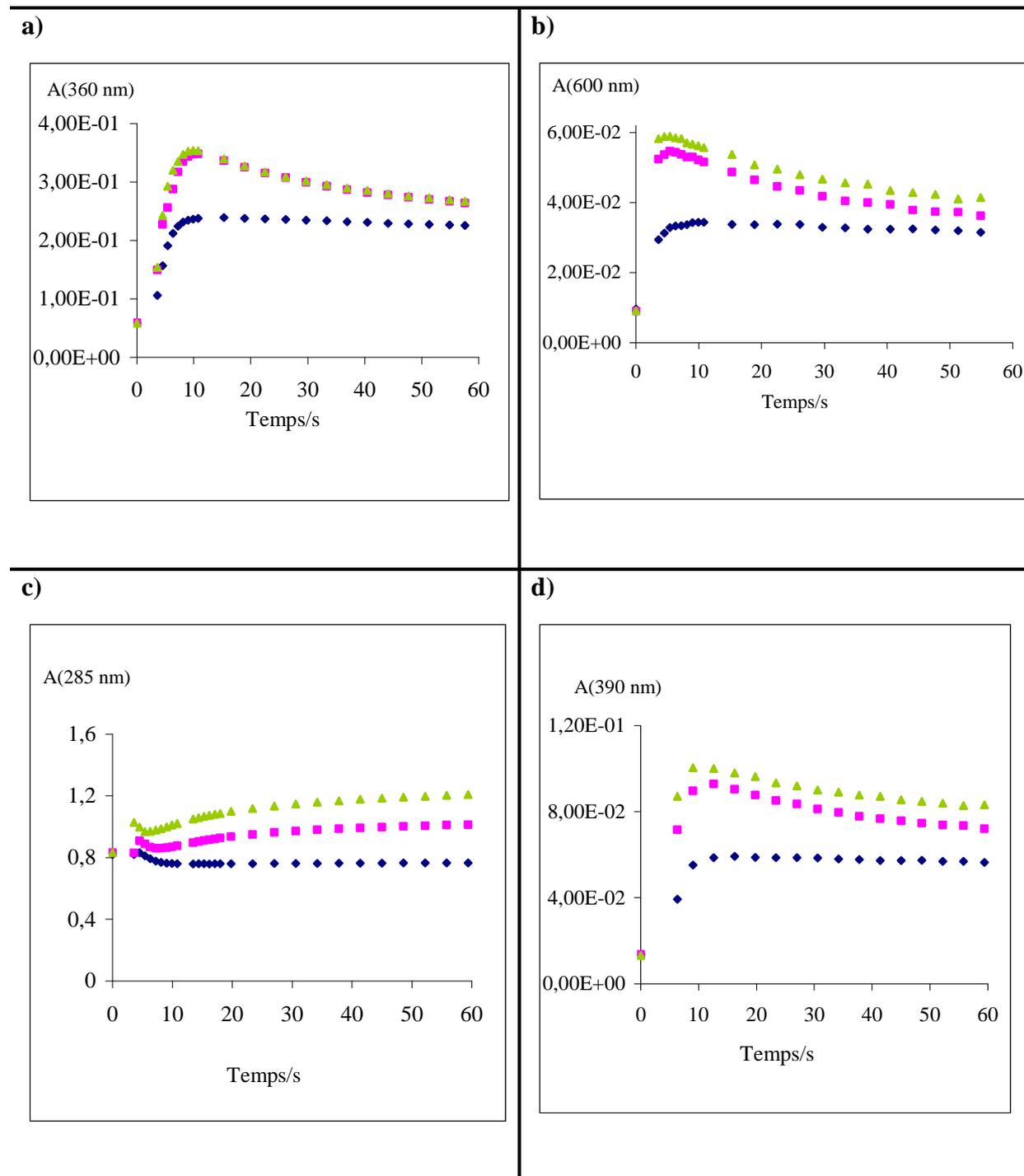
### Complexation acide caféique-Fe<sup>II</sup>

L'ajout de Fe<sup>II</sup> à une solution d'acide caféique à pH 7,4 provoque des modifications spectrales plus nettes qu'avec Fe<sup>III</sup> (**Figure 6**). En particulier, de nouvelles bandes d'absorption apparaissent dans le domaine 350-650 nm.

La complexation de Fe<sup>II</sup> par l'acide caféique est plus rapide que celle de Fe<sup>III</sup> par le même ligand. L'absorbance à 600 nm est typique du complexe AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>; elle n'est pas observée avec Fe<sup>III</sup>. Ces résultats sont en bon accord avec la littérature.<sup>7,8</sup>

Avec au moins 1 equiv. de Fe<sup>II</sup>, une 2<sup>e</sup> phase est observée après l'étape de complexation rapide quelle que soit la longueur d'onde d'analyse. Ainsi, le complexe AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup> n'est pas stable dans le tampon phosphate. Il a été déjà démontré que la stabilité du complexe AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup> est significativement affectée par le tampon.<sup>7,8</sup> Le complexe est stable dans le tampon Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) et le tampon Hepes(N-2-acide Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique) tandis que le tampon phosphate accélère considérablement l'autoxydation de AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup> en AH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>.

En présence de Fe<sup>II</sup>, on note le développement d'une absorption notable vers 390 nm qui n'est observée en présence de Fe<sup>III</sup> que plus tardivement (voir plus loin). Il semble donc que la complexation de Fe<sup>II</sup> par l'acide caféique dans le tampon phosphate initie l'autoxydation de AH<sub>2</sub> dès les premières minutes. La formation du complexe AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup> serait donc suivie par la production d'espèces oxydées absorbant à 390 nm, Il pourrait s'agir de l'*o*-quinone dérivée de l'acide caféique. Les calculs de mécanique quantique semi-empirique (logiciel Hyperchem, programme PM3) confirment cette hypothèse: ils prédisent un maximum d'absorption à 313 nm pour l'anion caféate (en accord raisonnable avec l'observation expérimentale) et à 389 et 256 nm pour l'anion de l'*o*-quinone.



**Figure 6.** Complexation de l'acide caféique (50 μM) par Fe<sup>II</sup> (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 nm (fig. a), 600 nm (fig. b), 285 nm (fig. c) et 390 nm (fig. d) sur 1 min. ♦ ρ = 0,25, ■ ρ = 1, ▲ ρ = 0,25.

L'évolution du système  $\text{AH}_2\text{-Fe}^{\text{II}}$  est suivie sur 1 min à 285 nm, 360 nm, 390 nm et 600 nm. (**Figure 6, tableau 3**). Les absorbances à 360 nm, 600 nm et à 390 nm croissent fortement (complexation) puis décroissent lentement. Au contraire, l'absorbance à 285 nm varie peu au cours de la complexation puis augmente fortement. Ces variations sont totalement inverses de celles observées avec  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-AH}_2$  (**Figure 5, tableau 2**). L'analyse cinétique à 360, 390 et 600 nm suppose la formation d'un complexe (constante de vitesse bimoléculaire  $k_1$ ) qui évolue selon un processus apparent du 1<sup>er</sup> ordre (constante de vitesse  $k_2$ ). La croissance de  $A(285 \text{ nm})$  est analysée selon un modèle biexponentiel (constantes de vitesse du premier ordre  $k_2$  et  $k_3$ ).

**Tableau 3.** Complexation  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 ou 285 nm sur 1 min. Concentration d'acide caféique = 50  $\mu\text{M}$ .

$\rho, \lambda / \text{nm}$	$10^{-3}k_1 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^3k_2, 10^3k_3 / \text{s}^{-1}$	$\epsilon_1 / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}, A_f \text{ a)}$	$\epsilon_2 / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
0,25 ; 360	9,0 ( $\pm 0,3$ )	43 ( $\pm 11$ )	15690 ( $\pm 230$ )	13360 ( $\pm 180$ )
0,5 ; 360	4,2 ( $\pm 0,9$ )	148 ( $\pm 23$ )	21180 ( $\pm 3420$ )	9450 ( $\pm 50$ )
0,5 ; 285	-	38 ( $\pm 1$ )	0,815	-
0,5 ; 600	7,5 ( $\pm 0,5$ )	86 ( $\pm 9$ )	2570 ( $\pm 100$ )	1530 ( $\pm 10$ )
1 ; 360	9,2 ( $\pm 0,6$ )	81 ( $\pm 4$ )	11070 ( $\pm 260$ )	5660 ( $\pm 40$ )
1 ; 390	13,0 ( $\pm 0,6$ )	70 ( $\pm 3$ )	2930 ( $\pm 40$ )	1760 ( $\pm 10$ )
1 ; 600	14,6 ( $\pm 0,8$ )	69 ( $\pm 3$ )	1850 ( $\pm 30$ )	960 ( $\pm 10$ )
1 ; 285	-	117 ( $\pm 3$ )	1,01	-
		22 ( $\pm 2$ )		
1,5 ; 360	4,0 ( $\pm 0,3$ )	95 ( $\pm 6$ )	10490 ( $\pm 410$ )	5310 ( $\pm 30$ )
1,5 ; 285	-	82 ( $\pm 2$ )	1,08	-
		12 b)		
1,75 ; 360	11,1 ( $\pm 0,1$ )	36 ( $\pm 1$ )	7830 ( $\pm 20$ )	5140 ( $\pm 30$ )
2 ; 360	4,8 ( $\pm 0,1$ )	65 ( $\pm 1$ )	8560 ( $\pm 50$ )	5300 ( $\pm 20$ )
2 ; 390	7,2 ( $\pm 0,1$ )	43 ( $\pm 1$ )	2090 ( $\pm 10$ )	1390 ( $\pm 10$ )
2 ; 600	19,9 ( $\pm 0,3$ )	35 ( $\pm 1$ )	1230 ( $\pm 10$ )	650 ( $\pm 10$ )
2 ; 285	-	91 ( $\pm 4$ )	1,20	-
		15 ( $\pm 5$ )		
2,5 ; 360	4,4 ( $\pm 0,2$ )	40 ( $\pm 1$ )	8090 ( $\pm 60$ )	5580 ( $\pm 40$ )

a) absorbance finale, b) valeur fixée

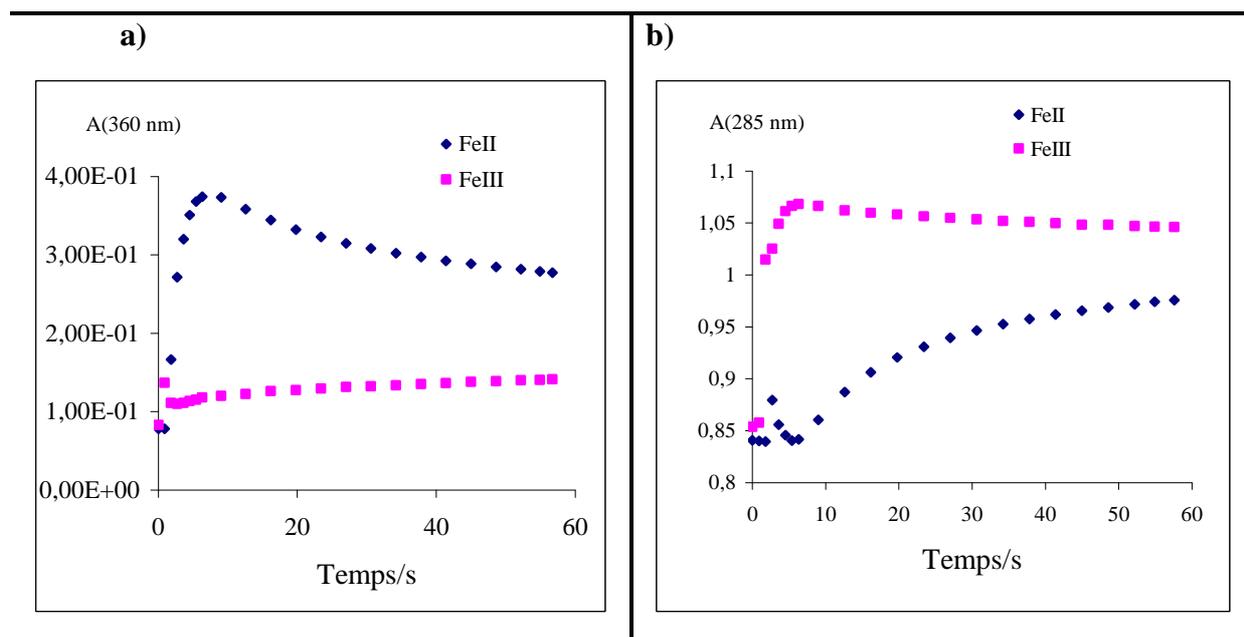
À partir des résultats du **tableau 3**, on peut faire les remarques suivantes:

Les valeurs des coefficients d'absorption molaires des complexes à 360 nm sont beaucoup plus élevées avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$  qu'avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . De telles différences ont aussi été observées.

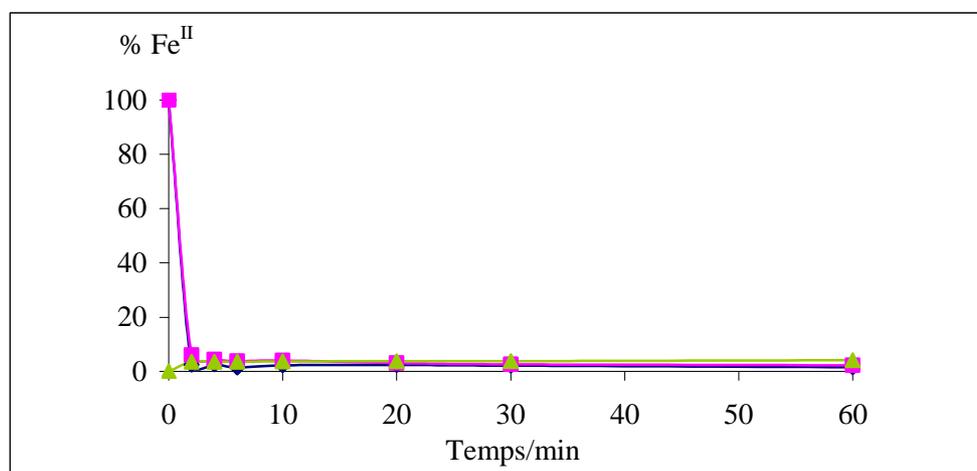
- dans le cas de la rutine (**chapitre 2-3**). Les valeurs de  $\epsilon$  sont également plus fortes en défaut de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  qu'en excès de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Quand  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est en défaut, la formation de complexes de stoechiométrie 1:2 ou 1:3 pourrait expliquer ces différences.
- La constante de vitesse de complexation  $k_1$  varie dans le domaine  $4\text{-}20 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  selon la concentration métallique et la longueur d'onde d'analyse. Cette instabilité peut être due au fait que la complexation est trop rapide pour être finement analysée par spectroscopie conventionnelle mais aussi que des phénomènes redox interviennent d'emblée. En particulier, l'analyse à 390 nm implique des produits d'oxydation alors que l'analyse à 600 nm est a priori plus spécifique aux complexes.
- La croissance de  $A(285 \text{ nm})$  vers des valeurs proches de celles observées après addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (**Figure 7**) suggère que l'absorption à 285 nm pourrait être spécifique au complexe  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -acide caféique. Ainsi, la composante rapide ( $k_2 = 8\text{-}12 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de cette croissance biexponentielle est attribuée à l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans le complexe. A partir des valeurs de  $k_2$ , le temps de demi-vie de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  lié est estimé à  $7 (\pm 2) \text{ s}$ . Ce résultat est en bon accord avec le temps de demi-vie de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  au sein de son complexe avec la rutine (voire chapitre 2-3).

Le suivi cinétique de l'état d'oxydation du centre métallique par la méthode à la ferrozine (voire partie II, chapitre 1) est en bon accord avec l'analyse spectroscopique (**Figure 8**).

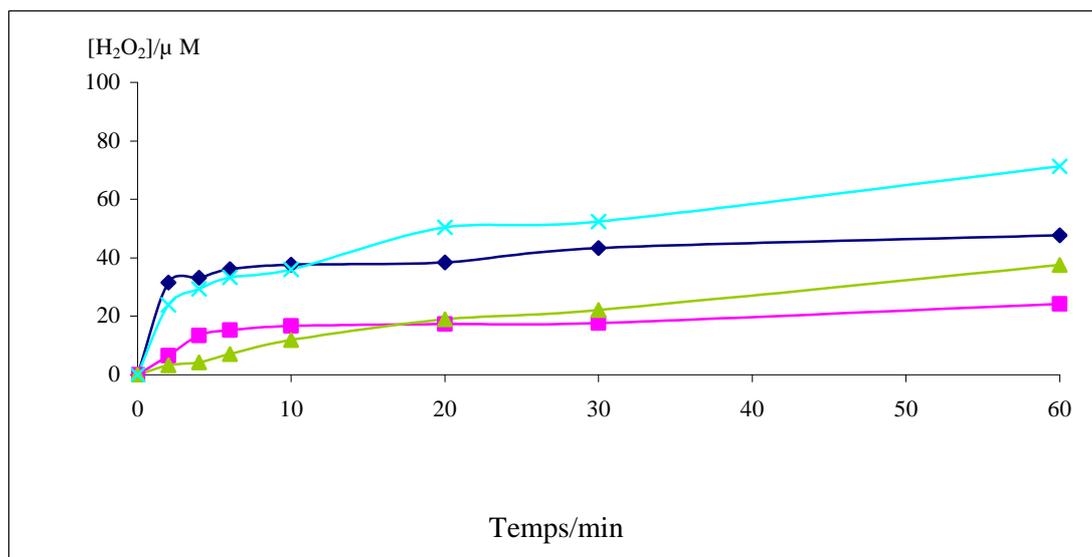
Ainsi, dans le tampon phosphate (pH 7,4), l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est rapide en présence ou en absence d'acide caféique (**Figure 8**). Dès le début du dosage (2 min),  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est quasiment indétectable. On note aussi que l'acide caféique ne permet pas d'accumuler  $\text{Fe}^{\text{II}}$  à partir de son complexe avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .



**Figure 7.** Evolution de l'absorbance à 360 et 285 nm après addition de Fe<sup>II/III</sup> (1 équiv.) à une solution d'acide caféique (50 μM) dans un tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).



**Figure 8.** Autoxydation de Fe<sup>II</sup> (100 μM) dans le tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) en présence ou en absence d'acide caféique AH<sub>2</sub> (1 équiv.), 37°C et pH =7,4. ♦ Fe<sup>II</sup>, ■ AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>, ▲ AH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>.

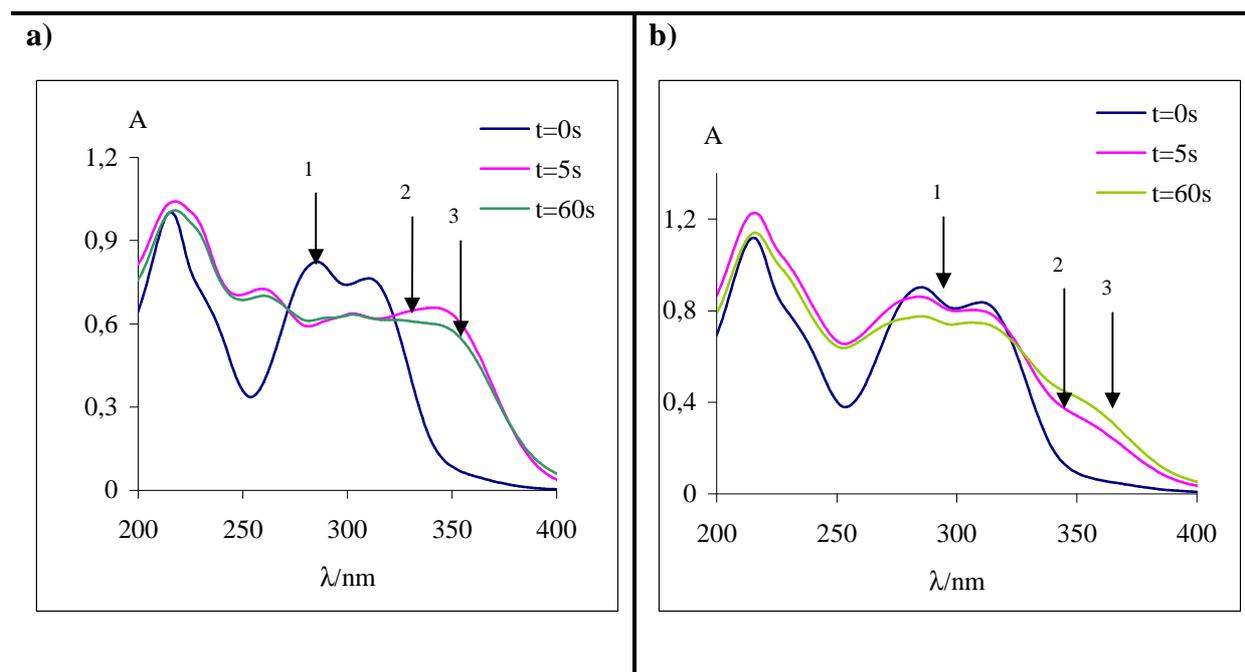


**Figure 9.** Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite au cours d'une heure d'autoxydation de l'acide caféique (100 μM) en présence d'ions métallique (1 equiv.), pH 7,4, 37°C. ♦ AH<sub>2</sub>-Cu<sup>II</sup>, ■ AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>, ▲ AH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>, × AH<sub>2</sub>-Cu<sup>II</sup>.

Malgré l'autoxydation rapide de Fe<sup>II</sup> lié, les spectres UV des solutions AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup> et AH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup> restent différents au terme de la première minute d'analyse (**Figures 7 et 8**), ce qui peut s'interpréter par l'oxydation plus rapide du ligand en présence de Fe<sup>II</sup>. Le dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la méthode Fox2 montre que l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est perceptible dès les premières minutes à partir du complexe de Fe<sup>II</sup> conformément à son autoxydation rapide en complexe de Fe<sup>III</sup> (**Figure 9**). Cependant, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est bien moins que stoechiométrique même après une heure de réaction, ce qui suggère que les ions du fer participent à la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (réaction de Fenton).

### 2-4-2-2 Complexation des ions du cuivre par l'acide caféique

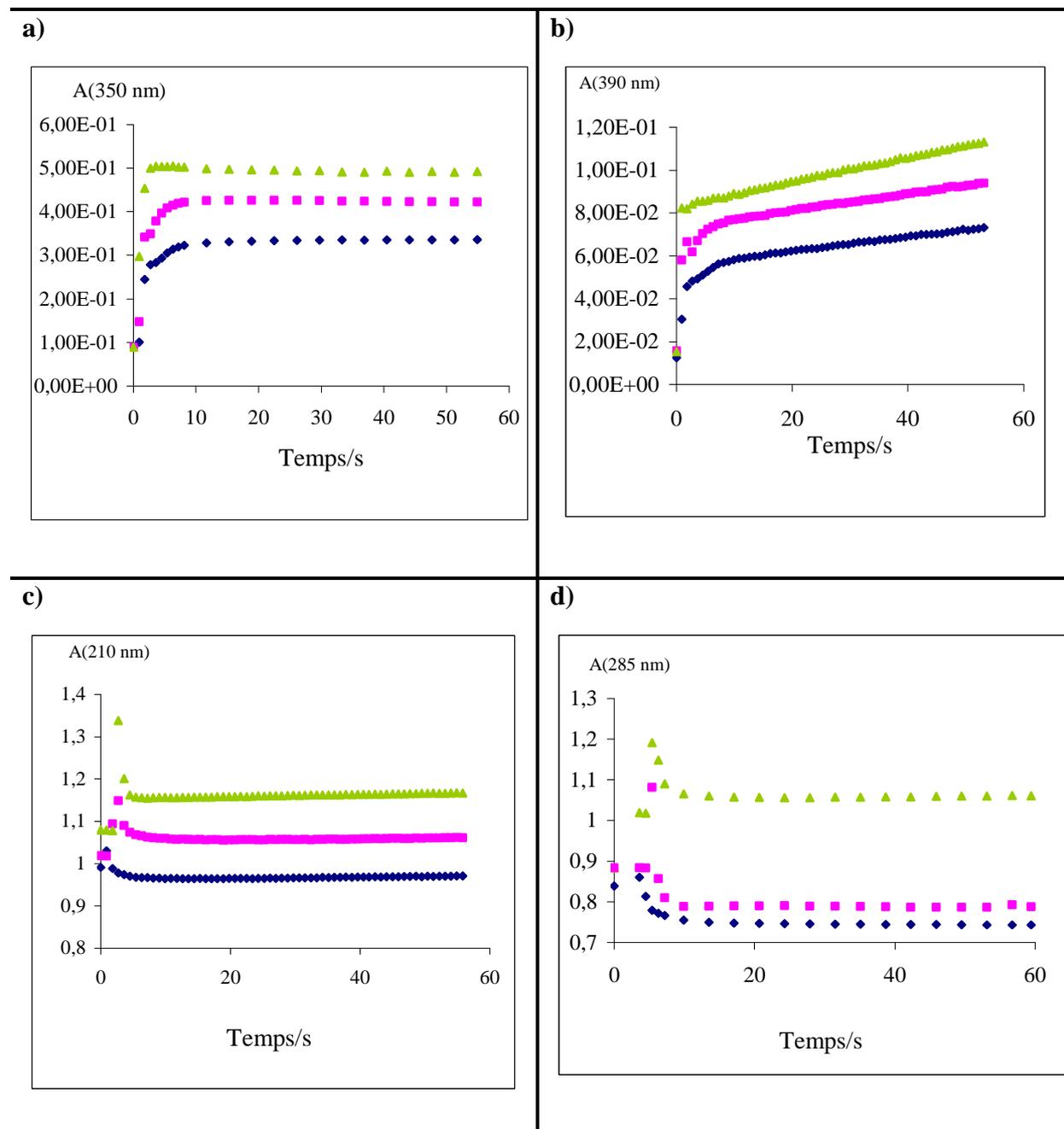
L'addition de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{II}}$  à une solution d'acide caféique dans le tampon phosphate produit des changements spectraux plus importants que dans le cas des ions du fer. En particulier, un déplacement bathochrome de 310 nm à 340-350 nm est observé après addition de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (**Figure 10**) ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande vers 260 nm. Avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , c'est principalement par un fort épaulement vers 350 nm que se manifeste la complexation.



**Figure 10.** Complexation de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (fig. a) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (fig. b) par l'acide caféique (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C. Concentration de l'acide caféique = 50 $\mu\text{M}$ . **1**= 0 s, **2** = 5s, **3**= 60s.

### Complexation acide caféique- $\text{Cu}^{\text{II}}$

La complexation de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  par l'acide caféique est plus rapide que la complexation des ions  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  par le même ligand (**Figure 11**).



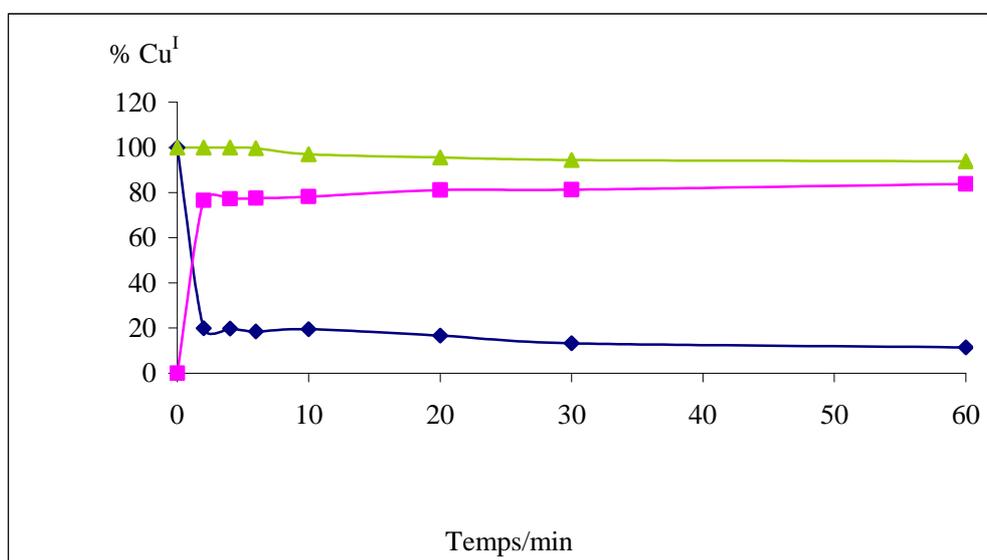
**Figure 11.** Complexation de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (0,5 à 2 *equiv.*) par l'acide caféique (pH= 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 390, 350, 285 et à 210 nm sur une minute. Concentration de l'acide caféique = 50  $\mu\text{M}$ .  $\blacklozenge$   $\rho = 0.5$ ,  $\blacksquare$   $\rho = 1$ ,  $\blacktriangle$   $\rho = 2$ .

L'absorbance de  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-AH}_2$  à 350 nm croît rapidement jusqu'à un palier. Dans l'hypothèse d'une complexation irréversible, la valeur du coefficient d'absorption molaire du complexe est estimée à  $8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Quand  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est en défaut, le complexe  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-AH}_2$  est stable (**Figure 11 a**). Quand  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est en excès, deux étapes sont observées. La première étape correspond à la formation rapide du complexe  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-AH}_2$  (complète en 5-10 s) et se traduit par la croissance de  $A(350 \text{ nm})$ . La seconde est caractérisée par un faible déclin de  $A(350 \text{ nm})$ . La croissance lente de  $A(390 \text{ nm})$  suggère la mise en place d'un processus d'oxydation du ligand (**Figure 11b**).

Par ailleurs, on observe la croissance rapide de  $A(285 \text{ nm})$  et  $A(210 \text{ nm})$  suivie par un déclin également très rapide jusqu'à un palier stable (**fig.11c**, **fig.11d**). Rappelons que l'absorbance à 210 nm est caractéristique du centre métallique et permet de mettre en évidence des changements redox au sein du complexe.

La teneur de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée 2 minutes après avoir ajouté  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (1 equiv.) à une solution d'acide caféique  $\text{AH}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) est environ  $30 \mu\text{M}$  (**Figure 9**), ce qui est significatif. En outre, dans ces mêmes conditions, on observe une réduction massive de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (**Figure12**). Ainsi, il semble que la complexation de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  par l'acide caféique soit rapidement suivie par l'autoxydation de l'acide caféique avec formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figure 12.** Evolution du degré d'oxydation des ions du cuivre dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) avec ou sans  $\text{AH}_2$  (1 équiv.), pH 7,4, 37°C. ♦  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , ■  $\text{AH}_2\text{-Cu}^{\text{I}}$ , ▲  $\text{AH}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ .

### Complexation acide caféique-Cu<sup>I</sup>

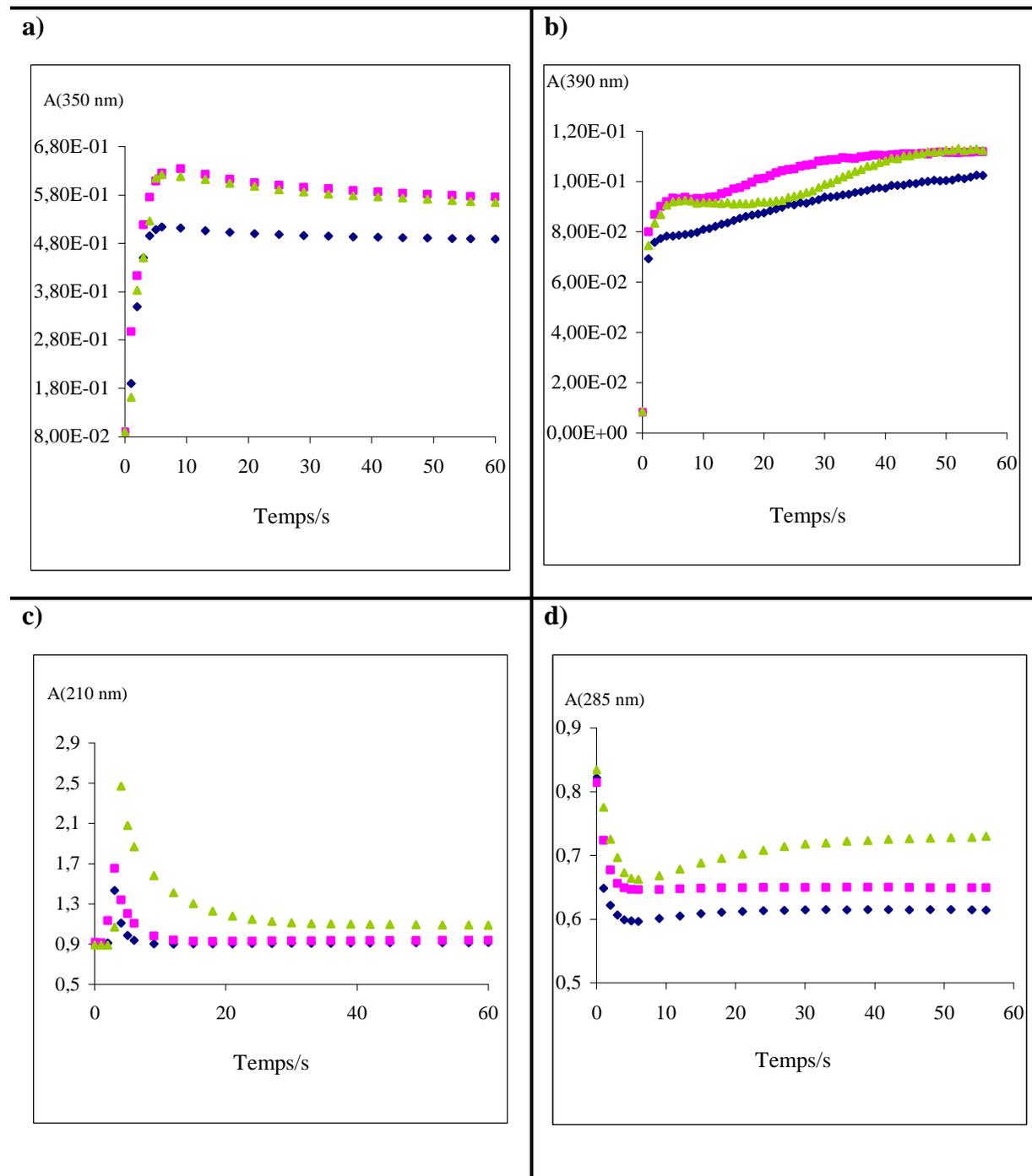
Les modifications spectrales dans ces conditions sont plus nettes qu'avec Cu<sup>II</sup>. Afin de comparer les complexations de Cu<sup>I</sup> et Cu<sup>II</sup>, le suivi spectroscopique a été réalisé aux mêmes longueurs d'ondes (390, 350, 285 et 210 nm) (**Figure 13**).

Quand Cu<sup>I</sup> est en défaut, les modifications spectrales sont faibles après la complexation. Le complexe semble relativement stable.

En présence d'un excès de Cu<sup>I</sup>, un processus multi-étapes est observé. Une première étape de complexation rapide (forte croissance de A(350 nm)) intervient. Elle est complète en quelques secondes (constante de vitesse  $k_1 > 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). On observe alors un lent déclin de A(350 nm) qui va de pair avec une croissance de A(390 nm). Ces changements sont plus nets qu'avec Cu<sup>II</sup>, ce qui suggère une oxydation plus rapide de l'acide caféique.

L'ajout croissant de Cu<sup>I</sup> produit également une forte croissance de A(210 nm) (absorption caractéristique des ions du cuivre) suivie d'un déclin très rapide. Le tracé de  $\Delta A = A_{\text{max}} - A_0$  en fonction de la concentration de Cu<sup>I</sup> est approximativement linéaire. Il permet d'estimer un coefficient d'absorption molaire apparent pour Cu<sup>I</sup> lié de  $16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , valeur très supérieure à celle des ions libres ( $4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) et de Cu<sup>II</sup> lié ( $2440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ainsi, l'absorption à 210 nm est plus particulièrement caractéristique de Cu<sup>I</sup> complexé par l'acide caféique. Le fort déclin de A(210 nm) après ajout de Cu<sup>I</sup> s'interprète par l'autoxydation de AH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup> alors que le déclin modéré de A(210 nm) après ajout de Cu<sup>II</sup> traduit principalement la complexation.

Le dosage de Cu<sup>I</sup> par la méthode à la bathocuproïne montre que Cu<sup>I</sup> garde son état redox en présence de AH<sub>2</sub> (1 équiv.) (**Figure 12**). Enfin, sur les dix 1<sup>ères</sup> minutes de réaction, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est quasiment identique dans les solutions d'acide caféique (100 μM) en présence de Cu<sup>I</sup> ou de Cu<sup>II</sup> (1 *equiv.*). Elle est de l'ordre de 30 μM.



**Figure 13.** Complexation de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (0,5 à 2 équiv.) par l'acide caféique (50  $\mu\text{M}$ ). Suivi spectroscopique à 390, 350, 285 et 210 nm (pH 7,4, 37°C).  $\blacklozenge$   $\rho = 0,5$ ,  $\blacksquare$   $\rho = 1$ ,  $\blacktriangle$   $\rho = 2$ .

Les analyses quantitatives selon des modèles monoexponentiel (déclin de A(210 nm)) ou biexponentiel (déclin de A(350 nm)) ont permis de déterminer les constantes de vitesse correspondantes (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Cu<sup>I</sup> + acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique sur 1 min (après l'étape rapide de complexation). Concentration de l'acide caféique = 50 µM.

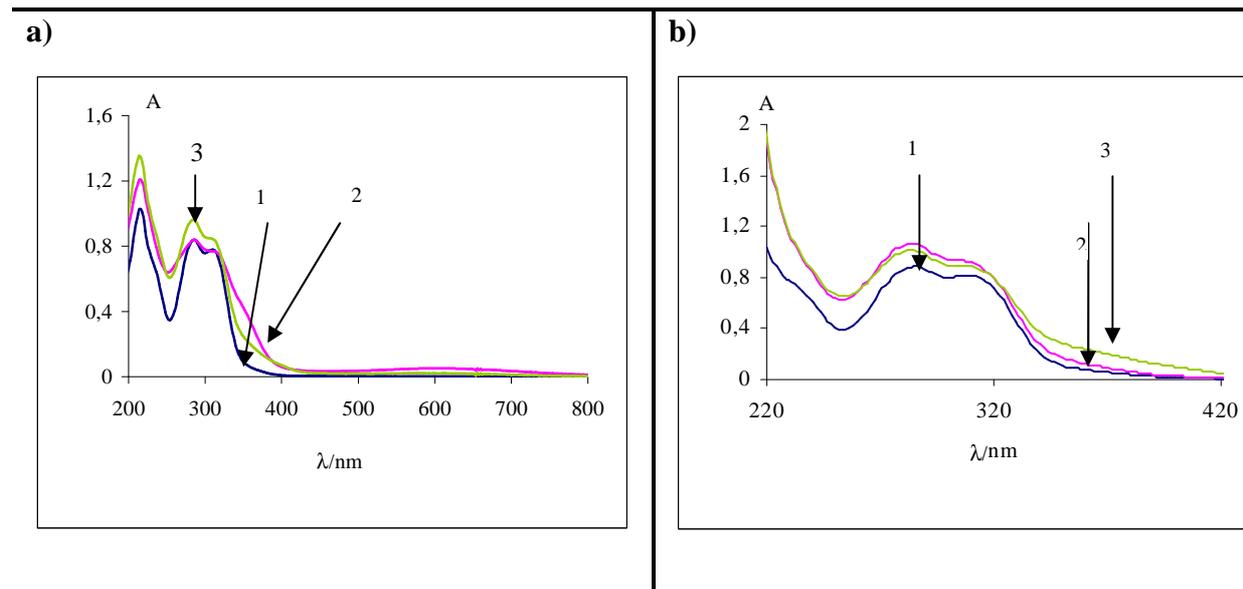
$\rho ; \lambda / \text{nm}$	$10^3 k_2 / \text{s}^{-1}$	$10^5 k_3 / \text{s}^{-1}$	A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub>
0,5 ; 350	94 (± 5)	37 (± 3)	0,498, 0
1 ; 350	104 (± 4)	98 (± 3)	0,604, 0
1 ; 285	124 (± 3)	-	0,615
1,5 ; 350	80 (± 7)	90 (± 9)	0,605, 0
1,5 ; 285	113 (± 2)	-	0,650
2 ; 285	92 (± 1)	-	0,669
2,5 ; 285	67 (± 1)	-	0,732

Le phénomène rapide qui suit l'étape de complexation est caractérisé par la constante de vitesse  $k_2 = 7-12 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , ce qui correspond à une demi-vie de 8 (± 2) s. La forte amplitude des variations de A(210 nm) suggère un changement dans le degré d'oxydation du centre métallique dans le complexe.

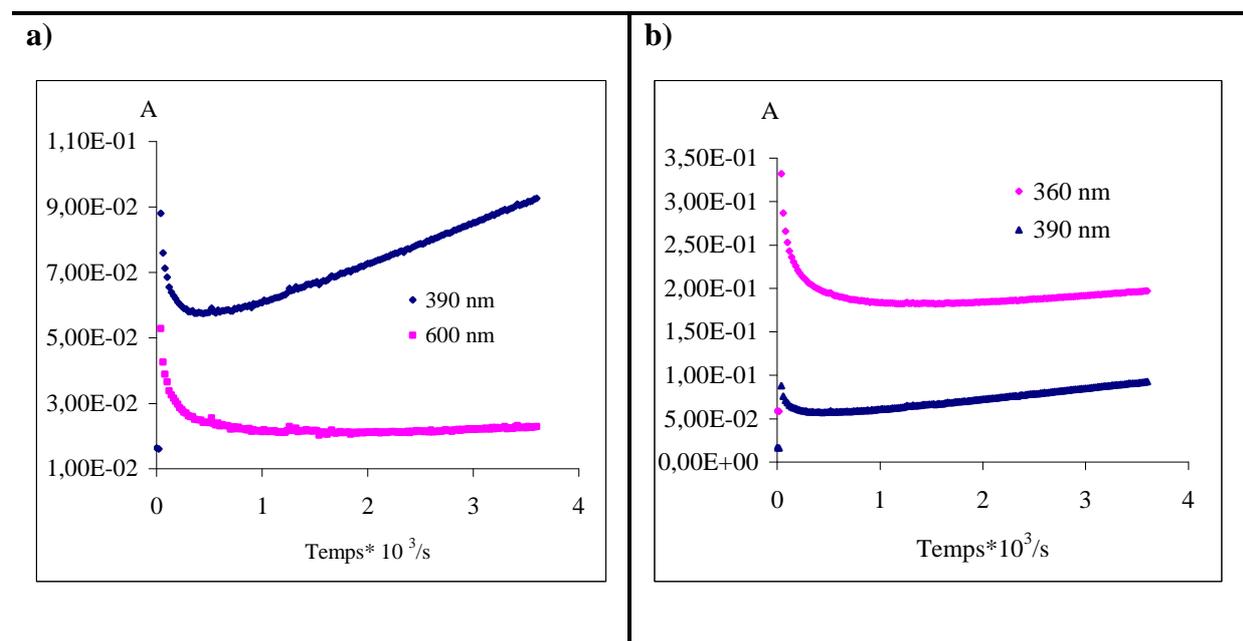
### 2-4-3 Interaction de l'acide caféique avec des ions du fer et du cuivre: autoxydation

#### 2-4-3-1 Autoxydation de l'acide caféique initiée par les ions du fer

L'autoxydation a été suivie sur une heure après l'ajout d'un petit volume d'une solution concentrée de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> à la solution d'acide caféique dans le tampon phosphate.



**Figure 14.** Autoxydation de l'acide caféique (50  $\mu\text{M}$ ) initiée par  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (fig. 14a) ou  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (fig. 14b) (1 *équiv.*) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4). **1** = 0min, **2** = 2min, **3** = 60min.



**Figure 15.** Evolution des absorbances à 390, 360 et 600 nm après addition de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (1 *équiv.*) à une solution d'acide caféique (50 $\mu\text{M}$ ) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).

Après l'étape rapide de complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , les déclins de  $A(360 \text{ nm})$  et  $A(600 \text{ nm})$  se poursuivent sur environ 15 min alors que  $A(390 \text{ nm})$  chute rapidement puis recommence à croître (**Figures 15 et 16**). Outre l'autoxydation rapide de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , ces phénomènes sont attribuables à l'oxydation de l'acide caféique. Les variations de l'absorbance à 390 nm (maximum d'absorption de l'*o*-quinone) pourraient refléter la séquence suivante : formation rapide de l'*o*-quinone rapidement consommée par dimérisation puis oxydation des dimères avec développement de nouveaux chromophores absorbant à 390 nm. Le déclin de  $A(360 \text{ nm})$  est biexponentiel et caractérisé par les constantes de vitesse du 1<sup>er</sup> ordre  $k_3$  et  $k_4$  (**Tableau 5**). L'analyse à 285 nm est en bon accord avec l'analyse à 360 nm. Au-delà de 15 min,  $A(360 \text{ nm})$  recommence à croître.

Après l'étape rapide de complexation de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , on assiste à une croissance monotone de  $A(360 \text{ nm})$  et  $A(390 \text{ nm})$ . A la différence du cas de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , la formation rapide d'un intermédiaire réactif de type *o*-quinone n'est pas observée. Au-delà d'une dizaine de minutes, les évolutions des systèmes acide caféique- $\text{Fe}^{\text{II}}$  et acide caféique- $\text{Fe}^{\text{III}}$  sont proches (**Figures 15 et 16**).

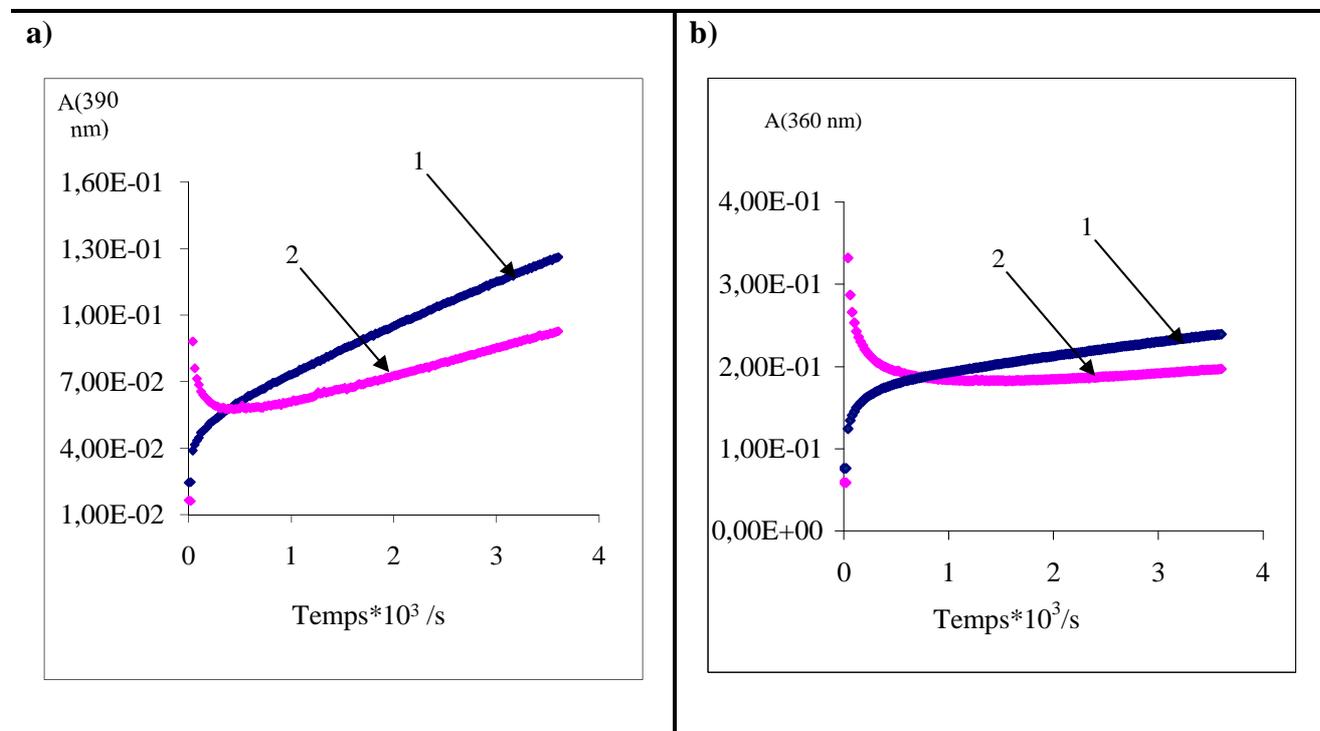
**Tableau 5.** Autoxydation de l'acide caféique induite par les ions du fer (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 ou 285 nm sur 1 h, intervalle de temps pour l'analyse cinétique = 40 - 1180 s a). Concentration d'acide caféique = 50  $\mu\text{M}$ .

$\rho; \lambda / \text{nm}$	Ion	$10^3 k_3 / \text{s}^{-1}$	$10^4 k_4 / \text{s}^{-1}$	$A_1, A_2$
1 ; 360	$\text{Fe}^{\text{II}}$	21 ( $\pm 1$ )	36 ( $\pm 1$ )	0,242, 0,182
1 ; 285	$\text{Fe}^{\text{II}}$	25 ( $\pm 1$ )	33 ( $\pm 1$ )	0,911, 0,960
1 ; 360	$\text{Fe}^{\text{III}}$	11 ( $\pm 1$ )	11 ( $\pm 1$ )	0,158, 0,212
1,5 ; 360	$\text{Fe}^{\text{II}}$	24 ( $\pm 1$ )	40 ( $\pm 1$ )	0,268, 0,199
1,5 ; 285	$\text{Fe}^{\text{II}}$	22 ( $\pm 1$ )	28 ( $\pm 1$ )	1,071, 1,140
1,5 ; 360	$\text{Fe}^{\text{III}}$	9,2 ( $\pm 0,5$ )	7,0 ( $\pm 1,5$ )	0,164, 0,222
2 ; 360	$\text{Fe}^{\text{II}}$	22 ( $\pm 1$ )	43 ( $\pm 1$ )	0,279, 0,198
2 ; 285	$\text{Fe}^{\text{II}}$	21 ( $\pm 1$ )	29 ( $\pm 1$ )	1,144, 1,234

a) phase décroissante de  $A(360 \text{ nm})$  en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$

Les résultats du tableau 5 montrent que la constante de vitesse  $k_3$  (estimée à 360 nm) présente une valeur stable:  $k_3 = 22 (\pm 2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $k_3 = 10 (\pm 1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Nous proposons que cette constante mesure la vitesse d'autoxydation de l'acide caféique au sein des complexes.

La constante  $k_4$  pourrait traduire la participation de la réaction de Fenton (oxydation des dimères avec décomposition de  $H_2O_2$  produit). Les valeurs de  $k_3$  et  $k_4$  avec  $Fe^{III}$  sont 2-3 fois plus faibles qu'avec  $Fe^{II}$ .



**Figure 16.** Evolution de A(390 nm) et A(360 nm) pendant l'autoxydation de l'acide caféique (50 μM) en présence de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> (1 equiv.) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).

1= AH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>, 2= AH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>.

L'accumulation de  $H_2O_2$  est plus rapide en présence de  $Fe^{II}$  qu'en présence de  $Fe^{III}$  mais sature dès les premières minutes à environ 20 μM pour des concentrations initiales de  $Fe^{II}$  et d'acide caféique égales à 100 μM (**Figure 9**). L'accumulation de  $H_2O_2$  en présence de  $Fe^{III}$  est plus progressive et nécessite probablement la réduction préalable de  $Fe^{III}$  par l'acide caféique ou ses dimères et la réoxydation rapide de  $Fe^{II}$  ainsi formé.

L'ensemble des résultats de l'étude des interactions entre l'acide caféique et les ions du fer peut s'interpréter comme suit :

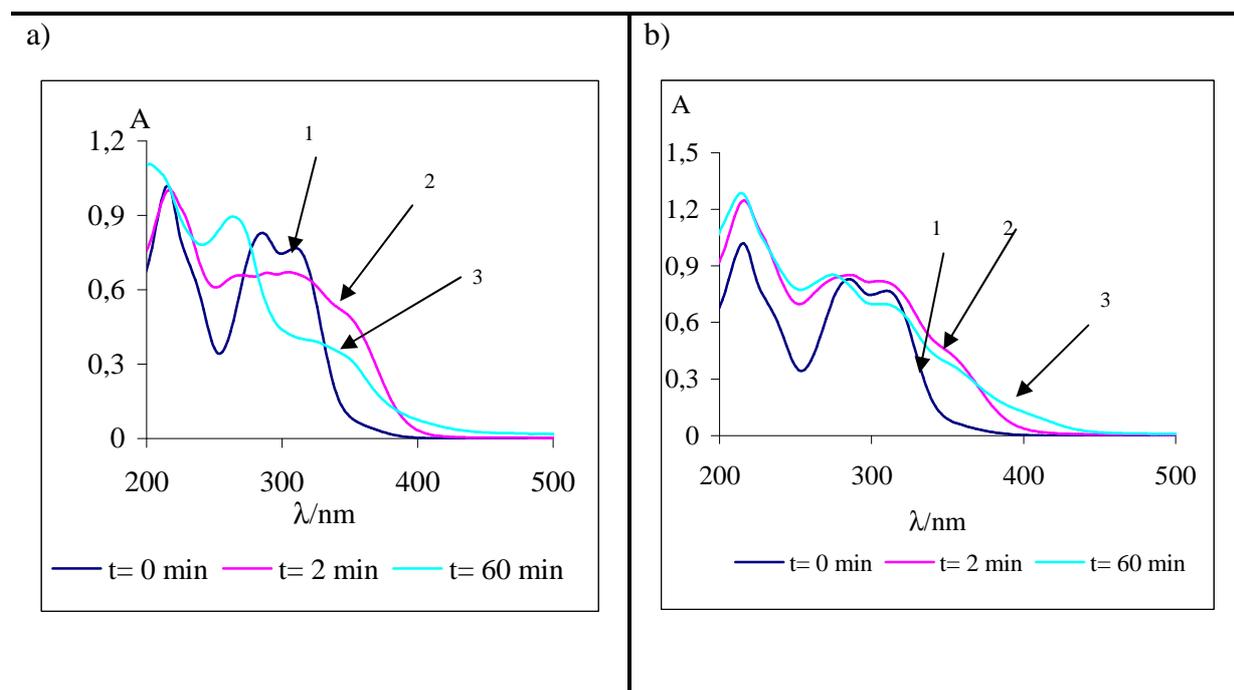
- Une 1<sup>ère</sup> étape de complexation rapide qui produit des changements spectraux plus intenses avec  $Fe^{II}$ .

- Un réarrangement rapide du complexe  $AH_2-Fe^{III}$  en un complexe plus stable alors que le complexe  $AH_2-Fe^{II}$  s'oxyde rapidement (conversion de  $Fe^{II}$  en  $Fe^{III}$ ,  $H_2O_2$  produit d'emblée) avec formation probable d'un intermédiaire de type *o*-quinone (développement d'une absorption à 390 nm).

- A partir des deux systèmes, la formation plus lente de dimères de l'acide caféique (via l'*o*-quinone dans la voie  $Fe^{II}$  d'où le déclin rapide de l'absorbance à 390 nm) qui s'oxydent à leur tour (développement lent d'une absorption à 390 nm). La concentration de  $H_2O_2$  produite reste modeste, ce qui suggère une participation de la réaction de Fenton au processus global d'oxydation.

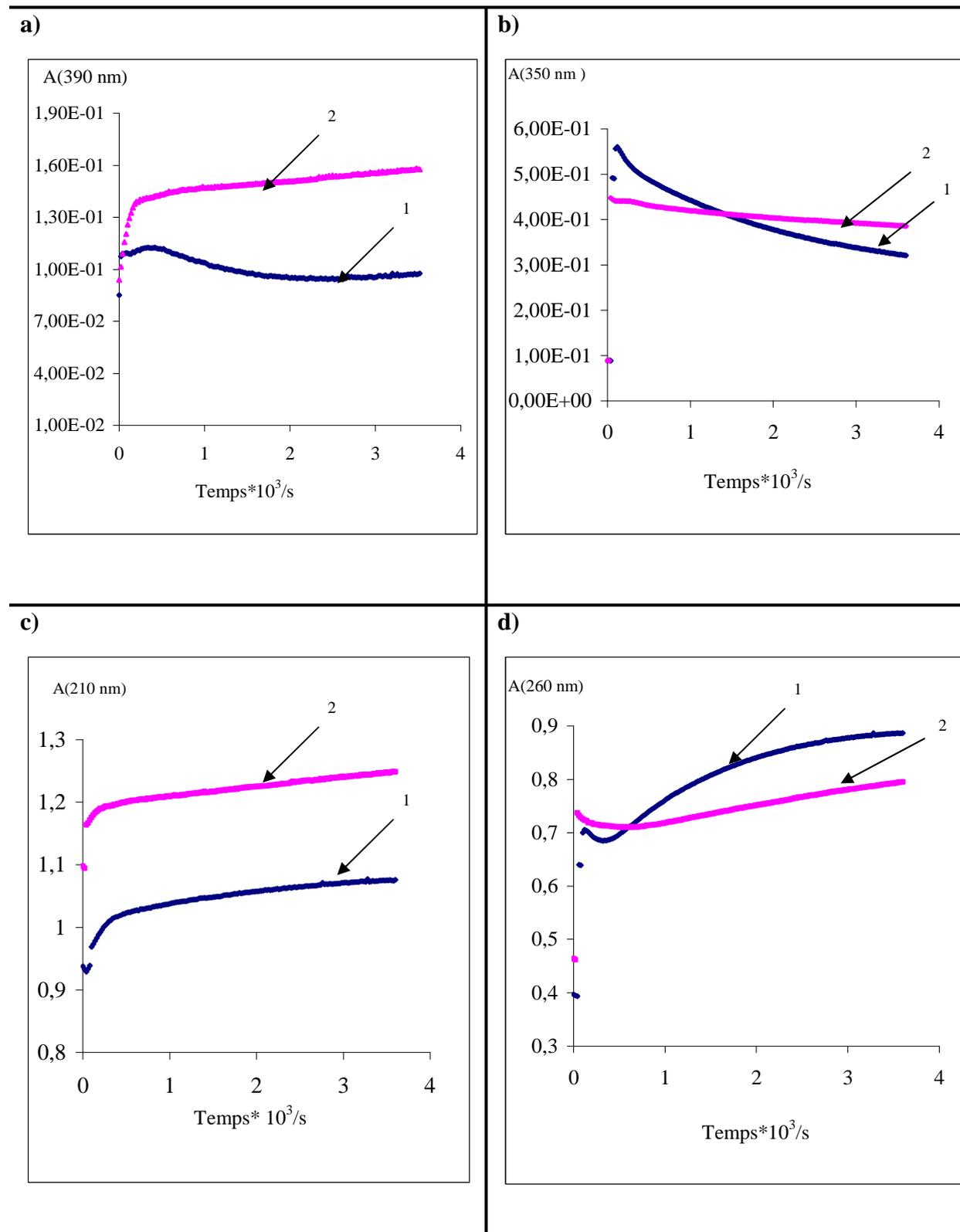
### 2-4-3-2 Autoxydation de l'acide caféique catalysée par les ions du cuivre

Les modifications spectrales de l'acide caféique après addition des ions du cuivre ont été suivies sur une heure par spectroscopie UV-visible (**Figure 17**).



**Figure 17.** Autoxydation de l'acide caféique (50μM) initiée par  $Cu^I$  (fig. 17a) ou  $Cu^{II}$  (fig.17b) (1 équiv.) dans le mélange tampon phosphate (0.01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). **1**= 0min, **2** = 2min, **3** = 60min.

Au-delà de l'étape rapide de complexation, la décroissance de  $A(350\text{ nm})$  (**Figure 18b**) traduit la consommation du complexe. Elle est nettement plus rapide avec  $Cu^I$  qu'avec  $Cu^{II}$ . En particulier, le déclin de  $A(350\text{ nm})$  en présence de  $Cu^{II}$  est marquée par une période d'induction de plusieurs minutes pendant laquelle  $A(350\text{ nm})$  est quasiment constant.



**Figure 18.** Evolution des absorbances à 390, 350, 210 et 260 nm au cours de l'autoxydation de l'acide caféique (50 μM) en présence de Cu<sup>I</sup> ou Cu<sup>II</sup> (1 equiv.) (tampon phosphate, pH 7,4, 37°C). 1= AC-Cu<sup>I</sup>, 2= AC-Cu<sup>II</sup>.

En outre, A(390 nm) croît de manière monotone avec Cu<sup>II</sup> (accumulation de dimères présentant des structures de type *o*-quinone ou *p*-méthylènequinone) alors qu'elle passe par un maximum avec Cu<sup>I</sup>. De telles différences ont déjà été mises en évidence avec les ions du fer. Elles suggèrent la formation de l'*o*-quinone de l'acide caféique quand l'autoxydation est amorcée par l'ion de basse valence (Cu<sup>I</sup>, Fe<sup>II</sup>).

Le déclin de A(350 nm) après l'étape rapide de complexation et, dans le cas de Cu<sup>II</sup>, de la phase de latence au cours de laquelle A(350 nm) ne varie pas, est analysé selon un modèle biexponentiel pour conduire aux constantes de vitesse k<sub>3</sub> et k<sub>4</sub> rapportées dans le Tableau 6.

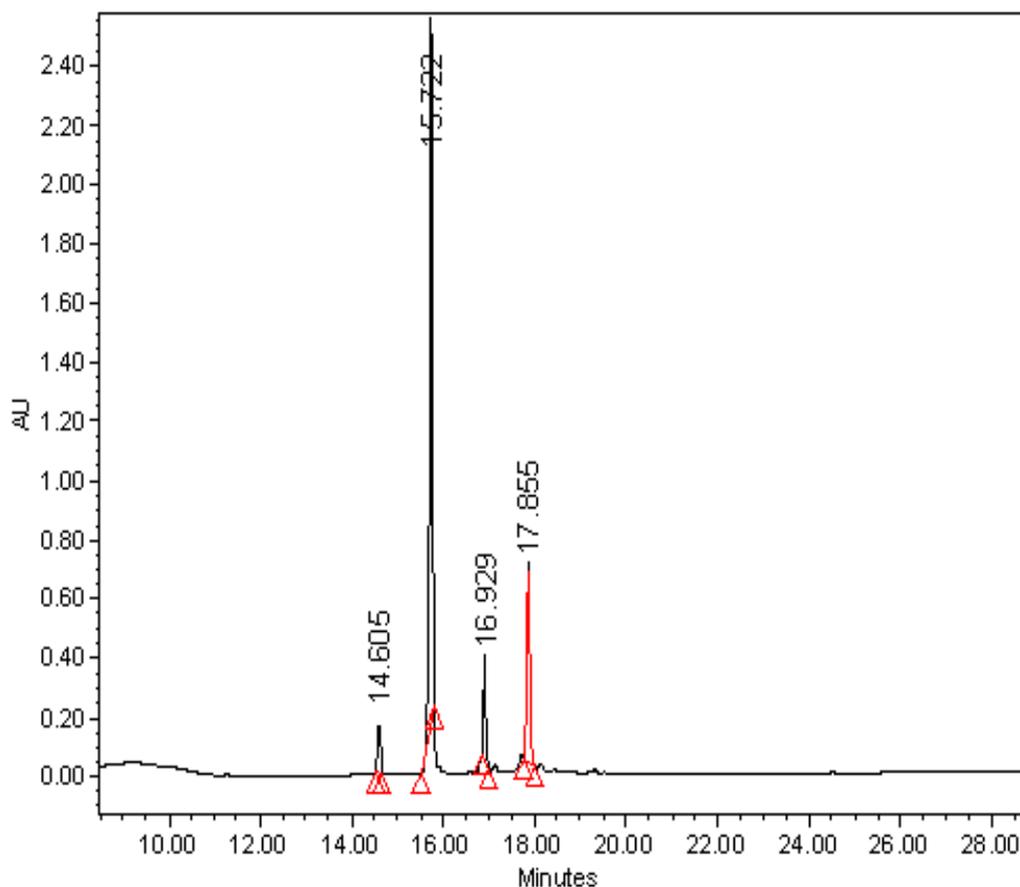
**Tableau 6.** Autoxydation des complexes Cu<sup>II</sup>-acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique sur 1h à 350 nm (temps t<sub>0</sub> du début du calcul après addition de Cu<sup>III</sup>). Concentration de l'acide caféique = 50 μM.

ρ	Ion, t <sub>0</sub> / s	10 <sup>4</sup> k <sub>3</sub> / s <sup>-1</sup>	10 <sup>5</sup> k <sub>4</sub> / s <sup>-1</sup>	A <sub>3</sub> ; A <sub>4</sub>
0,5	Cu <sup>I</sup> , 30-60	72 (± 1)	29 (± 1)	0,498; 0,274
0,5	Cu <sup>II</sup> , 420-440	64 (± 40)	24 (± 1)	0,385; 0,323
1	Cu <sup>I</sup> , 60-80	77 (± 2)	46 (± 1)	0,528; 0,268
1	Cu <sup>II</sup> , 280-300	47 (± 3)	25 (± 1)	0,432; 0,350
1,5	Cu <sup>I</sup> , 20-40	86 (± 1)	61 (± 1)	0,519; 0,271
1,5	Cu <sup>II</sup> , 180-200	39 (± 1)	21 (± 1)	0,534; 0,319
2	Cu <sup>I</sup> , 20-40	83 (± 2)	75 (± 1)	0,512; 0,277
2	Cu <sup>II</sup> , 180-200	60 (± 1)	23 (± 1)	0,585; 0,339
3	Cu <sup>I</sup> , 40-60	65 (± 3)	94 (± 1)	0,494; 0,282
3	Cu <sup>II</sup> , 140-160	75 (± 3)	20 (± 1)	0,604; 0,309

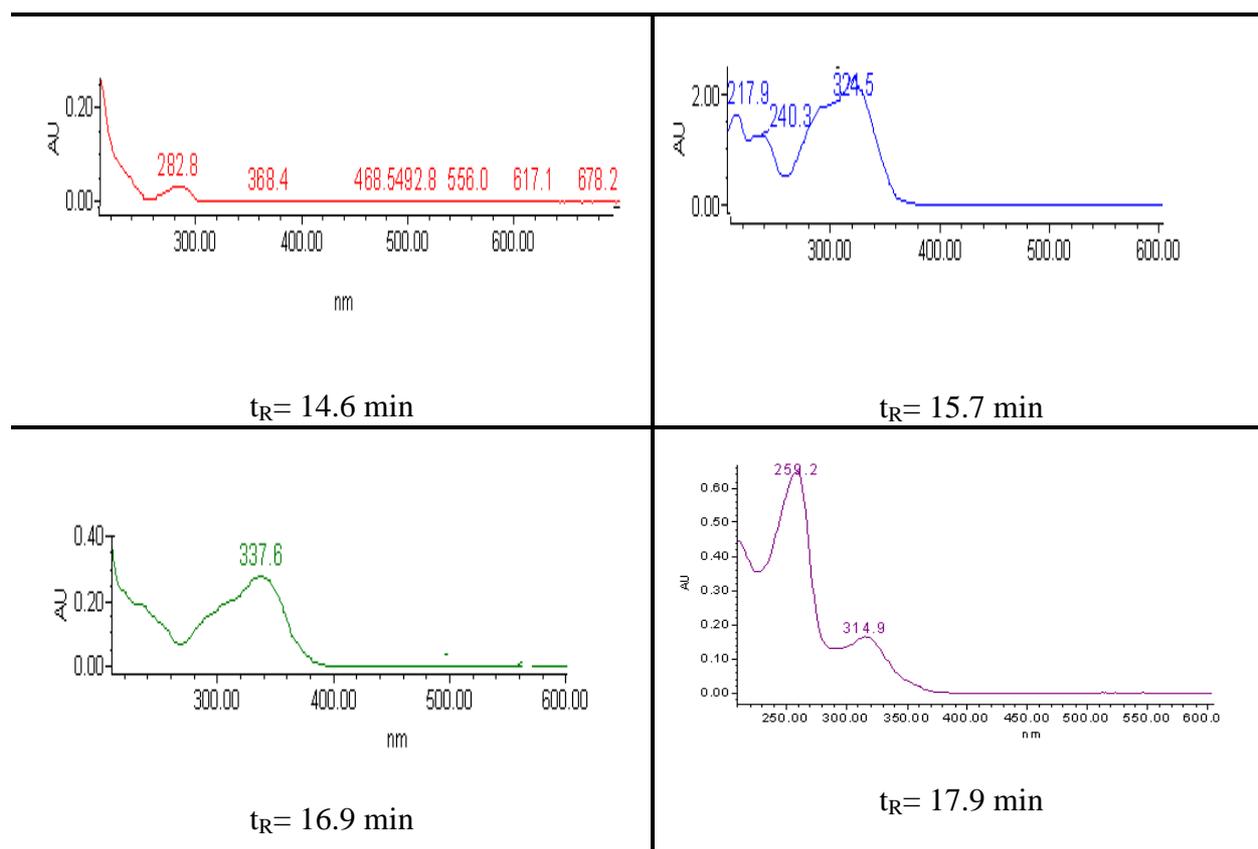
D'après les résultats du **tableau 6**, on peut formuler les remarques suivantes :

- Avec Cu<sup>I</sup>, la constante k<sub>3</sub> (6-9x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) est approximativement constante. En revanche k<sub>4</sub> croît linéairement avec ρ. Cette croissance peut être attribuée à l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à la participation croissante de la réaction de Fenton ;
- En présence de Cu<sup>II</sup>, les constantes k<sub>3</sub> (4-8x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) et k<sub>4</sub> (2-3x10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>) sont approximativement constantes.

Nous avons également analysé par CLHP-UV et CLHP-MS les produits d'oxydation de l'acide caféique en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Les analyses ont été réalisées après 7h d'autoxydation du complexe acide caféique- $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans le tampon phosphate. Quatre pics distincts ont été détectés (**Figure 19**, **Figure 20**).



**Figure 19.** Analyse CLHP des produits d'autoxydation de l'acide caféique ( $10^{-3}\text{M}$ ) produits après 7h de réaction en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.



**Figure 20.** Les spectres UV-visible de l'acide caféique et ses produits d'oxydation.

Trois pics ont été identifiés en comparaison avec les données de la littérature (tableau 7).<sup>15,16,17,18</sup>

**Tableau 7.** Données d'analyse HPLC-MS de l'autoxydation de l'acide caféique (AH<sub>2</sub>) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). Analyse après 7h d'autoxydation en présence de Cu<sup>II</sup> (1 equiv.).

t <sub>R</sub> (min)	m/z	λ <sub>max</sub> (nm)	Structure proposée (schéma 2)
14,6	ND	280	ND
15,7	242, 179	252, 326	ACu <sup>I</sup> , AH <sub>2</sub>
16,9	374, 311, 267, 177	337	Dimère oxydé D <sub>2</sub> (type C-O) a)
17,9	313, 269, 179	316, 260	Dimère D <sub>1</sub> (type C-O) b)

a) D<sub>2</sub> = (AH)<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-2H (M = 312), D<sub>2</sub> - 2H<sup>+</sup> + Cu<sup>I</sup> (M = 374)

b) D<sub>1</sub> = (AH)<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (M = 314)

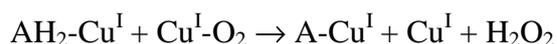
Récapitulons les informations déduites des analyses cinétiques :

- Analyse sur 1 min: sur la base de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de la réduction de Cu<sup>II</sup> en Cu<sup>I</sup> et de la croissance de A(390 nm), il semble que la complexation de Cu<sup>I</sup> et Cu<sup>II</sup> par l'acide caféique soit rapidement suivie (au moins en excès d'ion métallique) d'un processus d'oxydation du ligand. En présence de Cu<sup>I</sup>, le fort déclin de A(210 nm) suggère la formation intermédiaire de Cu<sup>II</sup>.

- Analyse sur 1h: avec Cu<sup>II</sup>, l'absorption caractéristique du complexe à 350 nm ne décline que lentement et après une phase de latence nette. Avec Cu<sup>I</sup>, la consommation du complexe est plus rapide et pourrait impliquer l'*o*-quinone de l'acide caféique. Le déclin biexponentiel de A(350 nm) et la production non stoechiométrique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suggère une participation de la réaction de Fenton.

Les réactions possibles du complexe AH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup> (AH<sub>2</sub>: acide caféique, A: *o*-quinone) sont:

**a)** Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec formation de l'*o*-quinone: AH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup> + O<sub>2</sub> → A-Cu<sup>I</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



A est probablement un ligand faible de Cu<sup>I</sup>, ce qui doit permettre la dissociation du complexe et l'autoxydation de l'ion libre.

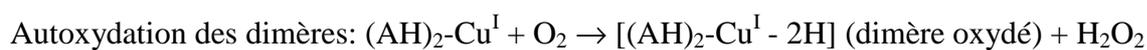
**b)** Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans formation de l'*o*-quinone: 2AH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup> + O<sub>2</sub> → 2AH<sub>2</sub>-Cu<sup>II</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Ces deux processus permettent de justifier les variations de A(210 nm) (formation transitoire de Cu<sup>II</sup> tout particulièrement en excès de Cu<sup>I</sup>) et la production rapide de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le dosage de Cu<sup>I</sup> indique que Cu<sup>I</sup> reste la forme très majoritaire dès les premières minutes de réaction. La formation de Cu<sup>II</sup> doit donc être rapidement suivie de la réduction de Cu<sup>II</sup>.

On peut envisager une dimérisation avec retour ou maintien de Cu au DO + I

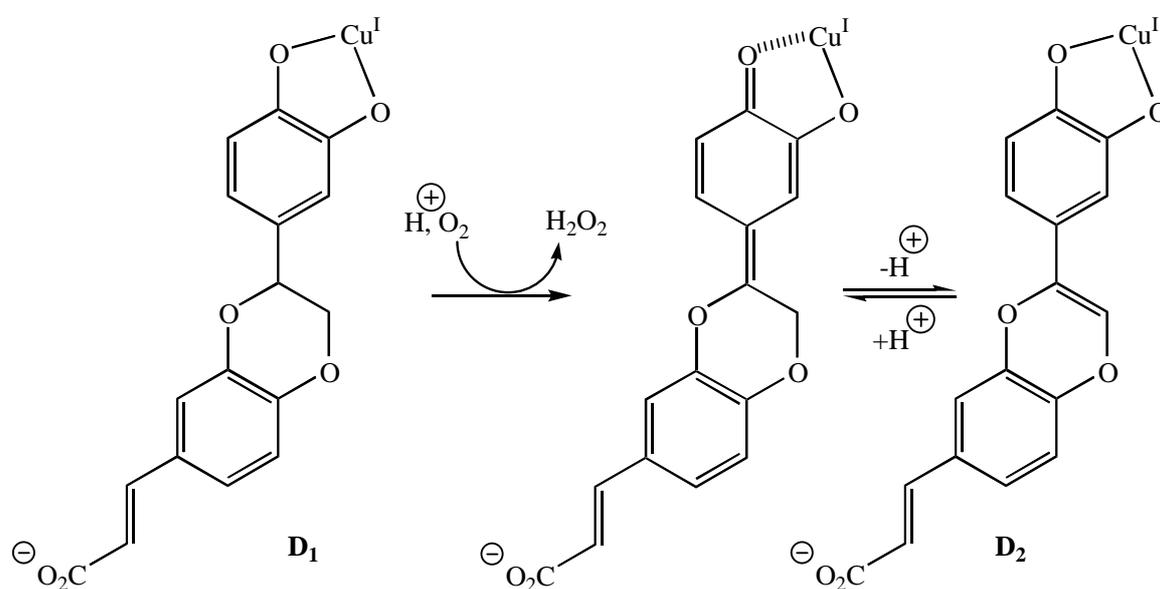


Les réactions possibles du complexe AH<sub>2</sub>-Cu<sup>II</sup> sont:



La production rapide de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aurait lieu par autoxydation de Cu<sup>I</sup>, AH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup> et/ou (AH-Cu<sup>I</sup>)<sub>2</sub>.

En présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , la dimérisation directe (sans intermédiaire *o*-quinone) pourrait être favorisée. En effet, le complexe acide caféique- $\text{Cu}^{\text{II}}$  peut être considéré comme un complexe semiquinone- $\text{Cu}^{\text{I}}$  qui permet le développement d'un caractère radicalaire sur le ligand et permet la formation directe de dimères de type biaryléther. C'est ce que suggère l'analyse HPLC qui met en évidence la formation d'un dimère identique à celui détecté dans l'autoxydation 'spontanée' de l'acide caféique (**Schéma 1**). La croissance continue de A(390 nm) (spécifique au système acide caféique- $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) (**Figure 18**) pourrait alors s'interpréter comme l'autoxydation de ce dimère pour conduire au dimère oxydé également détecté (**Schéma 2**).



**Schéma 2.** Structures possibles pour les dimères produits lors de l'autoxydation de l'acide caféique en présence du  $\text{Cu}^{\text{II}}$

### 2-4-4 Conclusion

On peut dresser un bilan récapitulatif des cinétiques d'autoxydation avec production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au sein des différents complexes métalliques de l'acide caféique (**Tableau 9**). Rappelons que les constantes k<sub>3</sub> et k<sub>4</sub> sont issues de l'analyse des variations spectrales des complexes métalliques sur une heure.

**Tableau 9.** Autoxydation de l'acide caféique induite par les ions du fer et du cuivre (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C)

substrat	10 <sup>6</sup> k <sub>a</sub> / s <sup>-1</sup>	10 <sup>3</sup> k <sub>3</sub> / s <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> k <sub>4</sub> / s <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / μM a)	Etat redox final du métal
AH <sub>2</sub>	82 (± 1)	-	-	12	-
Fe <sup>III</sup> -AH <sub>2</sub>	-	9-11	7-11	38	Fe <sup>III</sup>
Fe <sup>II</sup> -AH <sub>2</sub>	-	21-24	36-40	24	Fe <sup>III</sup>
Cu <sup>II</sup> -AH <sub>2</sub>	-	4-8 b)	2-3	48	Cu <sup>I</sup>
Cu <sup>I</sup> -AH <sub>2</sub>	-	6-9	3-9	71	Cu <sup>I</sup>

a) Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite après 60 min (concentration de AH<sub>2</sub> = 100 μM)

b) phase de latence non traitée

Sur la base de la constante k<sub>3</sub>, l'autoxydation de l'acide caféique en présence des ions du fer semble plus rapide qu'en présence des ions du cuivre, à la différence de ce que nous avons constaté avec la quercétine et la rutine. D'une manière générale, les complexes des ions de basse valence réagissent plus rapidement avec O<sub>2</sub> et permettent la formation de concentrations détectables d'*o*-quinone et l'accumulation plus rapide de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans une 2<sup>e</sup> phase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble participer à l'autoxydation car son accumulation n'est pas stoechiométrique. C'est particulièrement le cas avec les ions du fer (k<sub>4</sub> plus élevée, concentration finale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible). Enfin, les produits d'oxydation détectés sont des dimères de type biaryléther (présence de fragments monomériques dans les spectres de masse), eux-mêmes capables de s'oxyder.

**Références bibliographiques**

- [1] Robbins R.J., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2866–2887.
- [2] Bassil D. Makris D. P. Kefalas P., 2005. *Food Resch. Inter.*, 38, 395-402.
- [3] Radtke J., Linseisen J., Wolfram G., 1998. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft*, 37, 190–197.
- [4] Azmi A.S., Bhat S. H., Hanif S, Hadi S.M., 2006. *FEBS Lett.*, 580, 533–538.
- [5] Bhat S.H., Azmi A.S., Hadi S.M., 2007. *Toxicol. Appl. Pharma.*, 218, 249-255.
- [6] Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H., 2002. *Toxicology*, 177, 67–80.
- [7] Yamanaka N., 1997. *FEBS Lett.*, 405, 186–190.
- [8] Andueza S., Manzocco L., Paz de Peña M., Cid C., Nicoli C., 2009. *Food Resch. Inter.*, 42, 51-55.
- [9] Zheng L-F., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z-L., 2008. *Food Chem. Toxicol.*, 46,149–156.
- [10] Andjelkovic M. , Camp J.V, Meulenaer B. D., Depaemelaere G.,C. Socaciu. Verloo M., Verhe R., 2006. *Food Chem.*, 98, 23–31.
- [11] Chvatalova K., Slaninova I., Brezinova L., Slanina J., 2008. *Food Chem.*, 106, 650–660.
- [12] Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., 2005. *J. Agric.Food Chem.*, 53, 2704–2709.
- [13] Deiana S., Premoli A., Senette C., 2007. *Chemosphere*, 67, 1919–1926.
- [14] Boilet L., Cornard P. Lapouge C., 2005. *J. Phys. Chem.*, 109, 1952-1960.
- [15] Roche M., Dufour C., Mora N., Dangles O., 2005. *Org. Biomol. Chem.*, 3, 423-430.
- [16] Pati S., Losito I., Palmisano F., Zambonin P.G., 2006. *J. Chrom. A.*, 1102, 184-192.
- [17] Ryuichi A., Masashi Y., Hiroki H., Toshiyuki O., Takashi K., 2004. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*,15, 1228-1236.
- [18] Petrucci R., Astolfi P., Greci L., Firuzi O., Saso L., Marrosu G., 2006. *Electrochim. Acta.*, 52, 2461-2470.

---

## CHAPITRE 2-5

### Interactions de l'Acide Gallique et la Catéchine avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation

---

Dans la littérature, on trouve plusieurs études sur les interactions entre les ions de métaux de transition et les polyphénols.<sup>1,2,3</sup> En général, les ligands étudiés ne présentent qu'un seul site de complexation métallique. Or, la plupart des polyphénols de l'alimentation présentent plusieurs sites de complexation, ce qui complique l'étude. Par exemple, les groupements catéchol ou pyrogallol sont les sites de complexation des ions métalliques des flavanols du thé vert, principalement l'épicatéchine (EC), l'épicatéchine-3-gallate (ECG), l'épigallocatechine (EGC), l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) et la catéchine.<sup>4,5</sup>

Les catéchines ont une grande influence sur la couleur, la saveur et le goût du thé. Les études biologiques et épidémiologiques soulignent également leur effets bénéfiques pour la santé.<sup>6,7,8,9,10</sup>

L'acide gallique est l'acide phénolique le plus important dans le thé vert. Il est doté de propriétés antioxydantes, antifongiques et anticancéreuses.<sup>11</sup>

---

<sup>1</sup> Ryan P., Hynes J.M., 2007. *J. Inorg. Biochem.* ,101, 585-593.

<sup>2</sup> Yongnian Ni. et coll., 2007. *Anal.Chim. Acta*, 584, 19-27.

<sup>3</sup> EL Hajji, H. et coll., 2006. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.

<sup>4</sup> Khokhar S., Apenten R. K. O., 2003. *Food Chem.* ,81,133-140.

<sup>5</sup> Moran J. F. et coll. ,1997. *Free Radical Bio. Med.*,22, 861-870.

<sup>6</sup> Yusuf Yilmaz, 2006. *Trends Food Sci. Tech.*,17, 64-71.

<sup>7</sup> Zaveri NT., 2006. *Life Sci* ,78, 2073-2080.

<sup>8</sup> Zuo Y. coll. 2002. *Talanta* ,57, 307-316.

<sup>9</sup> Fujiki H., 2005. *Chem. Rec*,5, 119-132.

<sup>10</sup> Xu X. Q., Huang H., 2004. *J. Tea* ,30, 141-142.

<sup>11</sup> Yang D-J. et coll., 2007. *J. Chromatography A* , 1156, 312-320.

Dans une étude *in vitro* simulant les conditions de digestion,<sup>12,13</sup> il a été démontré que le fer de la viande diminue l'activité antioxydante du thé vert et du vin rouge. Il a également été démontré que l'absorption du fer au travers de la paroi intestinale est inhibée par les composés phénoliques de l'alimentation tels que ceux du thé vert.<sup>14</sup>

Vraisemblablement, le complexe ion métallique-phénol formé dans le tractus digestif n'est pas capable de franchir la barrière des cellules intestinales.<sup>15</sup>

La stœchiométrie des complexes de  $Fe^{3+}$  avec les catéchines du thé vert a été étudiée par Jovanovic et coll. (1998) à pH 7.<sup>16</sup> Les constantes apparentes de formation ( $\beta_{app}$ ) ont été évaluées en compétition avec l'EDTA. Les résultats de ce travail sont présentés dans le **tableau 1**.

**Tableau 1.** Valeurs de  $pK_a$  des catéchines seuls dans l'eau, stœchiométrie (n) des complexes  $Fe^{III}(\text{ligands})_n$  et leurs constantes apparentes de complexation.<sup>16,17</sup>

Ligands	n	$pK_{a1}$ pour les catéchines dans l'eau <sup>a)</sup>	Complexes <sup>b)</sup>	$pK_{a2}$ pour les catéchines dans l'eau <sup>a)</sup>	Complexes <sup>b)</sup>	$\beta_{app}$ <sup>c)</sup>
C	3					
EGCG	2	7,59	4,40	10,70	7,40	$4 \cdot 10^{27}$
EGC	2	7,9	4,90	9,11	8,60	$2,5 \cdot 10^{27}$
ECG	2	7,74	4,30	9,11	7,30	$2 \cdot 10^{27}$

a)  $pK_a$  valeur évaluée dans l'eau.<sup>17</sup>

b) seuls  $Fe^{3+}$  et le ligand sont présent dans le milieu.<sup>16</sup>

c) constante apparente de stabilité calculée par compétition avec EDTA ( $\log\beta = 25,0$  pour [Fe-EDTA]).

La différence de stœchiométrie entre la catéchine,  $n = 3$ , et les formes gallates,  $n = 2$ , proviendrait du nombre de groupes hydroxyles disponibles, 3 pour la partie gallate et 2 pour la catéchine. Il semblerait que la complexation des catéchines avec le fer diminue leur  $pK_a$  ainsi que leur pouvoir antioxydant.<sup>16,17</sup>

<sup>12</sup> Alexandropoulou I. et coll., 2006. *Food Chem.*, 94, 359- 365.

<sup>13</sup> Argyri K. et coll., 2006. *Food Chem.*, 96, 281-289.

<sup>14</sup> Argyri K. et coll., 2005. *Inter. Food Sci. Nutr.*, 56, 213-222.

<sup>15</sup> Kapsokafalou M. et coll., 2006. *Nutr. Res.*, 26, 480- 485.

<sup>16</sup> Jovanovic S. V. et coll., 1998. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 11, 2365-2370.

<sup>17</sup> Kumamoto M. et coll., 2001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 126-132.

La capacité de diverses catéchines à générer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical hydroxyle en présence d'ion du cuivre et du fer a été étudiée à température ambiante et pH 7,4.<sup>18</sup> L'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir du complexe Cu<sup>II</sup>-EGC est plus forte qu'à partir du complexe Cu<sup>II</sup>-EGCg, ce qui souligne le rôle-clé du groupement pyrogallol. En présence d'ion du fer, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est marginale. Les complexes EC-Cu<sup>II</sup> et EGC-Cu<sup>II</sup> peuvent également générer le radical hydroxyle, phénomène qui n'est pas observé dans le cas des complexes galloylés Cu<sup>II</sup>-ECg et EGCg-Cu<sup>II</sup>.

Andjelkovic et coll. ont effectué une étude spectroscopique des interactions de certains acides phénoliques avec les ions du fer.<sup>19</sup> Le calcul des constantes de complexation montre que l'acide gallique a plus d'affinité pour les ions du fer que l'acide protocatéchuique. C'est aussi un meilleur antioxydant.<sup>20,21</sup> En outre, seul l'acide gallique est capable de réduire Fe<sup>III</sup> en Fe<sup>II</sup>.<sup>22</sup>

Dans ce présent travail, nous allons étudier et comparer la capacité de complexation des ions du fer et du cuivre par le groupement catéchol de la catéchine (noté CH2) et par le groupement pyrogallol de l'acide gallique (noté AG). Nous étudierons également les conséquences de la complexation métallique sur la sensibilité de ces deux phénols à l'autoxydation.

---

<sup>18</sup> Hayakawa F. et coll., 2004. *Biosci, Biotechnol, Biochem.*, 68, 1825-1830.

<sup>19</sup> Andjelkovic M., et coll., 2006. *Food Chem.*, 98, 23-31.

<sup>20</sup> Cao G. H., 1997. *Free Radical Bio. Med.*, 22, 749-760.

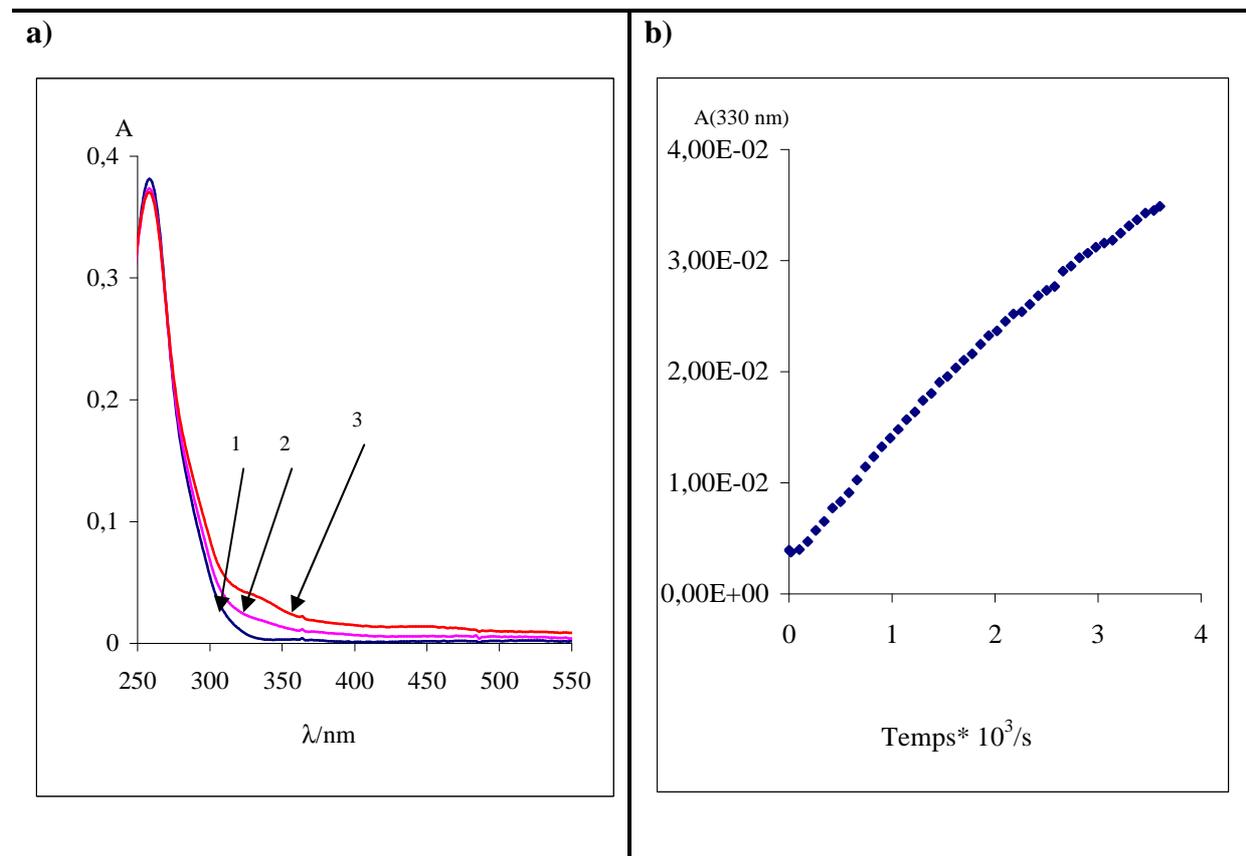
<sup>21</sup> Hider R. C., 2001. *Flavonoids and Other Polyphenols*, 335, 190-203.

<sup>22</sup> Fiuza S. M., 2004. *J. Mol. Struct.*, 693, 103-118.

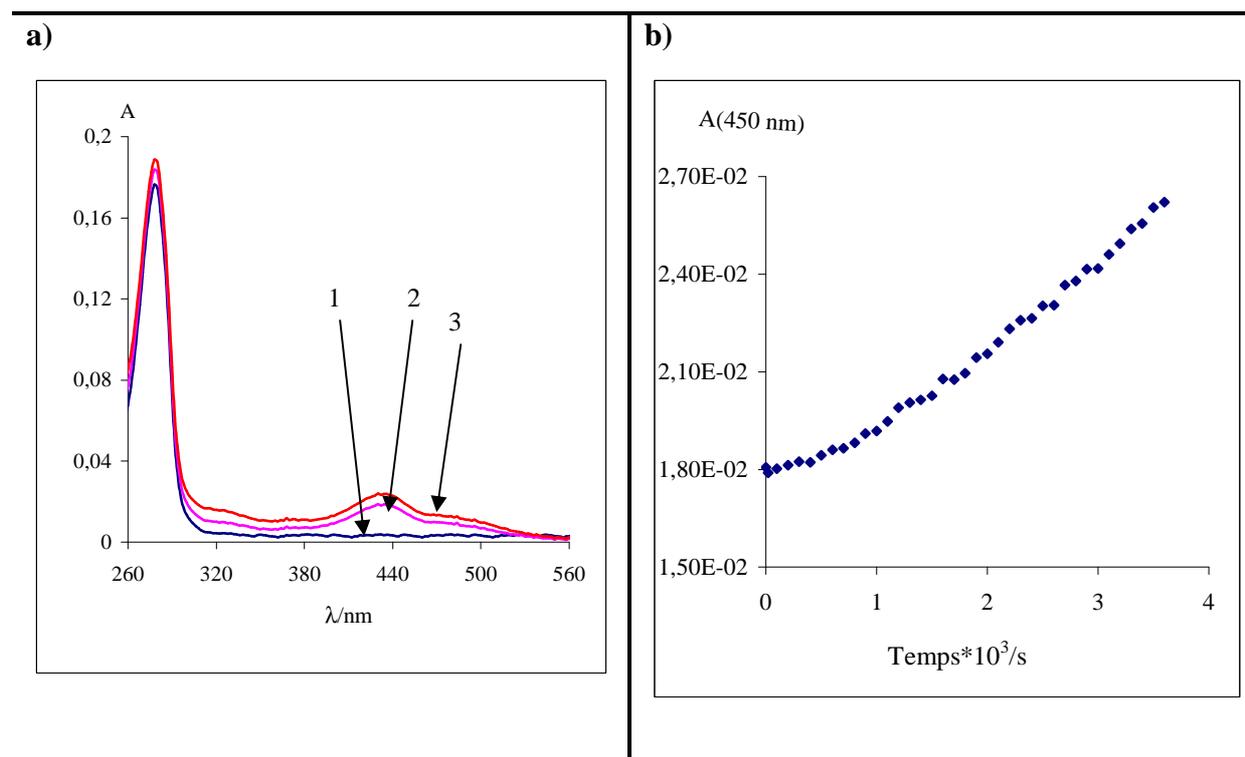
### 2-5-1 Stabilité de l'acide gallique et de la catéchine dans le tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C

#### Etude spectroscopique

L'évolution de la catéchine et de l'acide gallique dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C) a été suivie par spectroscopie UV-visible (**Figure 1**, **Figure 2**).



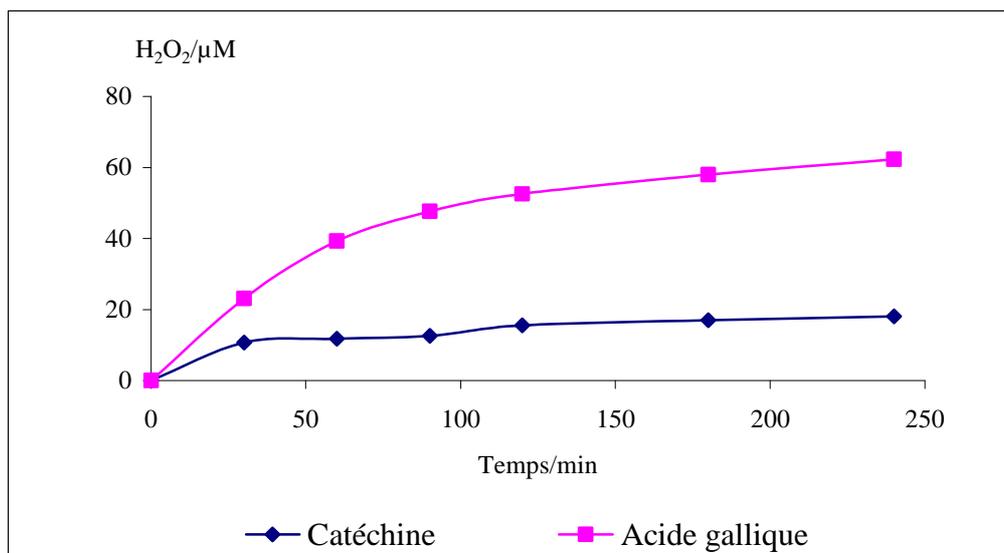
**Figure 1.** a) Autoxydation de l'acide gallique (50 μM) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. b) Variation de l'absorbance des produits d'oxydation de GH<sub>2</sub> à 330 nm en fonction du temps. **1** = 0min, **2** = 30min, **3** = 60min.



**Figure 2.** a) Autoxydation de la catéchine (50  $\mu\text{M}$ ) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), 37°C, pH 7,4. b) Variation de l'absorbance des produits d'oxydation de  $\text{CH}_2$  à 450 nm en fonction du temps. **1** = 0min, **2** = 30min, **3** = 60min.

Le suivi spectroscopique sur une heure de l'autoxydation de la catéchine et de l'acide gallique met en évidence une lente accumulation de produits d'oxydation absorbant dans le domaine 300-500 nm. Les constantes de vitesse apparentes d'autoxydation de l'acide gallique et de la catéchine en l'absence d'ion métallique ajouté sont respectivement  $187 (\pm 4) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  et  $2.83 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Les temps de demi-vie de l'acide gallique et de la catéchine sont donc respectivement de 1 h et de 4 h environ.

L'accumulation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit lors de l'autoxydation suit la même tendance, après 3h de réaction, 60% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont accumulés pendant l'autoxydation de l'acide gallique (100  $\mu\text{M}$ ) contre seulement 15% durant l'autoxydation de la catéchine (100  $\mu\text{M}$ ) (**Figure 3**). Il est donc clair que l'acide gallique est moins stable dans le tampon phosphate que la catéchine

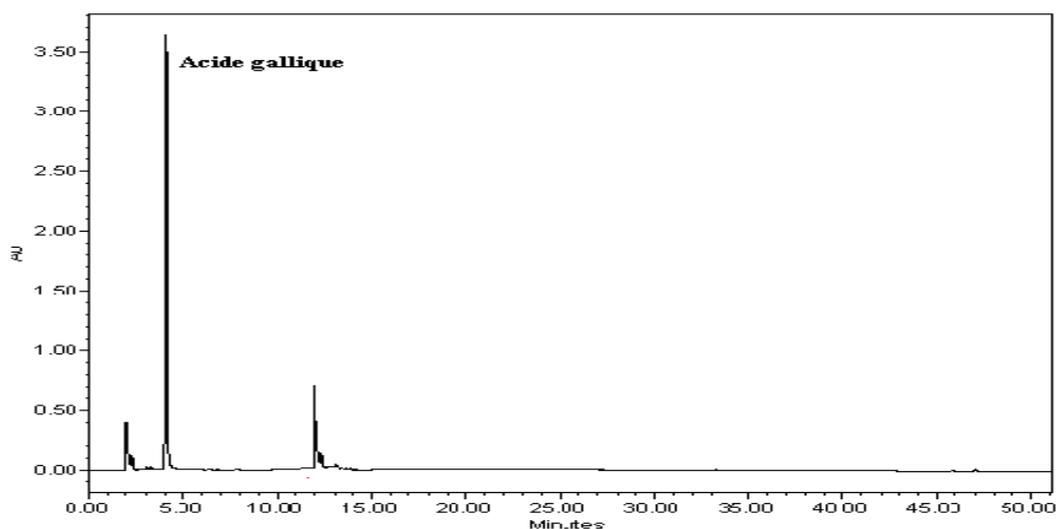


**Figure 3.** Teneur de  $H_2O_2$  produite lors de l'autoxydation de l'acide gallique et de la catéchine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. Concentration initiale de phénol = 100  $\mu M$ .

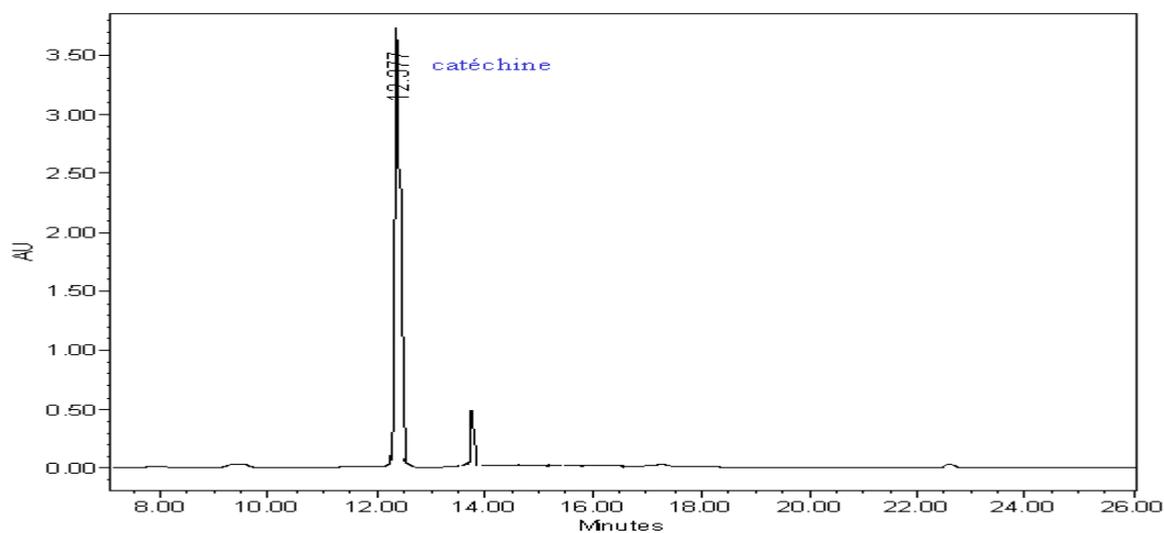
#### Analyse HPLC-MS

L'identification des produits d'oxydation de l'acide gallique et de la catéchine en l'absence d'ion métallique ajouté a été réalisée par CLHP couplée à la spectrométrie de masse et à la spectroscopie UV-Visible. Des échantillons fraîchement préparés sont injectés après 7h d'autoxydation dans le tampon phosphate.

Pour chaque polyphénols, deux pics de différents temps de rétention ont été détectés et identifiés par CLHP-MS (**Figures 4 et 5 et tableaux 2 et 3**).



**Figure 4.** Chromatogramme CLHP des produits d'autoxydation de l'acide gallique (0,01 M) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).



**Figure 5.** Chromatogramme CLHP des produits d'autoxydation de la catéchine ( $2 \times 10^{-3}$  M) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).

**Tableau 2.** Analyse HPLC-MS de l'autoxydation (7h) de l'acide gallique ( $10^{-2}$  M) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C) en absence d'ion métallique ajouté.

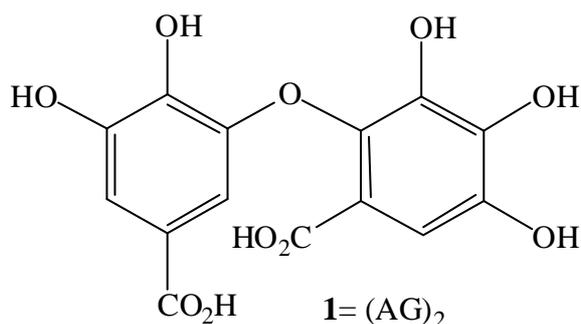
$t_R$ (min)	m/z	$\lambda_{max}$ (nm)	Structure proposée
4,80	169	228, 272	AG
12,66	169, 249, 337	247, 291	<b>1</b> = (AG) <sub>2</sub> Fragments : <b>1</b> – 2CO <sub>2</sub> , AG

**Tableau 3.** Analyse HPLC-MS de l'autoxydation (7h) de la catéchine ( $2 \times 10^{-3}$  M) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C) en absence d'ion métallique ajouté.

$t_R$ (min)	m/z	$\lambda_{max}$ (nm)	Structure proposée
12,37	137, 289	280	CH <sub>2</sub>
13,92	137, 289, 439, 577	280	<b>1</b> = (CH) <sub>2</sub> Fragment : CH <sub>2</sub>

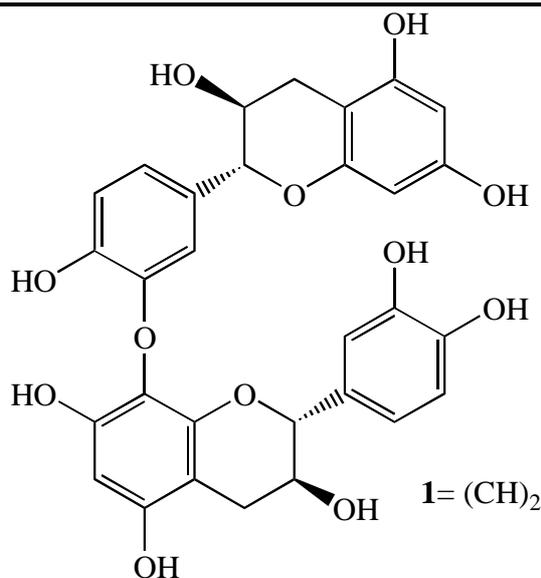
Produits d'oxydation de l'acide gallique

Un dimère de l'acide gallique (**1**) est systématiquement détecté après autoxydation 'spontanée'. La présence du fragment semi-quinone suggère que le dimère formé est de type C-O (biaryléther).

**Schéma 1.** Proposition de structure pour le dimère détecté au cours de l'autoxydation de l'acide gallique dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).

Produits d'oxydation de la catéchine

Le premier composé détecté ( $t_R = 12,37$  min,  $m/z = 289$ ) est la catéchine résiduelle. Le deuxième composé ( $t_R = 13,92$  min,  $m/z = 577$ ) est un dimère incolore (**1**) de type C-O comme en témoigne la présence d'un fragment semi-quinone. Dans la dimérisation, la semi-quinone formée par arrachement d'un atome H sur le noyau B (O3'-H ou O4'-H) s'additionne sur le cycle A (C6 ou C8) nucléophile d'une 2<sup>e</sup> molécule de catéchine.



**Schéma 2.** Proposition de structure pour le dimère détecté au cours de l'autoxydation de la catéchine dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).

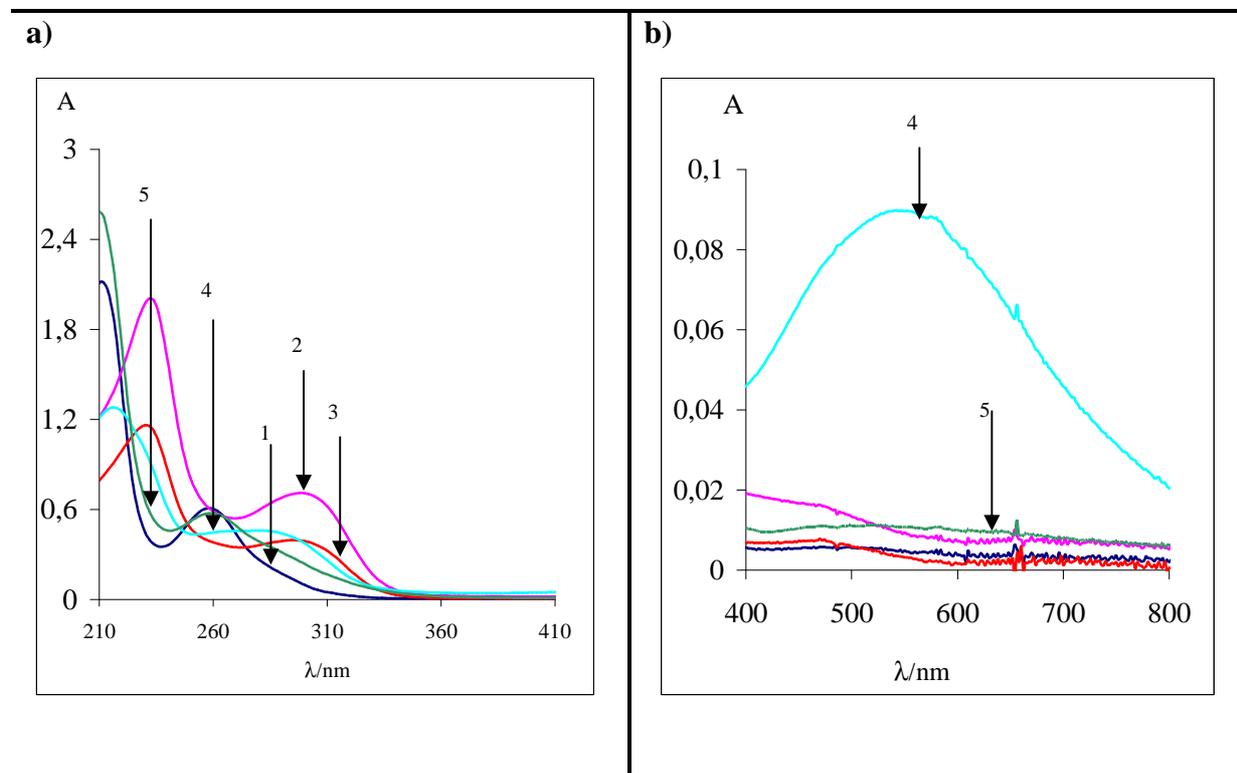
## 2-5-2 Interaction de l'acide gallique avec les ions du fer et du cuivre: complexation et autoxydation

### 2-5-2-1 Complexation

La complexation métallique de l'acide gallique en présence des ions  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ou  $Cu^I/Cu^{II}$  (pH 7,4, 37 °C) a été suivie par spectroscopie UV-visible (**Figure 6**). Pour chaque complexe, le tracé de l'absorbance (à une longueur d'onde fixe où le complexe absorbe) en fonction du temps ou de la concentration totale d'ion métallique est quantitativement analysé.

En absence d'ion métallique, l'acide gallique est caractérisé par une seule bande d'absorption dans le domaine 260-280 nm. L'addition d'un petit volume d'une solution concentrée de  $Cu^I/Cu^{II}$  ou de  $Fe^{II}/Fe^{III}$  à une solution d'acide gallique provoque un déplacement bathochrome de cette bande, tout particulièrement avec les ions du cuivre.

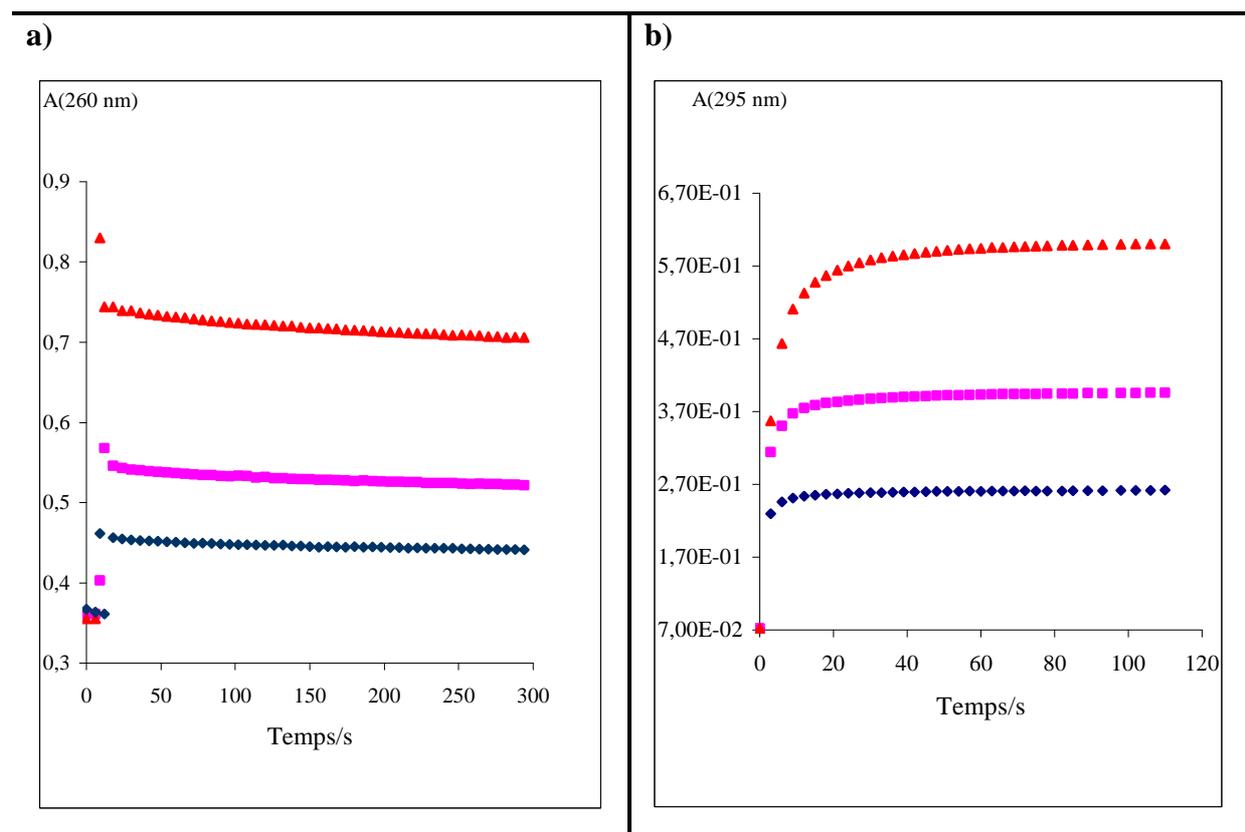
Dans le cas de la complexation par  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , deux bandes caractéristiques du complexe ont été détectées: une bande qui absorbe dans l'intervalle 290-300 nm et une deuxième très large qui absorbe dans l'intervalle 400-600 nm (voir **fig. 6**).



**Figure 6.** Complexation de l'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) par un  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  et  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M) / MeOH (95/5) (37°C, pH 7,4). **1** = AG, **2** = AG- $\text{Cu}^{\text{I}}$ , **3** = AG- $\text{Cu}^{\text{II}}$ , **4** = AG- $\text{Fe}^{\text{II}}$ , **5** = AG- $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

### a- Complexation de $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$

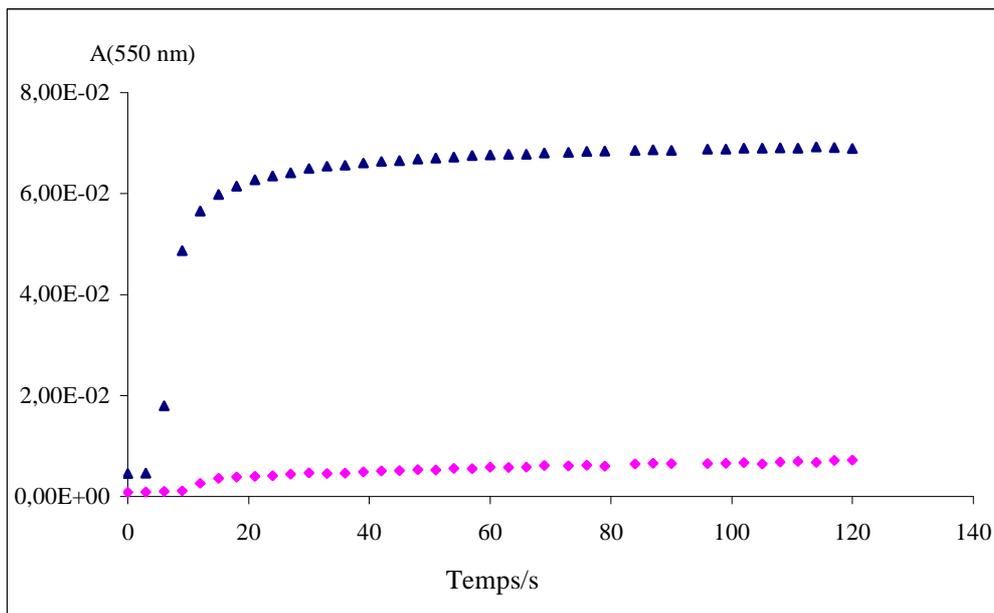
La complexation est suivie en mode cinétique. Les conséquences spectrales de l'addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  sont différentes de celles de l'addition de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Ainsi, la bande d'absorption maximale de l'acide gallique à 260 nm n'est pas déplacée après addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Cependant, l'intensité de cette bande s'amplifie après l'ajout de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . En revanche, l'addition de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  à la solution d'acide gallique produit des effets plus spectaculaires: deux bandes d'absorption ( $\lambda_{\text{max}} = 295 \text{ nm}$  et  $550 \text{ nm}$ ) indiquant la formation du complexe sont détectées.



**Figure 7.** Variations spectrales en fonction du temps après addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (0,5-2 *équiv.*, partie a) et de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (0,5-2 *équiv.*, partie b) à une solution d'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C). •  $\rho = 0,5$ , ■  $\rho = 1$ , ▲  $\rho = 2$ .

L'absorbance en fin d'analyse augmente linéairement avec la concentration totale de  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  (**Figure 7**). Cette croissance doit être corrigée de l'absorbance des ions libres ( $\epsilon = 3910 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 260 nm,  $\epsilon = 2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 295 nm). Ainsi, la croissance rapide de A(260 nm) après ajout de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est essentiellement due à l'ion libre et ne traduit en fait pas la complexation. Seul le lent déclin observé au cours de l'analyse pourrait traduire soit une complexation lente en compétition avec les ions phosphates, soit l'amorce d'un processus d'autoxydation induit par  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . En revanche, la croissance plus lente de A(295 nm) après ajout de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est plus forte que celle due à l'ion libre et traduit bien la complexation.

Le suivi cinétique à 550 nm (**Figure 8**) confirme la complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par l'acide gallique alors que la complexation de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est presque négligeable.



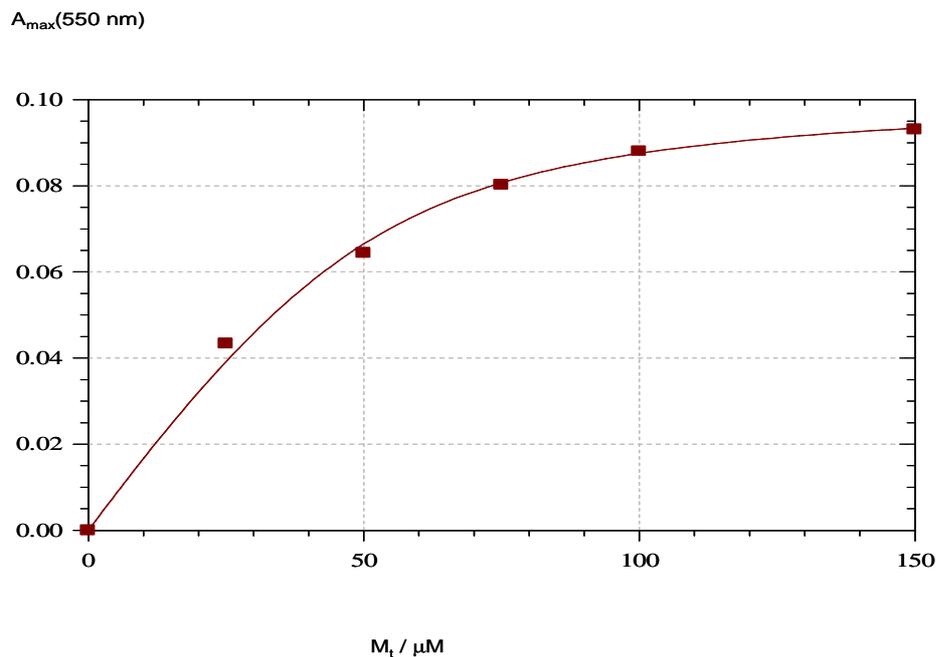
**Figure 8.** Tracé de A (550 nm) en fonction du temps après addition de  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  (1 equiv.) à une solution d'acide gallique (50 $\mu\text{M}$ ) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C). ● AG- $\text{Fe}^{\text{II}}$ , ▲AG- $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Le tracé de l'absorbance à 295 nm et 550 nm en fonction de la concentration totale de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $M_t$ ) est quantitativement analysé (**Figures 9 et 10, Tableau 4**) selon un modèle de complexation de stoechiométrie 1:1. Les valeurs de l'absorbance utilisées dans le calcul de la constante de complexation ( $K$ ) sont celles qui correspondent au palier atteint lorsque l'équilibre de complexation est établi. L'analyse à 295 nm prend en compte l'absorption de l'ion libre à cette longueur d'onde.

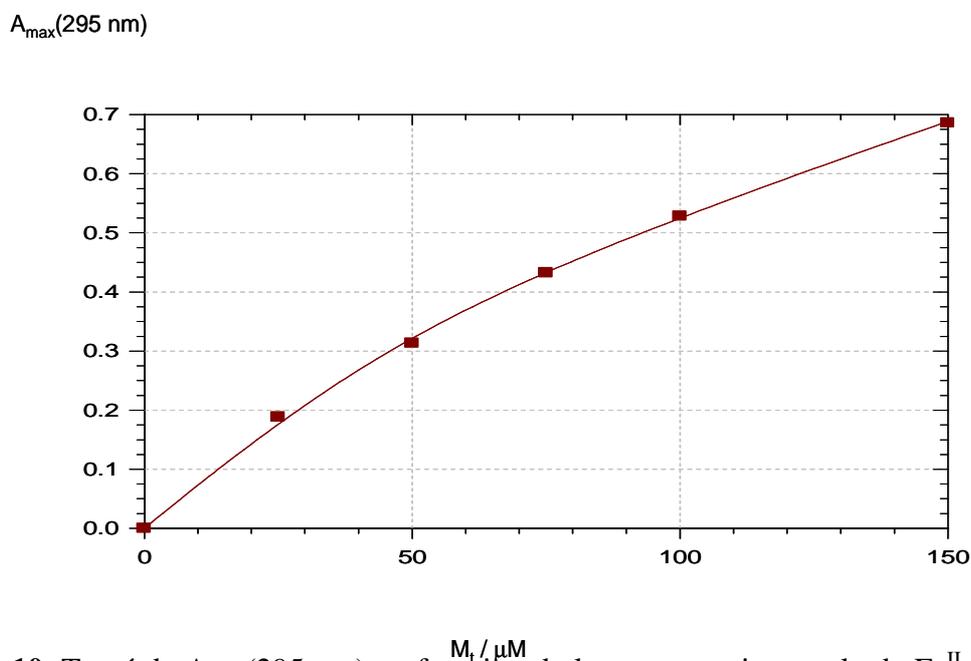
**Tableau 4.** Complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par l'acide gallique. Analyse à 295 nm et 550 nm après 2 min de réaction.

$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$K \times 10^{-3}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$\epsilon(\text{complexe})$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	r
295	112 ( $\pm 41$ )	8230 ( $\pm 270$ )	0,9996
550	110 ( $\pm 32$ )	2030 ( $\pm 80$ )	0,998

Les valeurs de  $K$  obtenues dans les deux analyses ( $K \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) sont en bon accord, ce qui est satisfaisant.



**Figure 9.** Tracé de  $A_{\text{max}}(550 \text{ nm})$  (ca. 2 min après addition de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , plateau stable) en fonction de la concentration totale de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . La courbe est le résultat de l'analyse quantitative pour la détermination de la constante de complexation.



**Figure 10.** Tracé de  $A_{\text{max}}(295 \text{ nm})$  en fonction de la concentration totale de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $M_t$ ). La courbe est le résultat de l'analyse quantitative pour la détermination de la constante de complexation.

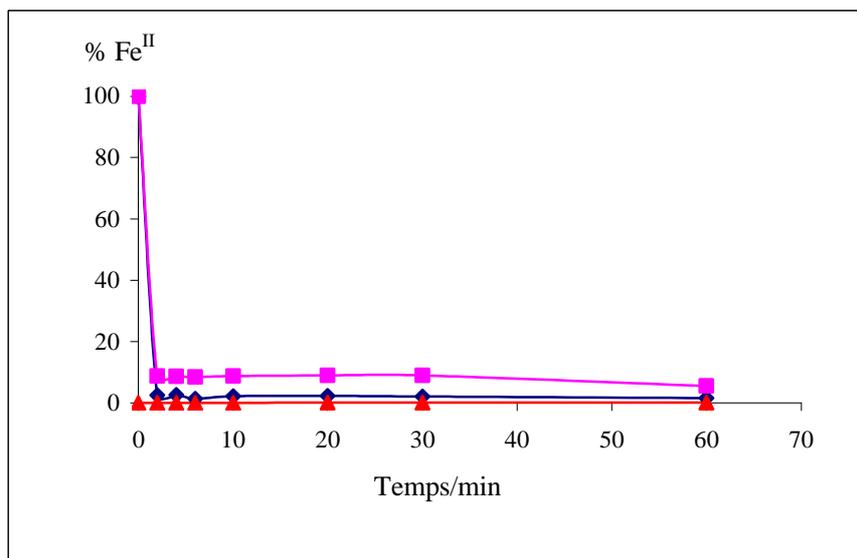
Dans l'analyse spectroscopique de la complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par l'acide gallique à 295 nm et 550 nm, l'autoxydation du complexe n'est pas discernable comme nous l'avions observée dans le cas des complexations quercétine- $\text{Fe}^{\text{II}}$  et rutine- $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Cependant, les dosages de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (méthode à la ferrozine) et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (méthode Fox2) mettent bien en évidence que l'autoxydation du complexe AG- $\text{Fe}^{\text{II}}$  en AG- $\text{Fe}^{\text{III}}$  est complète en moins de deux minutes (**Figure 11**) et s'accompagne de la formation de faibles concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,2-0,3 *equiv.*) (**Figure 12**).

En conséquence la complexation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par l'acide gallique suit le modèle suivant :

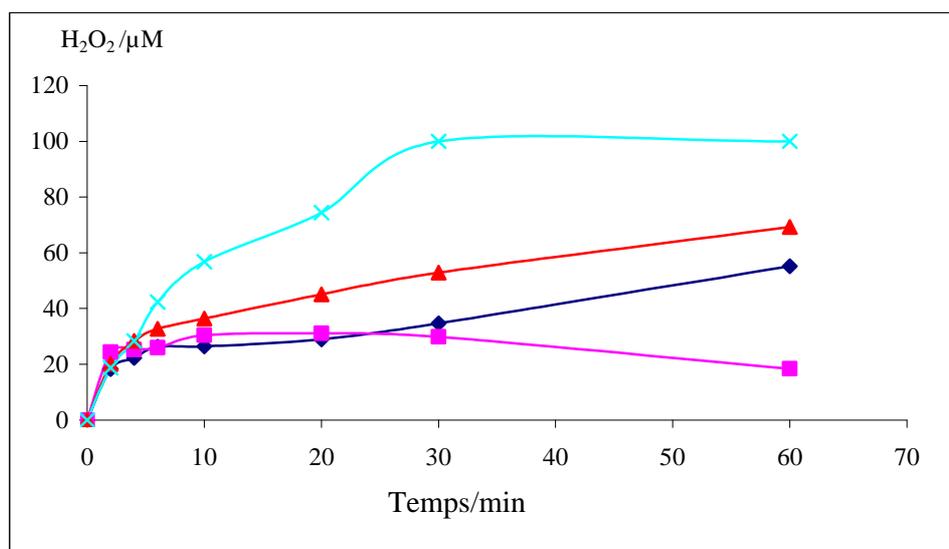


Ainsi, la complexation directe de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par l'acide gallique est cinétiquement bloquée par la liaison de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  aux ions phosphates mais peut intervenir indirectement par liaison de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et autoxydation rapide du complexe ainsi formé.

L'analyse cinétique quantitative à 550 nm (**Tableau 5**) permet de mettre en évidence un phénomène bimoléculaire attribuable à la complexation (constante de vitesse apparente  $k_1$ ) suivi d'une évolution du pseudo-1<sup>er</sup> ordre du complexe formé (constante de vitesse apparente  $k_2$ ) attribuable à l'autoxydation (avec coordination éventuelle d'ions phosphates).



**Figure 11.** Autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (100  $\mu\text{M}$ ) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) en présence et en absence d'acide gallique (1 *equiv.*) (37°C, pH 7,4).  $\blacktriangle$  AG- $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\blacklozenge$   $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\blacksquare$  AG- $\text{Fe}^{\text{II}}$ .



**Figure 12.** Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite sur une heure d'autoxydation de l'acide gallique (100 μM) en présence (1 équiv.) des ions du fer et du cuivre (pH 7,4, 37°C). ♦ AG-Fe<sup>III</sup>, ■ AG-Fe<sup>II</sup>, ▲ AG-Cu<sup>II</sup>, × AG-Cu<sup>I</sup>.

**Tableau 5.** Complexation Fe<sup>II</sup>-acide gallique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 550 nm sur 2 min. Concentration d'acide gallique = 50 μM.

ρ a)	10 <sup>-3</sup> k <sub>1</sub> / M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	10 <sup>3</sup> k <sub>2</sub> / s <sup>-1</sup>	ε <sub>1</sub> / M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	ε <sub>2</sub> / M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
0,5	15,2 (± 0,3)	30 (± 2)	1500 (± 10)	1730 (± 10)
1	10,0 (± 0,2)	-	1310 (± 10)	-
1,5	6,65 (± 0,05)	35,7 (± 0,8)	1420 (± 10)	1640 (± 10)
2	4,90 (± 0,04)	55 (± 1)	1500 (± 10)	1760 (± 10)
3	4,00 (± 0,06)	100 (± 2)	1430 (± 10)	1850 (± 10)

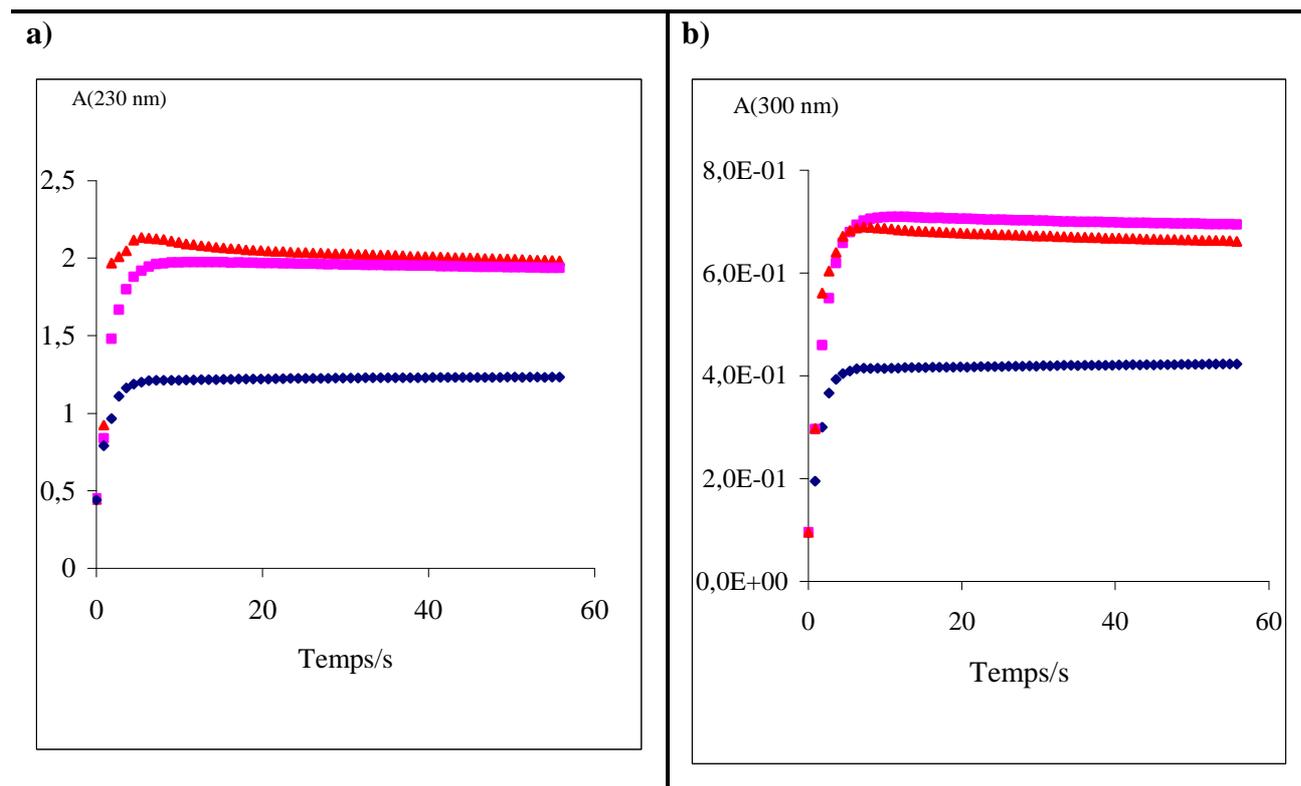
a) rapport molaire Fe<sup>II</sup>/AG

On note une décroissance de k<sub>1</sub> et une croissance de k<sub>2</sub> avec le rapport molaire Fe<sup>II</sup>/AG. En revanche, les coefficients d'absorption molaires des complexes AG-Fe<sup>II</sup> et AG-Fe<sup>III</sup> sont quasiment constants.

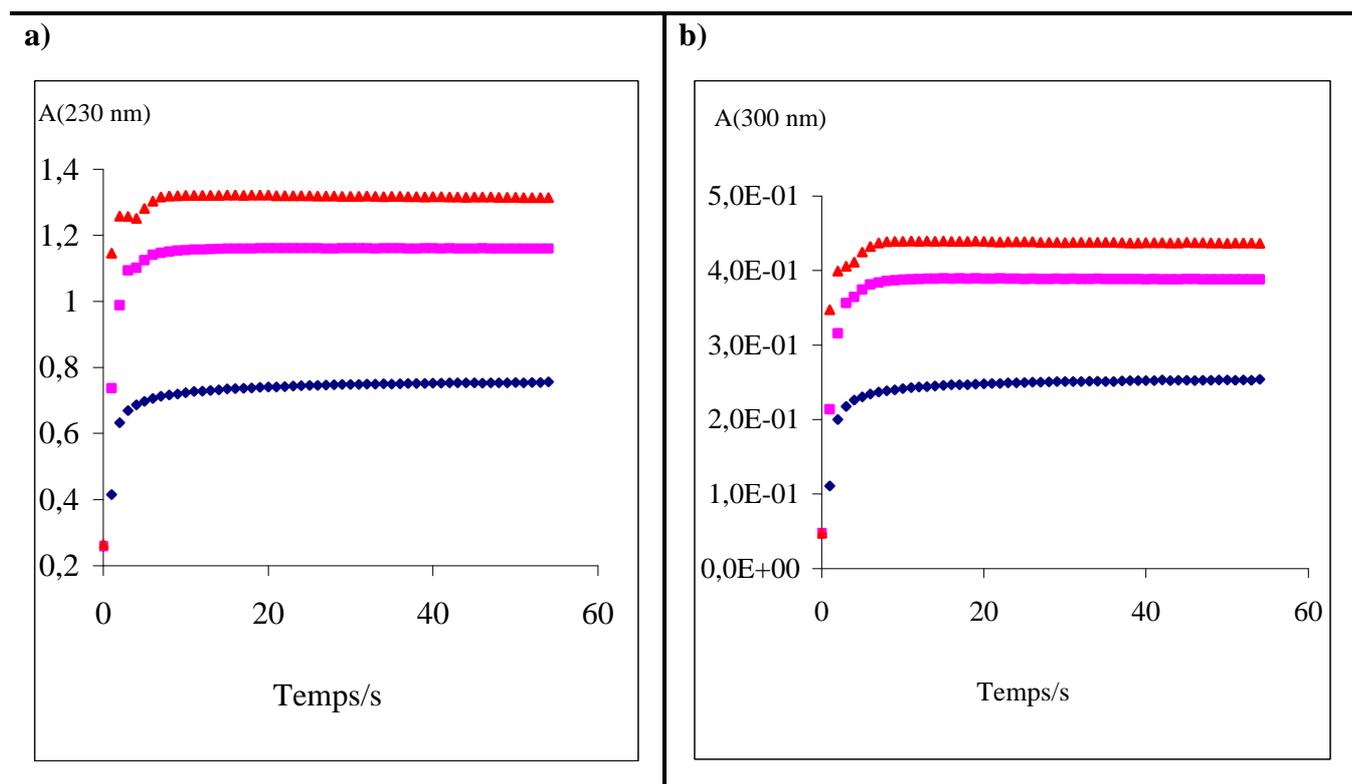
### b- Complexation de $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$

La complexation des ions du cuivre par l'acide gallique provoque la disparition de la bande d'absorption de l'acide gallique à 260 nm au profit d'une nouvelle bande à 300 nm caractéristique du complexe (**Figure 6**).

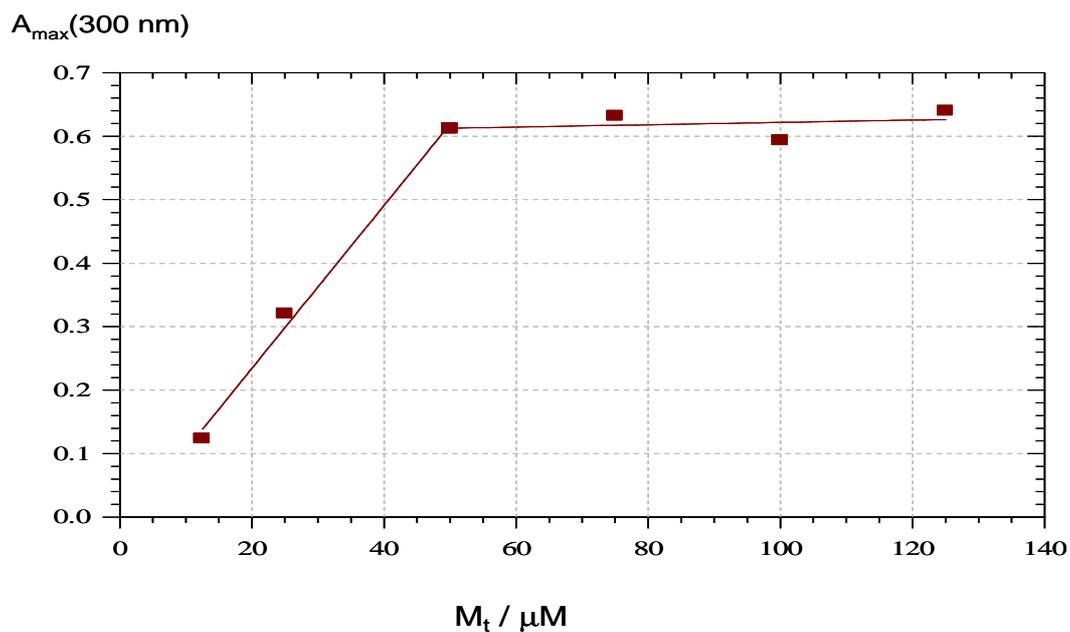
Les absorbances à 230 nm et 300 nm ont été tracées en fonction du temps (**Figures 13 et 14**) pour différentes concentrations de  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  (**Figures 15 et 16**).



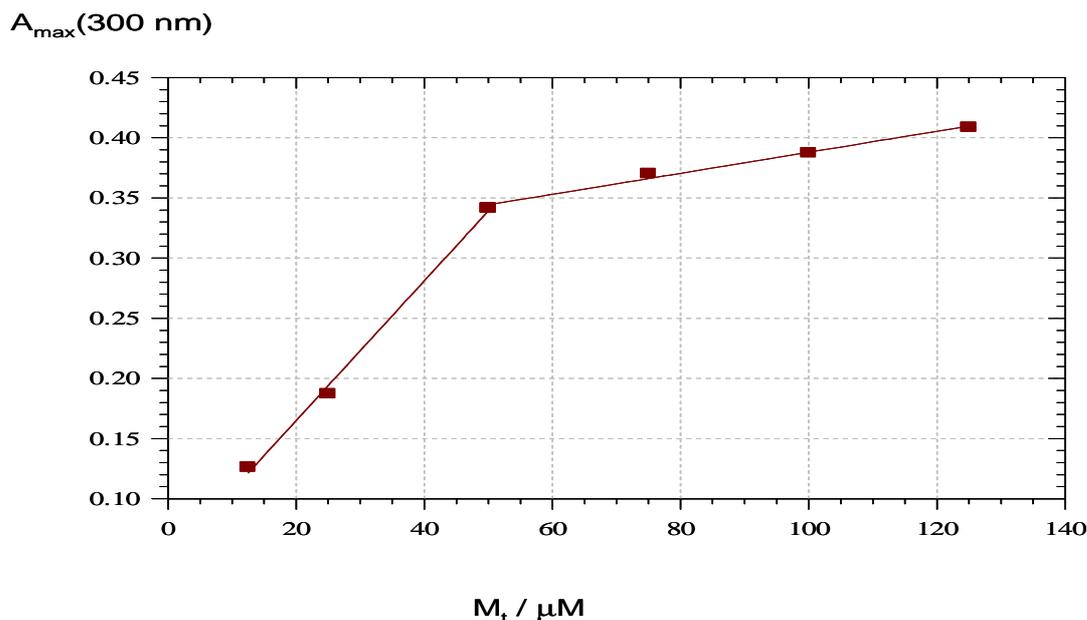
**Figure 13.** Tracés de A(230 nm) (a) et A(300 nm) (b) en fonction du temps après addition de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (0,5-2 équiv.) à une solution d'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C). •  $\rho = 0,5$ , ■  $\rho = 1$ , ▲  $\rho = 2$ .



**Figure 14.** Tracés de A(230 nm) (a) et A(300 nm) (b) en fonction du temps après addition de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (0,5-2 équiv.) à une solution d'acide gallique ( $50\mu\text{M}$ ) dans le tampon phosphate (pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ ). •  $\rho=0,5$ , ■  $\rho=1$ , ▲  $\rho=2$ .



**Figure 15.** Tracé de  $A_{\text{max}}(300 \text{ nm})$  en fonction de la concentration totale de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .



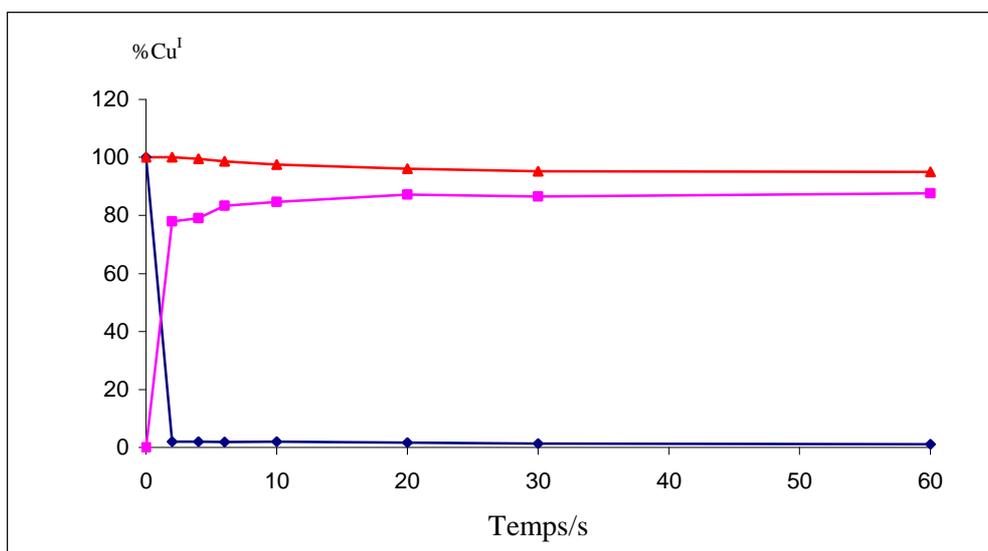
**Figure 16.** Tracé de  $A_{\text{max}}(300 \text{ nm})$  en fonction de la concentration totale de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Les tracés de l'absorbance maximale du complexe à 300 nm en fonction de la concentration totale de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (**Figures 15 et 16**) confirment que le complexe AG- $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  est formé de manière quasi-irréversible et que sa stœchiométrie est 1:1. En conséquence, la constante de complexation ne peut pas être précisément déterminée. Cependant, quelques remarques peuvent être formulées:

- La complexation des ions du cuivre par l'acide gallique est plus forte que la complexation des ions du fer;
- Pour tous les rapports molaires  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{AG}$  et pour  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{AG} < 1$ , les absorbances des complexes à 230 nm et 300 nm croissent rapidement vers un palier stable ;
- Pour les rapports molaires  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{AG} \geq 1$ , les absorbances à 230 nm et 300 nm croissent brusquement sur quelques secondes puis déclinent au bout d'une dizaine de secondes ;
- La réduction rapide de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en présence d'acide gallique (voir **fig. 17**. Le dosage de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  par la méthode à la bathocuproïne) suggère une oxydation rapide de l'acide gallique par  $\text{Cu}^{\text{II}}$  qui serait indissociable de la complexation. En raison de cette oxydation, les valeurs finales de  $A(300 \text{ nm})$  et  $A(230 \text{ nm})$  sont plus faibles avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$  qu'avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ;

- L'intensification de A(230 nm) après ajout des ions du cuivre à la solution d'acide gallique est beaucoup plus forte que celle due aux ions libres ( $\epsilon = 4110 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , soit  $\Delta A$  de l'ordre de 0,2 pour 1 equiv. d'ion du cuivre). Elle est donc essentiellement attribuable aux complexes voire à leurs produits d'oxydation ;
- Après ajout des ions du cuivre (1 equiv., 100  $\mu\text{M}$ ), il y a formation rapide de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40 ( $\pm$  3)  $\mu\text{M}$  au bout de 2-4 min, **fig. 11**).

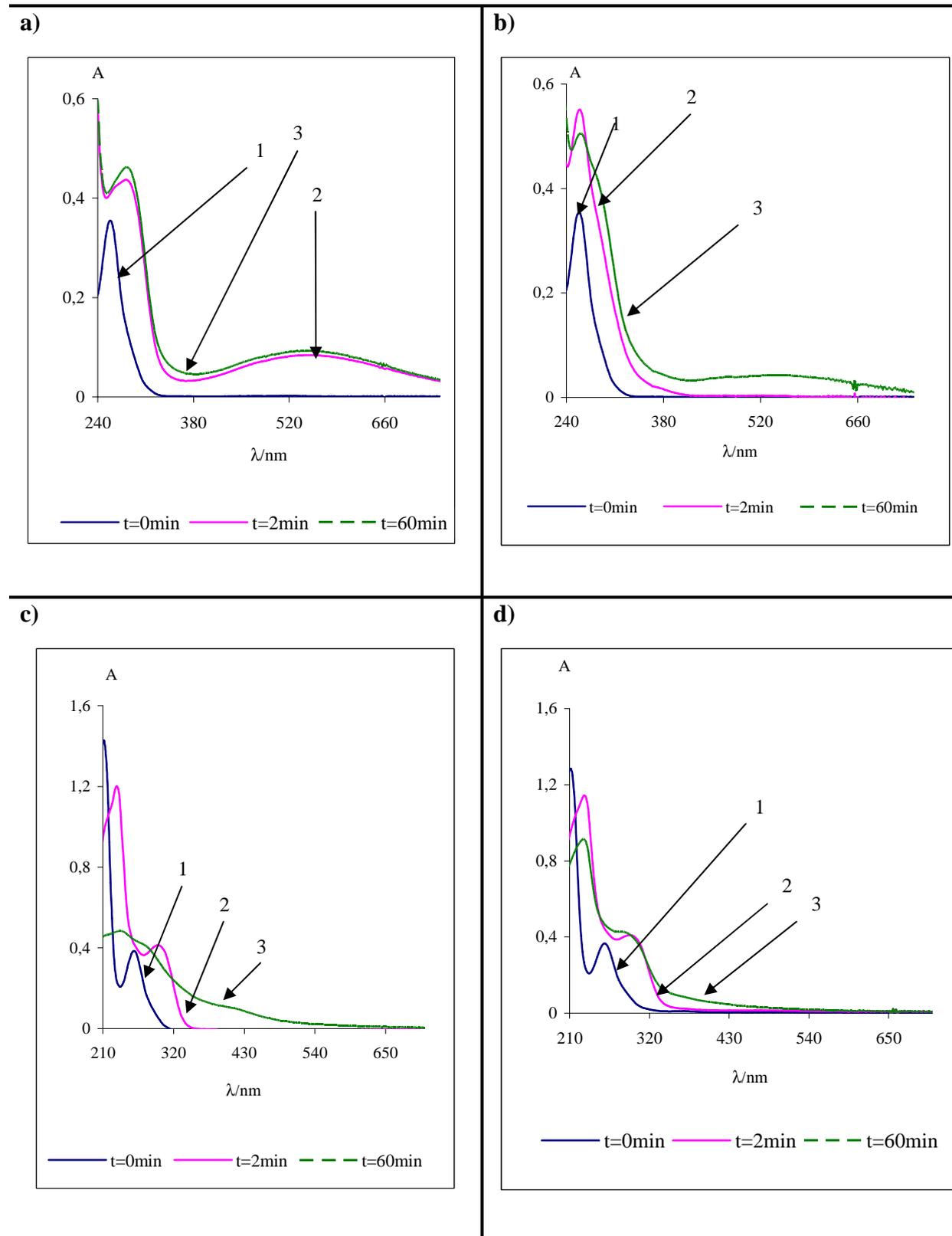
Ces résultats suggèrent que l'acide gallique complexe fortement les ions du cuivre et que les complexes s'oxydent rapidement. La 1<sup>e</sup> étape de ce processus doit être la réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  par l'acide gallique au sein du complexe AG- $\text{Cu}^{\text{II}}$  ou l'oxydation du AG- $\text{Cu}^{\text{I}}$  avec implication d'un 2<sup>e</sup> équivalent de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (probablement sous la forme d'un complexe  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-O}_2$ ).



**Figure 17.** Evolution de l'état redox des ions du cuivre (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) avec ou sans acide gallique (100  $\mu\text{M}$ ) (pH 7,4, 37°C). ▲ AG- $\text{Cu}^{\text{I}}$ , ■ AG- $\text{Cu}^{\text{II}}$ , ◆  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

### 2-5-2-2 Autoxydation de l'acide gallique initiée par les ions du fer et du cuivre

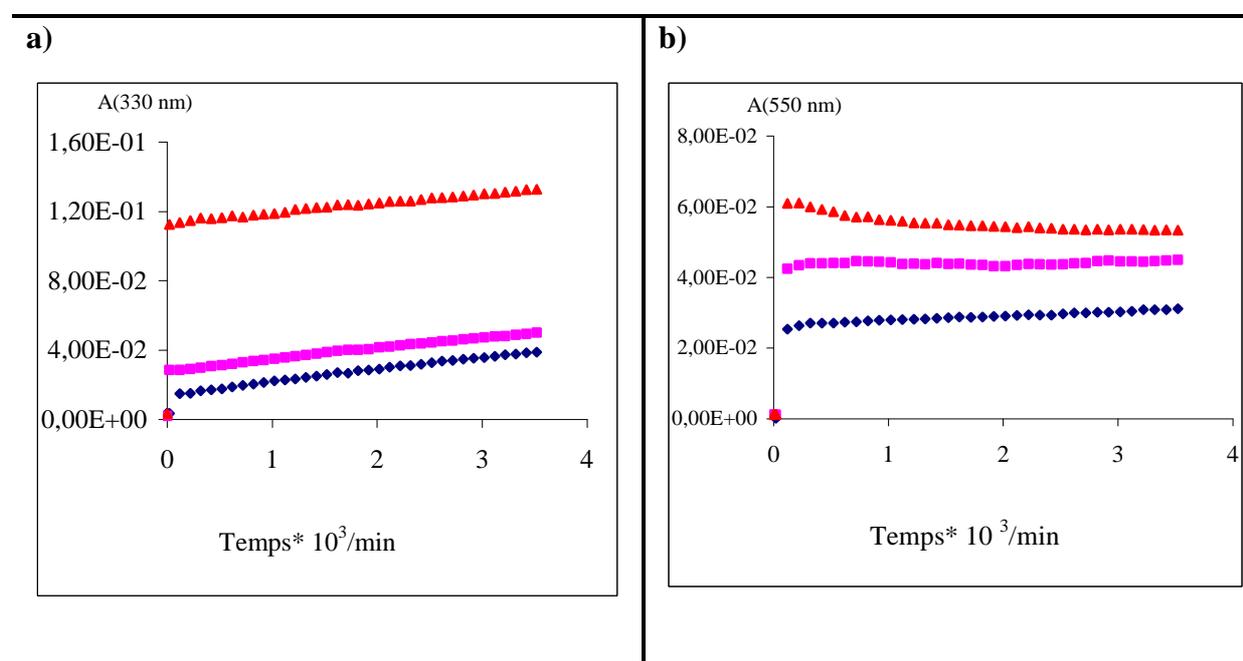
L'autoxydation de l'acide gallique en présence d'ion métallique ajouté est suivie sur une heure par spectroscopie UV-visible en mode cinétique. Les évolutions sont totalement différentes selon la nature de l'ion métallique (**Figure 18**). En particulier, l'effet de l'addition du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  à la solution d'acide gallique est beaucoup plus spectaculaire (**fig 18 c**).



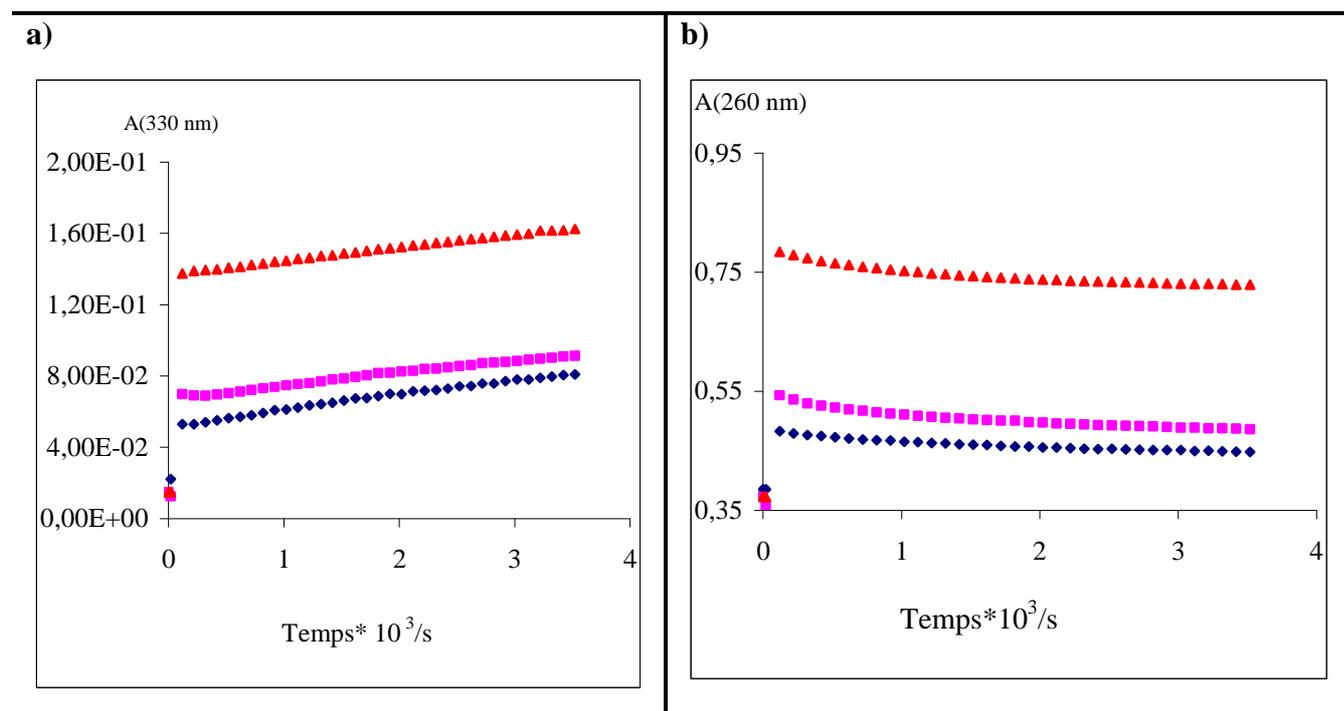
**Figure 18.** Autoxydation sur une heure de l'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) en présence d'ion métallique (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C ( 1= 0min, 2= 30 min, 3= 60min). **a)** en présence de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . **b)** en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . **c)** en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . **d)** en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

**a- Autoxydation de l'acide gallique en présence de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup>**

Les évolutions observées sont faibles et lentes. Par exemple, l'absorbance à 330 nm croît lentement après l'étape de complexation (**fig. 19a, fig. 20a**), ce qui pourrait traduire une faible accumulation de produits d'oxydation de type quinones. La différence entre les évolutions des complexes AG-Fe<sup>II</sup> et AG-Fe<sup>III</sup> n'est pas très significative en accord avec une autoxydation rapide de Fe<sup>II</sup> dans le milieu. De plus pour Fe<sup>II</sup>/AG ≤ 1, l'absorbance à 550 nm est stable alors qu'elle décline lentement en présence d'un excès de Fe<sup>II</sup> (**fig. 19b**), ce qui suggère l'implication du fer libre dans le processus d'autoxydation.



**Figure 19.** Suivi spectroscopique de l'autoxydation de l'acide gallique (50 µM) en présence de Fe<sup>II</sup>(0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. ♦ρ = 0,5, ■ρ = 1, ▲ρ = 2.



**Figure 20.** Suivi spectroscopique de l'autoxydation de l'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.  $\blacklozenge$   $\rho = 0,5$ ,  $\blacksquare$   $\rho = 1$ ,  $\blacktriangle$   $\rho = 2$ .

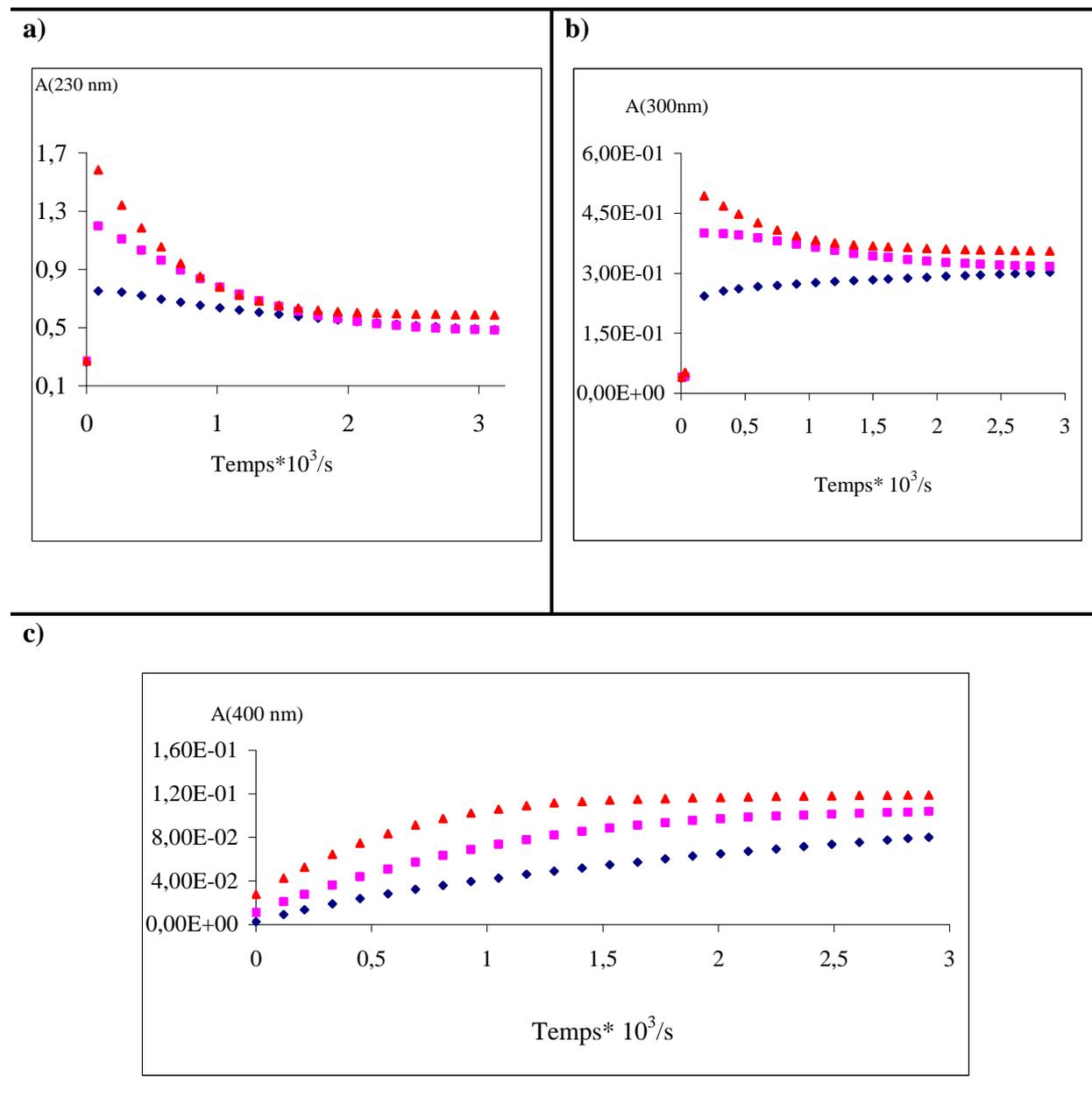
En présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , le déclin de  $A(260 \text{ nm})$  dure 15 min puis l'absorbance se stabilise (**fig. 20 b**). Ce phénomène traduit soit une oxydation, soit la formation lente d'un complexe en compétition avec les ions phosphates.

La teneur de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée sur 30 min d'autoxydation de l'acide gallique en présence d'un équivalent d'ion  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  (100  $\mu\text{M}$ ) est de 30  $\mu\text{M}$  environ (**fig. 12**).

En conclusion, l'interaction de l'acide gallique avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans le tampon phosphate neutre se traduit par la formation rapide d'un complexe, lequel s'oxyde rapidement à l'état  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Il s'ensuit un processus lent d'autoxydation avec production de faibles concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , la complexation est très lente (en raison de la compétition des ions phosphates) et indiscernable de l'oxydation.

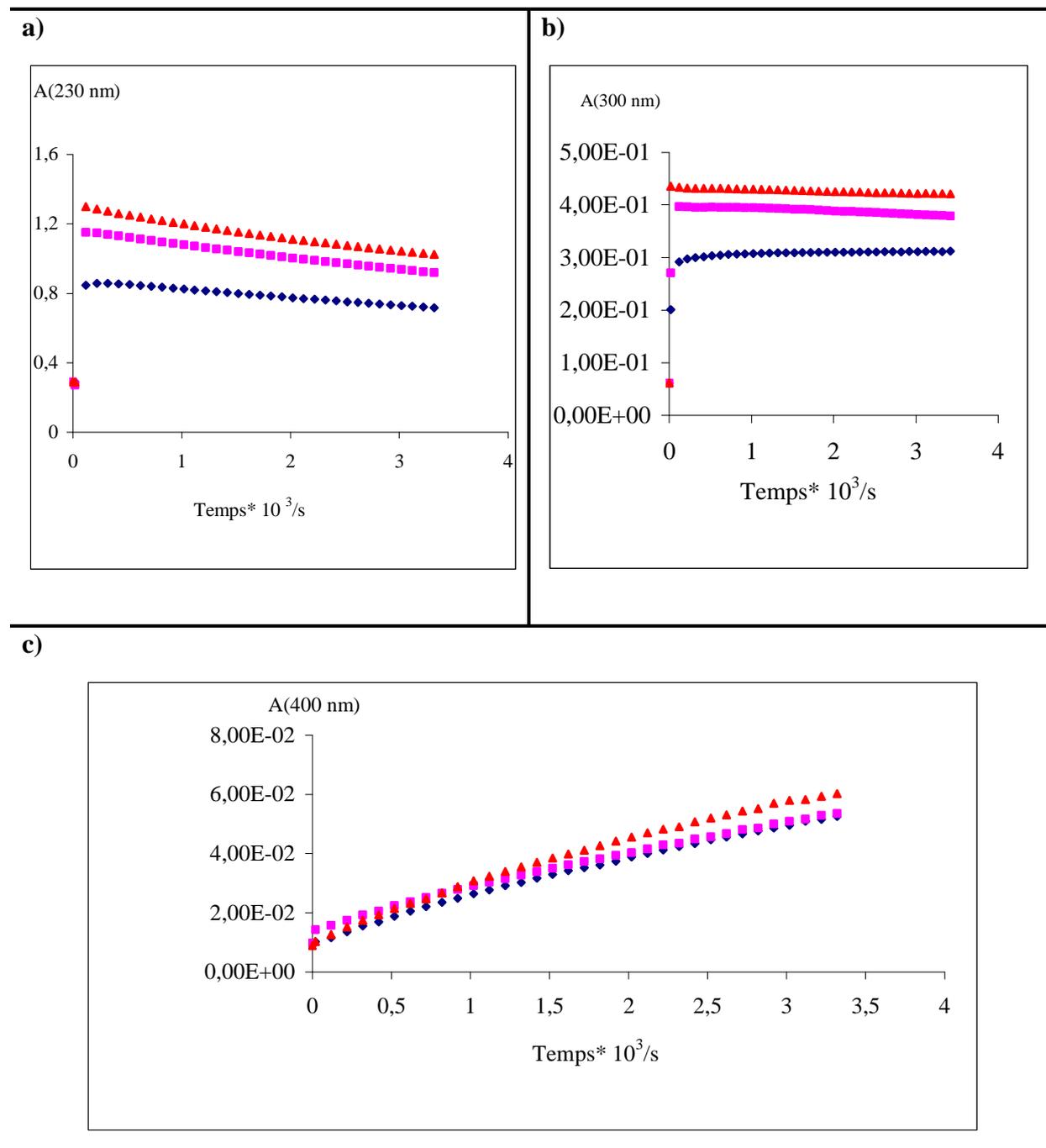
### b- Autoxydation de l'acide gallique en présence de $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$

L'addition d'ions  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  à la solution d'acide gallique produit des modifications spectrales plus importantes que lors de l'addition d'ions  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  (Figures 18 et 21). Sur une heure de réaction, on observe la formation des produits d'oxydation de l'acide gallique à 400 nm et la consommation simultanée du complexe AG- $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  à 230 nm et à 300 nm.



**Figure 21.** Suivi cinétique à 230 nm (fig. 21 a)), 300 nm (fig. 21 b)) et 400 nm (fig. 21c)) de l'autoxydation de l'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. ♦  $\rho = 0,5$ , ■  $\rho = 1$ , ▲  $\rho = 2$ .

Le suivi cinétique sur une heure à 230 nm, 300 nm et 400 nm permet de distinguer au moins trois phases pour l'autoxydation de AG en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ( $\rho \geq 1$ ) (**Figure 21**) contre seulement deux en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (**figure 22**). La première phase est rapide et correspond à la complexation de l'acide gallique par les ions du cuivre. Elle est complète au bout de quelques secondes et non quantifiable par spectroscopie conventionnelle.



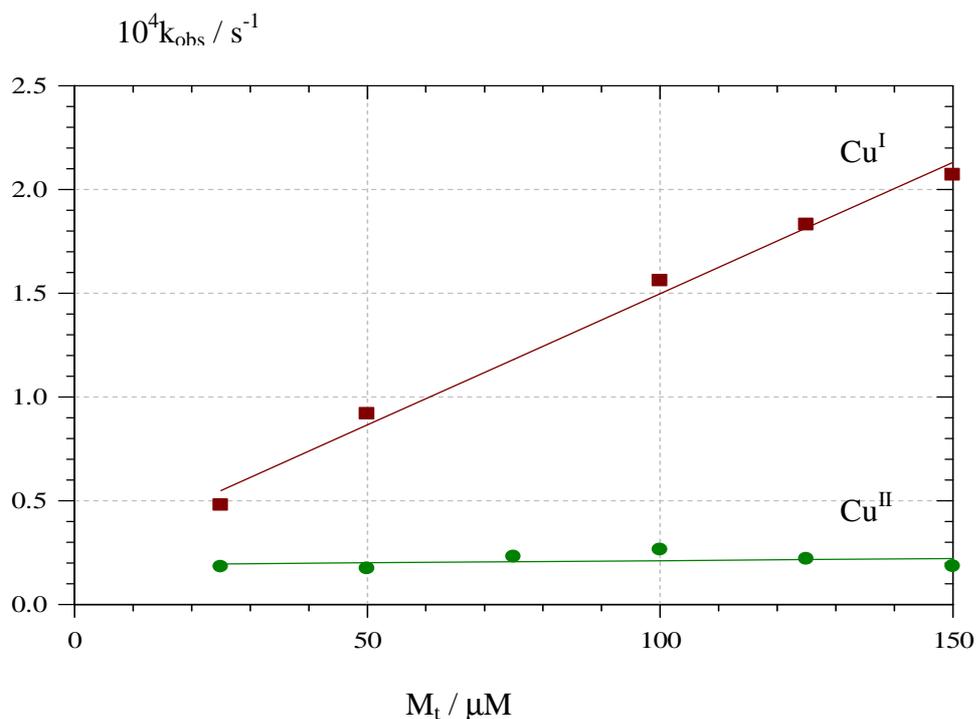
**Figure 22.** Suivi cinétique à 230 nm, 300 nm et 400 nm de l'autoxydation de l'acide gallique (50  $\mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. . ♦  $\rho = 0,5$ , ■  $\rho = 1$ , ▲  $\rho = 2$ .

Au bout d'une heure, l'absorbance à 400 nm est deux fois plus forte en présence de Cu<sup>I</sup> (**fig. 21c**) qu'en présence de Cu<sup>II</sup> (**fig. 22 c**), ce qui suggère que l'autoxydation de l'acide gallique en présence de Cu<sup>I</sup> est plus rapide. L'absorbance à 400 nm est attribuable à des chromophores de type *o*-quinone ou *p*-méthylènequinone dérivés de l'acide gallique ou, plus vraisemblablement, de ses oligomères.

Le suivi spectroscopique à 400 nm permet de déterminer les constantes apparentes d'autoxydation de l'acide gallique en présence de Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup> (**Tableau 6**).

**Tableau 6.** Autoxydation de l'acide gallique induite par Cu<sup>I/II</sup> (tampon phosphate/MeOH (95/5) à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 h. Concentration d'acide gallique = 50 µM. Traitement monoexponentiel.

$\rho$	DO	$10^5 k / s^{-1}$	$A_{\text{final}}$
0,5	I	47,8 ( $\pm 0,6$ )	0,105
0,5	II	18,1 ( $\pm 0,3$ )	0,101
1	I	91,8 ( $\pm 0,7$ )	0,111
1	II	17,3 ( $\pm 0,3$ )	0,107
1,5	II	23,0 ( $\pm 0,3$ )	0,096
2	I	156 ( $\pm 1$ )	0,121
2	II	26,4 ( $\pm 0,2$ )	0,097
2,5	I	183 ( $\pm 1$ )	0,121
2,5	II	21,9 ( $\pm 0,1$ )	0,114
3	I	207 ( $\pm 2$ )	0,140
3	II	18,3 ( $\pm 0,2$ )	0,119



**Figure 23.** Tracé de la constante apparente d'autoxydation de l'acide gallique (suivi cinétique à 400 nm sur 1h) en fonction de la concentration totale d'ion métallique (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C).

Les résultats du **tableau 6** et de la **figure 23** montrent que la constante apparente d'autoxydation de l'acide gallique en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  croît linéairement avec la concentration totale du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  alors que, dans le cas du  $\text{AG-Cu}^{\text{II}}$ , elle est approximativement constante. Ce phénomène a été également observé dans le cas d'autoxydation de l'acide caféique en présence des ions du cuivre.

La concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formée après 30 min d'autoxydation de l'acide gallique est d'environ un équivalent avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  et 0,5 équivalent avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (**Figure 9**). Par ailleurs,  $\text{Cu}^{\text{I}}$  apparaît comme le degré d'oxydation stable tout au long de l'autoxydation de l'acide gallique (**Figure 17**). Nous proposons donc les phénomènes suivants (AG : acide gallique, AGQ : *o*-quinone dérivée de l'acide gallique):

#### Autoxydation après ajout de $\text{Cu}^{\text{I}}$

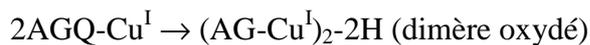
Complexation rapide et quasi-irréversible :  $\text{AG} + \text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{AG-Cu}^{\text{I}}$

Oxydation du ligand avec production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $\text{AG-Cu}^{\text{I}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{AGQ-Cu}^{\text{I}} + \text{H}_2\text{O}_2$

et/ou  $\text{AG-Cu}^{\text{I}} + \text{Cu}^{\text{I}}-\text{O}_2 \rightarrow \text{AGQ-Cu}^{\text{I}} + \text{Cu}^{\text{I}} + \text{H}_2\text{O}_2$

Dimérisation (avec maintien de Cu au DO I)

$\text{AGQ-Cu}^{\text{I}} + \text{AG-Cu}^{\text{I}} \rightarrow (\text{AG-Cu}^{\text{I}})_2$  (dimère)



La dimérisation doit être rapide sinon il y aura accumulation de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  libre (AGQ est vraisemblablement un ligand faible) et autoxydation rapide en  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , ce qui n'est pas conforme à l'expérience.

#### Autoxydation après ajout de $\text{Cu}^{\text{II}}$

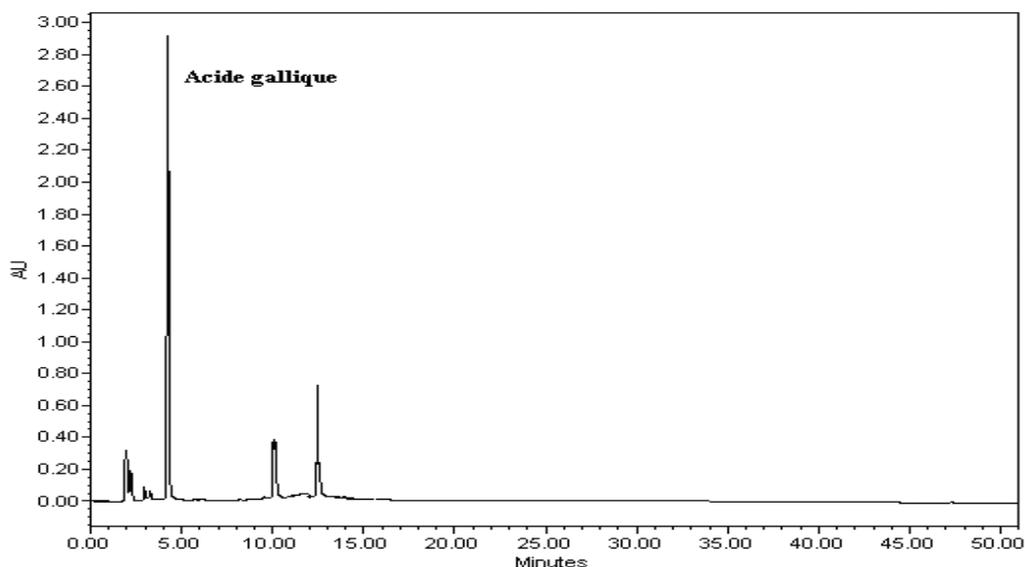
Complexation rapide et quasi-irréversible :  $\text{AG} + \text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{AG-Cu}^{\text{II}}$

Dismutation et/ou dimérisation:  $2\text{AG-Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{AGQ-Cu}^{\text{I}} + \text{AG-Cu}^{\text{I}}$  et/ou  $(\text{AG-Cu}^{\text{I}})_2$

Mais aussi  $\text{AG-Cu}^{\text{II}} + \text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{AGQ-Cu}^{\text{I}} + \text{Cu}^{\text{I}}$

Puis production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par autoxydation rapide de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

En parallèle avec l'étude cinétique par spectroscopie UV-visible, nous avons pu identifier certains produits d'oxydation du  $\text{AG-Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  par CLHP couplée à la spectrométrie de masse (**Figure 24**).



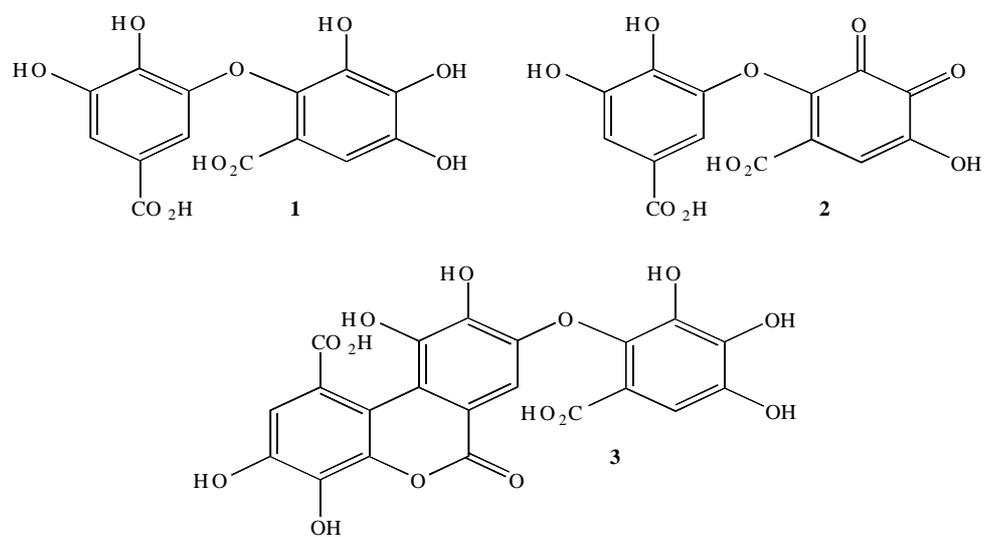
**Figure 24.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de l'acide gallique ( $10^{-2}$  M) après 7h d'autoxydation en présence de 2 équiv. de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.

Trois pics de différents temps de rétention ont été identifiés (**Tableau 7**). Les structures des différents composés sont proposées à partir de leurs spectres UV et de leurs spectres de masse.

**Tableau 7.** Analyse HPLC-MS des produits d'oxydation de l'acide gallique (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C) formés après 7h d'autoxydation.

$t_R$ / min	$m/z$	$\lambda_{max}$ / nm	Structure proposée
4,80	169 ; 232	228 ; 272	AG, $GCu^I$
10,42	487	250 ; 296	<b>3</b> = (AG) <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O
	550		<b>3</b> -2H+ $Cu^I$
	335 ; 167		<b>2</b> = (AG) <sub>2</sub> -2H, G
12,78	337 ; 401	247 ; 291	<b>1</b> = (AG) <sub>2</sub> , <b>1</b> -2H+ $Cu^I$
	(249 ; 169)		Fragments: <b>1</b> - 2CO <sub>2</sub> , GH <sub>2</sub>

Ainsi, l'analyse HPLC-MS indique que l'autoxydation de l'acide gallique en présence de  $Cu^{II}$  conduit à des oligomères (dimères, trimères) capables d'évoluer par déshydratation ou réoxydation. Le dimère **1** semble identique à celui détecté lors de l'autoxydation sans ion métallique ajouté (**Figure 4, Tableau 2**). Le trimère **3** présente vraisemblablement une liaison de type C-C (biaryl) qui permet la déshydratation par formation d'une lactone. Enfin, plutôt qu'un fragment de **3**, le dimère **2**, de même temps de rétention, pourrait provenir de l'oxydation de **1**.



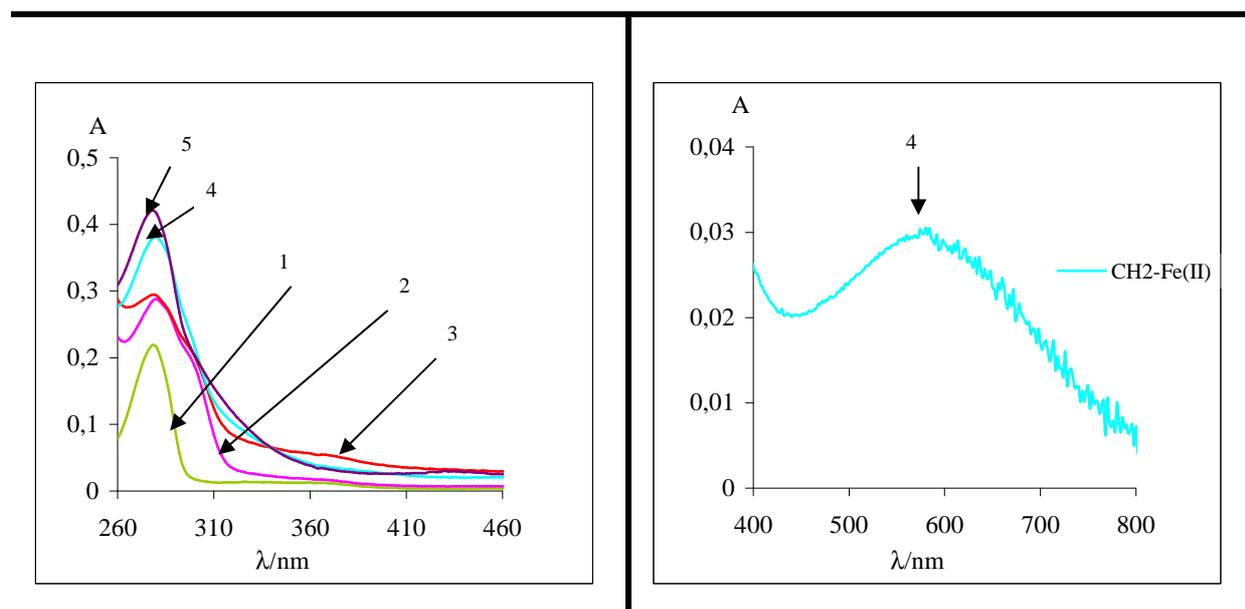
**Schéma 3.** Structures proposées pour les produits d'autoxydation de l'acide gallique en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

### 2-5-3 Interaction de la catéchine avec les ions du fer et du cuivre: complexation et autoxydation

#### 2-5-3-1 Complexation

La capacité de complexation du groupement catéchol de la catéchine par les ions du fer et du cuivre dans le tampon phosphate neutre a été examinée par spectroscopie UV-visible (**Figure 25**).

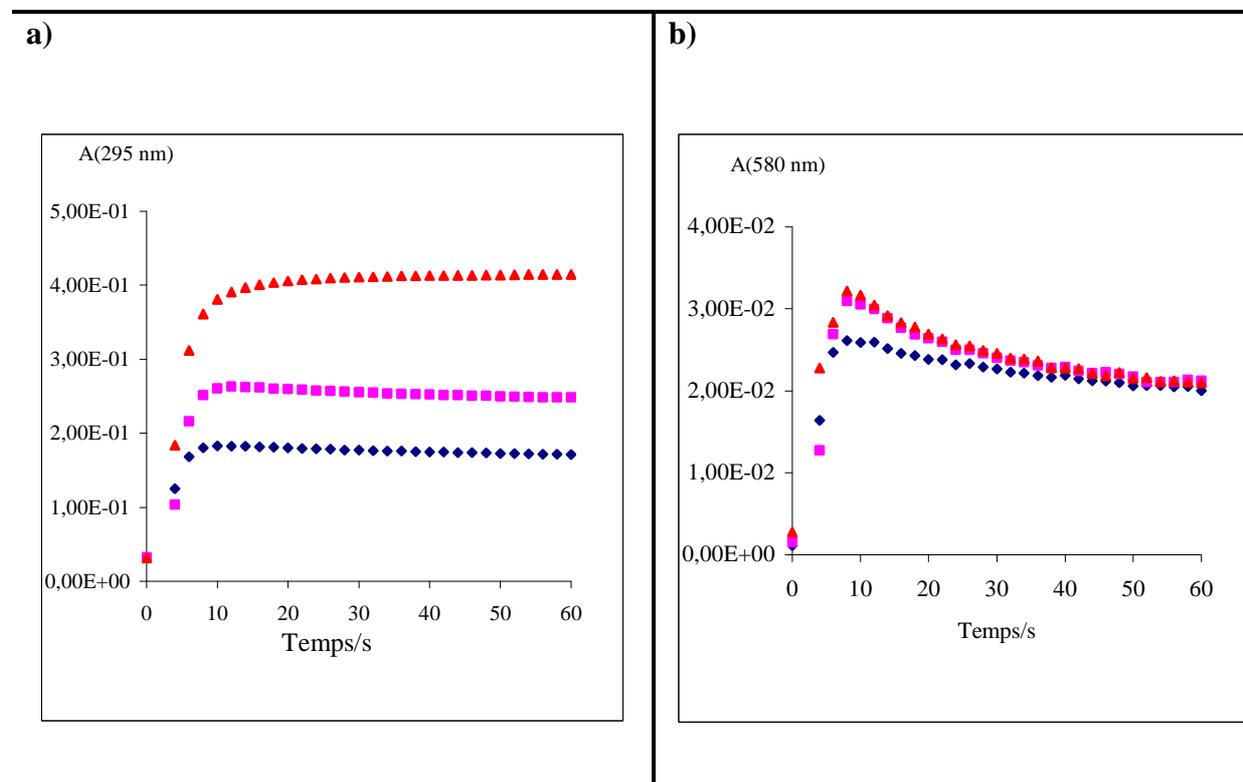
D'une manière générale, les changements spectraux intervenant après addition d'une concentration équimolaire d'ion métallique à une solution de catéchine sont faibles. On constate un élargissement de la bande d'absorption à 280 nm et une croissance faible de l'absorbance dans l'intervalle 400-440 nm qui peut s'expliquer par la formation de petites concentrations de produits d'oxydation. Après ajout de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , une bande d'absorption peu intense et très large est détectée vers 580 nm qui atteste de la complexation. Cette bande n'est pas détectée après addition de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .



**Figure 25.** Changements spectraux observés une minute après addition d'un équivalent d'ion métallique à une solution de catéchine (50  $\mu\text{M}$ ) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) à 37°C et pH 7,4. **1** = CH<sub>2</sub>, **2** = CH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup>, **3**=CH<sub>2</sub>-Cu<sup>II</sup>, **4** =CH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>, **5**= CH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>.

### a- Complexation de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> par la catéchine

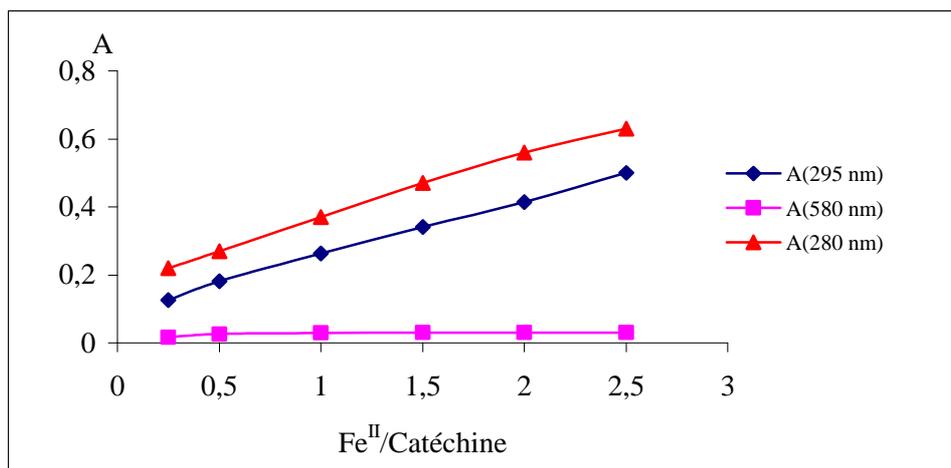
La complexation de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> par la catéchine dans le tampon phosphate est suivie par spectroscopie UV-visible en mode cinétique (**Figure 26**).



**Figure 26.** Suivi spectroscopique de la complexation de la catéchine (50 μM) par Fe<sup>II</sup> (0,5-2 équiv.) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C). ♦ρ = 0,5, ■ρ = 1, ▲ρ = 2.

Les variations de A(295 nm) et A(580 nm) en fonction du temps révèlent deux étapes successives:

- Une étape rapide (complète au bout de 10 s) qui se traduit par la croissance de A(295 nm) et A(580 nm).
- Une étape lente au cours de laquelle A(580 nm) décline. Le déclin de A(295 nm) est faible et indétectable avec un rapport molaire Fe<sup>II</sup>/catéchine ≥ 1.



**Figure 27.** Tracés de A(280 nm), A(295 nm) et A(580 nm) en fonction du rapport molaire Fe<sup>II</sup>/catéchine. Concentration de catéchine = 50  $\mu$ M (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).

Les tracés de A(280 nm) et A(295 nm) en fonction de la concentration totale de Fe<sup>II</sup> sont linéaires. Les coefficients d'absorption molaires correspondants sont évalués à 3410 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 280 nm ( $r = 0,9997$ ) et à 3030 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ( $r = 0,996$ ) à 295 nm, valeurs très proches de celles de l'ion libre. Ainsi, s'il y a complexation, les changements spectraux sont trop faibles pour être distingués de ceux liés à la présence de Fe<sup>II</sup> libre. À ces longueurs d'onde, on ne peut donc pas confirmer la complexation.

En revanche, l'absorption à 580 nm est spécifique au complexe. Le tracé de A(580 nm) en fonction de la concentration de Fe<sup>II</sup> montre une saturation à un équivalent d'ion métallique en accord avec une complexation quasi-irréversible et de stœchiométrie 1:1.

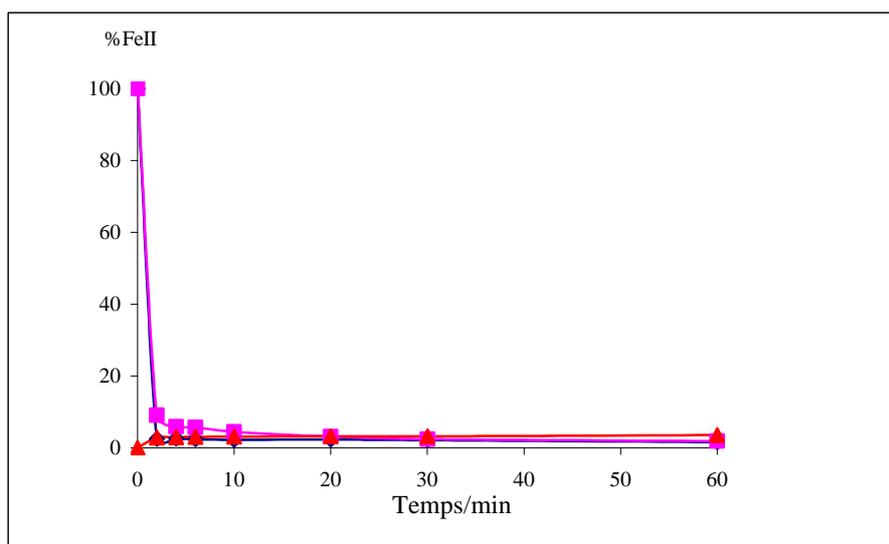
Le déclin de A(580 nm) en fonction du temps est un phénomène du 1<sup>er</sup> ordre apparent. Les valeurs de la constante de vitesse correspondante  $k_{obs}$  sont rapportées dans le **tableau 8**.

**Tableau 8.** Analyse cinétique du déclin de A(580 nm) sur 1 min (2<sup>e</sup> phase après complexation rapide) du complexe Fe<sup>II</sup>-catéchine (tampon phosphate 0,01/MeOH 95/5 à pH 7,4, 37°C). Concentration de catéchine = 50 µM.  $\rho$  = □ rapport molaire Fe<sup>II</sup>/catéchine.

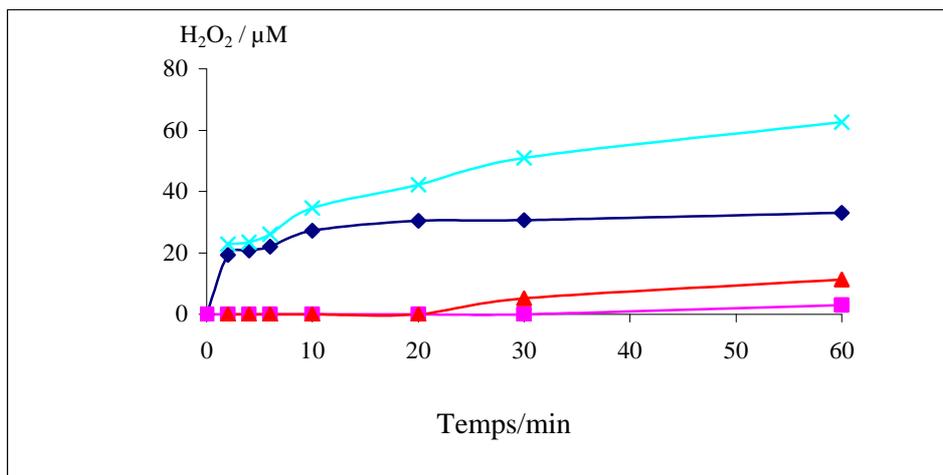
$\rho$	$10^3 k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$A_{\text{max}}, A_{\text{f}}$
0,5	32 ( $\pm$ 1)	0,0263, 0,0188
1	51 ( $\pm$ 2)	0,0313, 0,0204
1,5	50 ( $\pm$ 3)	0,0287, 0,0167
2	45 ( $\pm$ 1)	0,0321, 0,0199
2.5	43 ( $\pm$ 1)	0,0291, 0,0181

L'évolution de pseudo 1<sup>er</sup> ordre du complexe pourrait traduire l'autoxydation de Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup>. Le temps demi-vie de Fe<sup>II</sup> dans le complexe ( $\ln 2/k_{\text{obs}}$ ) est d'environ 14-17 s. Ces résultats sont en accord avec le dosage de Fe<sup>II</sup> par la méthode à la ferrozine (**Figure 28**) qui montre que la formation de Fe<sup>III</sup> est complète en moins de 2 min. Cependant, la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ces conditions reste très faible (< 0,1 équiv.) (**Figure 29**).

Quant à la complexation de Fe<sup>III</sup> par la catéchine, elle ne peut être clairement mise en évidence. Elle est vraisemblablement très lente en raison de la compétition des ions phosphates.



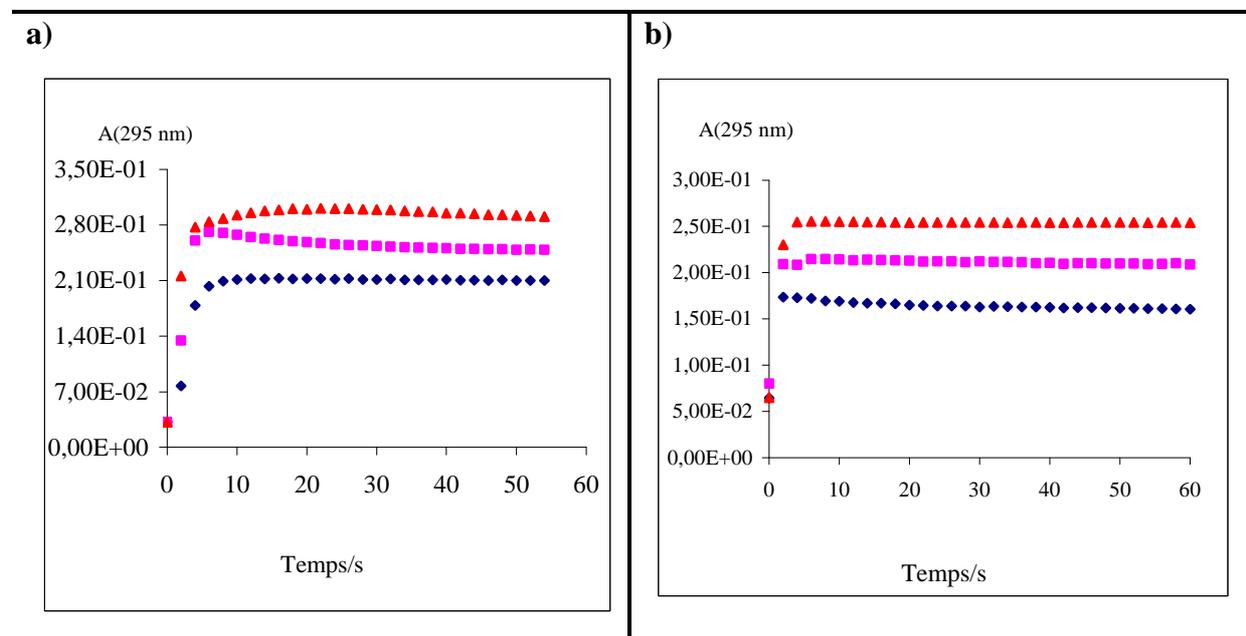
**Figure 28.** Evolution du degré d'oxydation des ions du fer (1 equiv.) en absence et en présence de catéchine (100 µM) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C. ◆ Fe<sup>II</sup>, ■ Fe<sup>II</sup>-CH<sub>2</sub>, ▲ Fe<sup>III</sup>-CH<sub>2</sub>.



**Figure 29.** Dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé durant une heure d'autoxydation de la catéchine (100 μM) en présence d' 1 équiv. d'ion métallique dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C. ♦CH<sub>2</sub>- Cu<sup>II</sup>, ■ CH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>, ▲ CH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>-CH<sub>2</sub>. ×CH<sub>2</sub>- Cu<sup>I</sup>.

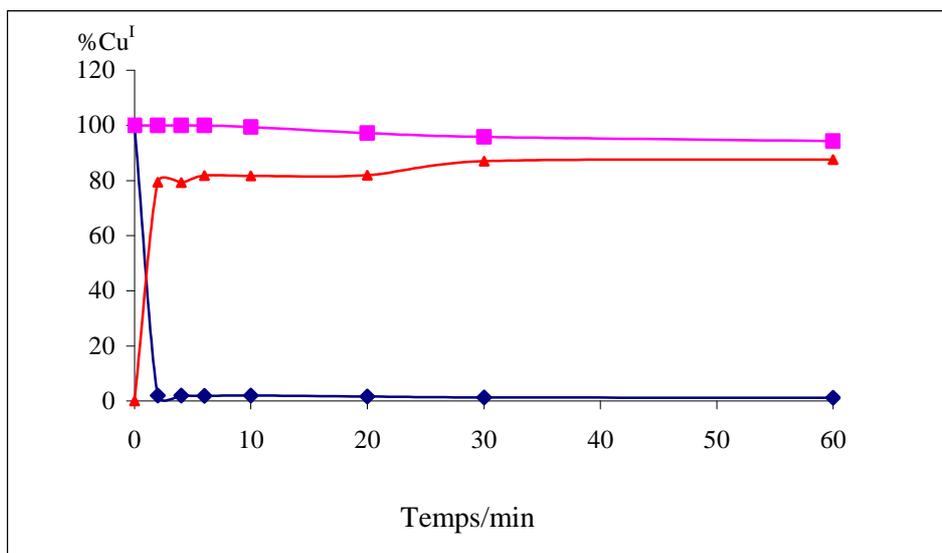
### b- Complexation de Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup> par la catéchine

La complexation de Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup> par la catéchine est suivie par spectroscopie UV-visible en mode cinétique.



**Figure 30.** Tracé de A(295 nm) en fonction du temps après addition de 0,5-2 équiv. de Cu<sup>I</sup> (a) ou de Cu<sup>II</sup> (b) à une solution de catéchine (50 μM) (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). ♦ρ = 0,5, ■ ρ = 1, ▲ ρ = 2.

Le suivi de  $A(295 \text{ nm})$  en fonction du temps (**Figure 30**) montre que la complexation des ions du cuivre par la catéchine est très rapide (complète au bout de 6s environ). Après l'étape rapide de complexation, un faible déclin de  $A(295 \text{ nm})$  est observé avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (rapport molaire  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{catéchine} \geq 1$ ) qui est indétectable avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Ce déclin peut traduire l'amorce d'un processus d'autoxydation. La formation apparente d'un complexe catéchine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  stable (**Figure 30, partie b**) n'est pas compatible avec le dosage de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  qui met en évidence la réduction rapide de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans le complexe (**Figure 31**). Ainsi, un transfert d'électron de la catéchine vers  $\text{Cu}^{\text{II}}$  au sein du complexe semble intervenir rapidement.



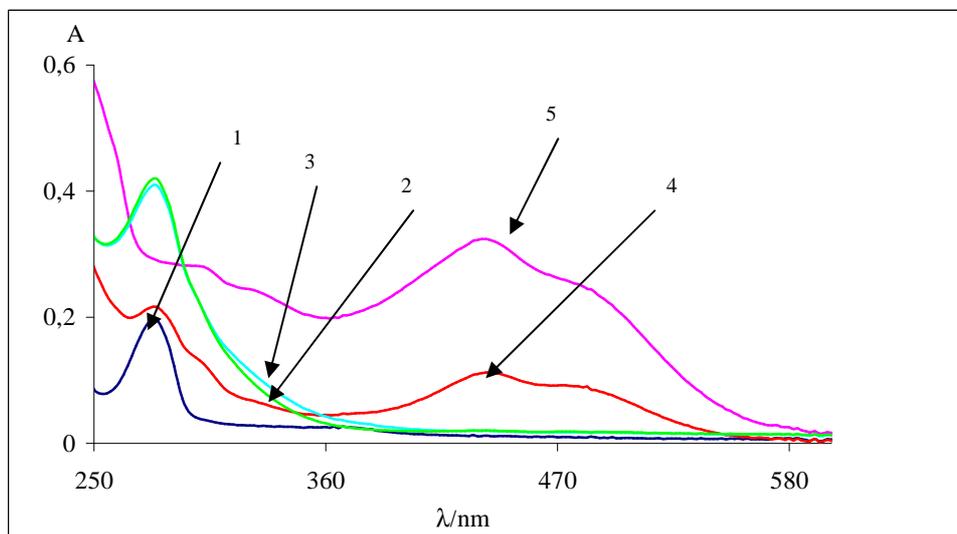
**Figure 31.** Evolution du degré d'oxydation des ions du cuivre (1 équiv.) avec ou sans catéchine (100  $\mu\text{M}$ ) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.  
 ◆  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , ■  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-CH}_2$ , ▲  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-CH}_2$ .

La teneur de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée durant les 4-6 premières minutes de réaction de la catéchine avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (1 équiv., 100  $\mu\text{M}$ ) est  $24 (\pm 1) \mu\text{M}$  (**Figure 29**). Il y a donc bien réduction de  $\text{O}_2$  avec oxydation probable du ligand catéchine dès la formation des complexes.

### 2-5-3-2 Autoxydation de la catéchine initiée par $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ et $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$

Dans le tampon phosphate, l'autoxydation de la catéchine en présence des ions du cuivre est beaucoup plus spectaculaire qu'en présence des ions fer (**Figure 32**).

Au bout d'une heure d'autoxydation en présence des ions du cuivre, on constate l'apparition d'une bande large dans le domaine 350-600 nm. La longueur d'onde d'absorption maximale des produits d'oxydation colorés de la catéchine est d'environ 440 nm.



**Figure 32.** Autoxydation de la catéchine (50  $\mu\text{M}$ ) en présence d'ion métallique (1 *equiv.*) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. **1**= CH<sub>2</sub>, **2** = CH<sub>2</sub>-Fe<sup>III</sup>, **3** = CH<sub>2</sub>-Fe<sup>II</sup>, **4**= CH<sub>2</sub>-Cu<sup>II</sup>, **5** = CH<sub>2</sub>-Cu<sup>I</sup>.

#### a- En présence de Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup>

La formation des produits d'oxydation absorbant à 440 nm est presque négligeable. Le suivi cinétique de A(440 nm) permet de déterminer la valeur de la vitesse d'autoxydation (**Tableau 9**).

**Tableau 9.** Autoxydation de la catéchine (50  $\mu\text{M}$ ) dans le tampon phosphate à pH 7,4, 37°C. Analyse cinétique de la croissance de A(440 nm) entre 2000 et 3000 s.

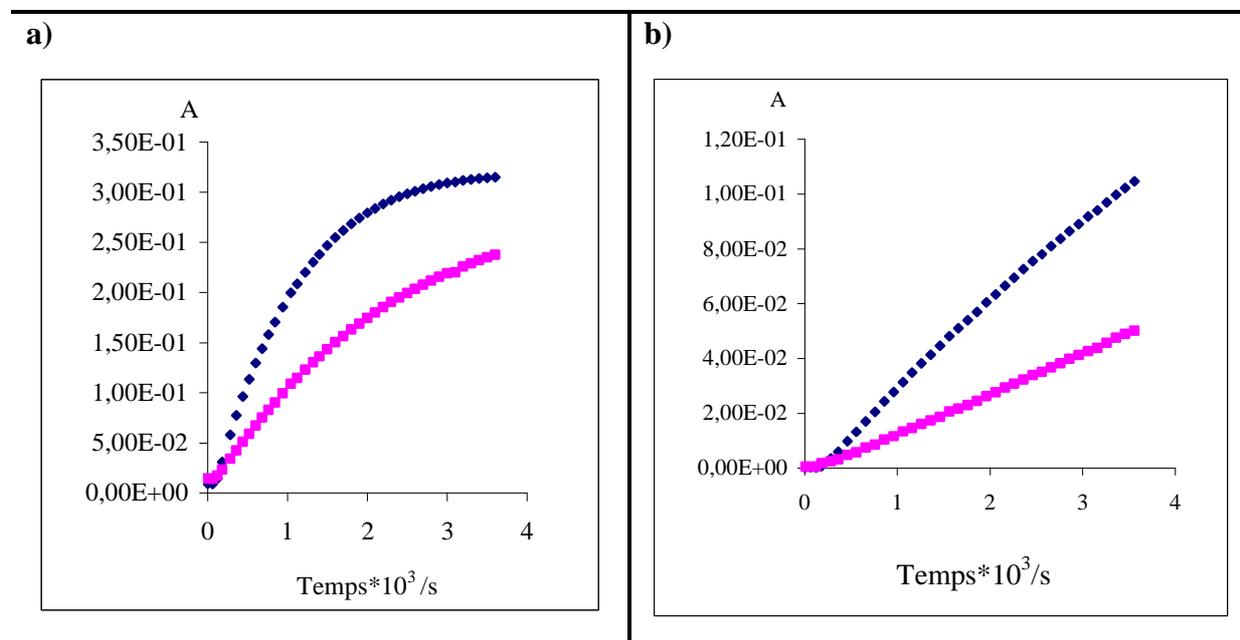
$\rho$ , DO	$10^6 V_S / \text{s}^{-1} \text{ a}$	$V_S$ relative
0	2,83	1
0,5, II	2,81	1,4
1, II	2,79	1,0
1,5, II	2,82	1,0
1,5, III	3,65	1,3
2, II	2,58	0,9
3, III	1,98	0,7

a) Vitesse spectroscopique: pente de la droite A vs. t

La vitesse d'accumulation des produits d'oxydation colorés ne dépend pas de la concentration totale de  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ . En particulier, l'autoxydation des complexes catéchine- $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  n'est pas plus rapide que l'autoxydation de la catéchine sans ion métallique ajouté et initiée par les contaminants métalliques du milieu (vraisemblablement en provenance du tampon).

### b-En présence de $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$

Comme nous l'avons déjà mentionné, les complexes catéchine- $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  évoluent rapidement par autoxydation avec formation de produits colorés dont l'accumulation est suivie à 395 et 440 nm.



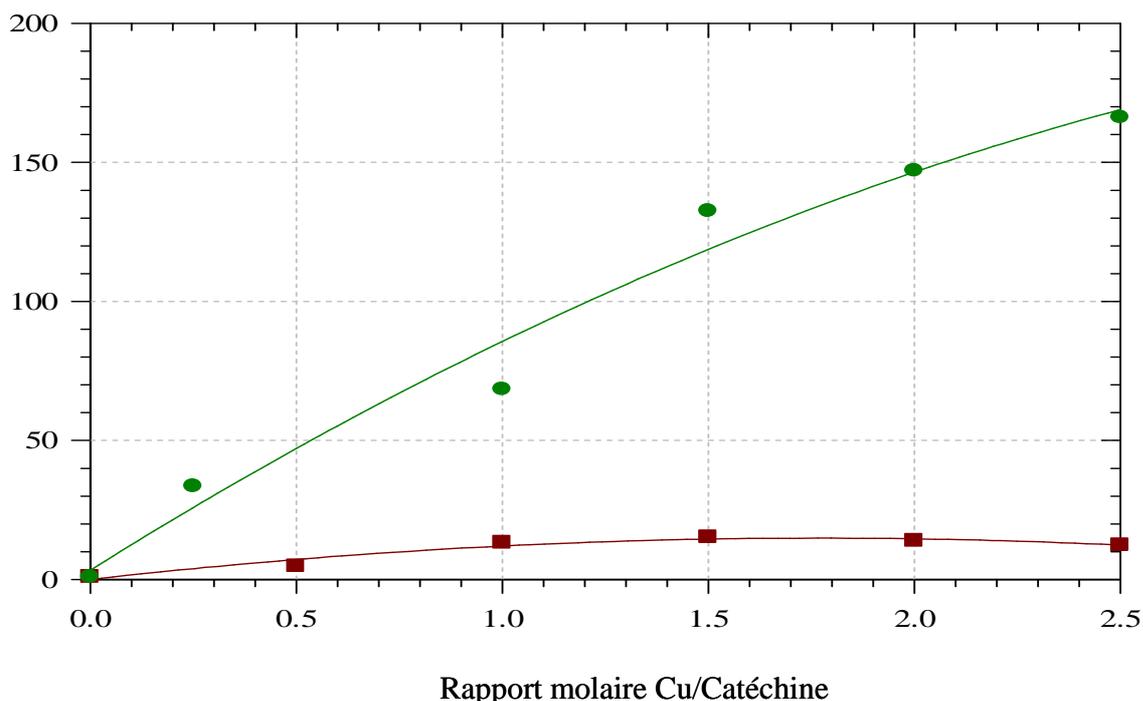
**Figure 33.** Variation de  $A(395 \text{ nm})$  et  $A(440 \text{ nm})$  sur une heure d'autoxydation de la catéchine ( $50 \mu\text{M}$ ) en présence d'un équivalent de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (a) et de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (b), pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ .  $\blacklozenge$  A(440 nm),  $\blacksquare$  A(395 nm).

Malgré la réduction rapide de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  en présence de la catéchine (**Figure 31**), des différences nettes apparaissent entre l'autoxydation initiée par  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et celle initiée par  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (**Figure 33**). Le suivi cinétique de  $A(395 \text{ nm})$  et  $A(440 \text{ nm})$  montre que l'autoxydation de la catéchine en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  se produit au moins en trois étapes contre deux en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (**Figure 33**). En présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , l'absorbance des produits colorés croît après une courte période de latence puis tend vers une saturation qui peut traduire l'autoxydation des produits colorés.

En présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , l'évolution de  $A(395 \text{ nm})$  et  $A(440 \text{ nm})$  est quasi-linéaire après la phase de latence (sensiblement plus longue qu'avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ). Aucune tendance à la saturation n'est observée.

Les paramètres caractéristiques de l'autoxydation de la catéchine en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  sont rapportés dans la **figure 34** et le **tableau 10**.

#### Vitesse d'autoxydation relative



**Figure 34.** Vitesse d'autoxydation relative de la catéchine (déduite de l'analyse cinétique de  $A(440 \text{ nm})$  en fonction du temps) en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (●) ou de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (■) (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C, concentration de catéchine = 50  $\mu\text{M}$ ).

**Tableau 10.** Autoxydation de la catéchine (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Analyse cinétique de la croissance de A(395 nm), A(440 nm) et A(480 nm). Concentration de catéchine = 50 µM.

$\rho$ , DO	$\lambda$ / nm	$10^6 k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$A_0; A_f$	$10^6 V_s / \text{s}^{-1}$ a)	$V_s$ relative (440 nm) b)
0,25, I	440	279 ( $\pm$ 1)	0,017; 0,358	95,14	33,6
0,5, II	440 c)	-	-	13,66	4,83
1, I	395	42 ( $\pm$ 1)	0,023; 1,01	41,45	
1, I	440	577 ( $\pm$ 2)	0,011; 0,347	193,87	68,5
1, I	480	621 ( $\pm$ 2)	0,009; 0,273	163,94	
1, II	395	-	-	9,07	
1, II	440 c)	120 ( $\pm$ 1)	0,001; 0,315	37,68	13,3
1, II	480 c)	130 ( $\pm$ 1)	0,001; 0,236	30,55	
1,5, I	395	260 ( $\pm$ 3)	0,034; 0,371	87,62	
1,5, I	440	1151 ( $\pm$ 7)	0,011; 0,337	375,23	132,6
1,5, I	480	1196 ( $\pm$ 9)	0,009; 0,261	301,39	
1,5, II	395	-	-	10,46	
1,5, II	440 c)	128 ( $\pm$ 1)	0,001; 0,340	43,39	15,3
1,5, II	480 c)	145 ( $\pm$ 1)	0; 0,240	34,80	
2, I	350	321 ( $\pm$ 4)	0,010; 0,335	104,33	
2, I	440 d)	1246 ( $\pm$ 8)	0,002; 0,336	416,16	147,1
2, I	480 d)	1258 ( $\pm$ 9)	0,002; 0,265	330,85	
2, II	395	-	-	9,73	
2, II	440	90 ( $\pm$ 1)	0,004; 0,444	39,60	14,0
2, II	480	110 ( $\pm$ 1)	0,004; 0,296	32,12	
2,5, I	395	385 ( $\pm$ 4)	0,016; 0,324	118,58	
2,5, I	440 d)	1462 ( $\pm$ 5)	0,012; 0,334	470,76	166,3
2,5, I	480 d)	1473 ( $\pm$ 6)	0,010; 0,262	371,20	
2,5, II	395	-	-	9,59	
2,5, II	440	84 ( $\pm$ 1)	0,001; 0,418	35,03	12,4
2,5, II	480	99 ( $\pm$ 1)	0; 0,285	28,22	

a) Vitesse spectroscopique moyenne si croissance linéaire (350 nm, pente de la droite A vs. t) ou vitesse spectroscopique initiale si croissance de 1<sup>er</sup> ordre (440 et 480 nm,  $k_{\text{obs}}(A_f - A_0)$ )

b) Rapport de  $V_s$  à la vitesse d'autoxydation spontanée ( $2,83 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ )

c) Phase de latence de 1-2 min

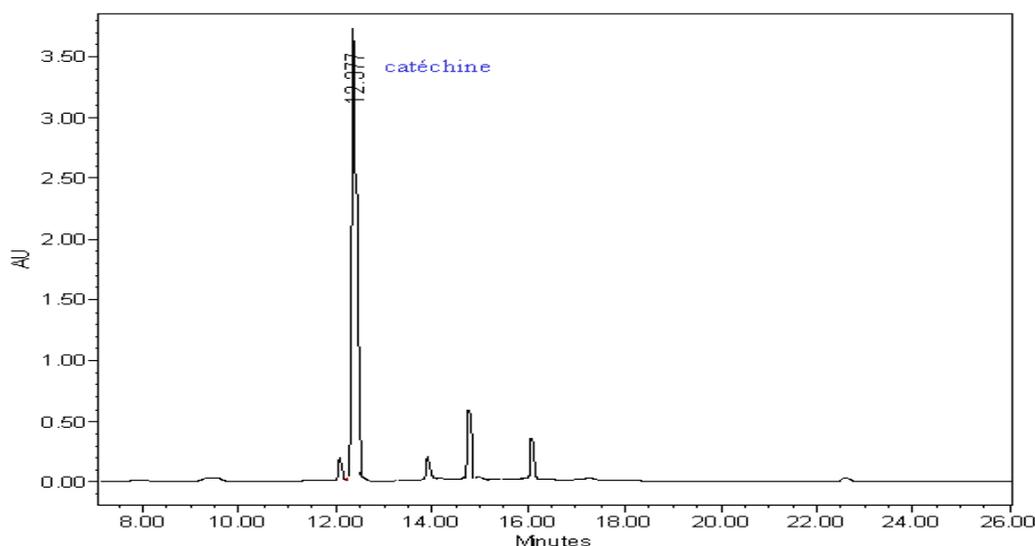
d) analyse sur 0-2000 s

À partir des résultats du **tableau 10** et de la **figure 34**, on peut faire les remarques suivantes :

- L'autoxydation de la catéchine initiée par les ions du cuivre est beaucoup plus rapide qu'en présence des ions du fer ;
- L'autoxydation de la catéchine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  est peu dépendante de la concentration initiale de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  à l'inverse de celle initiée par  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , qui est beaucoup plus rapide et dont la vitesse croît avec la concentration initiale de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

La teneur de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée après une heure d'oxydation de la catéchine ( $100 \mu\text{M}$ ) en présence d'un équivalent de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  est environ de 0,6 *equiv.* contre 0,3 *equiv.* seulement en présence d'un équivalent de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (**Figure 29**).

L'identification partielle des produits d'oxydation de la catéchine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (2 *equiv.*) a été conduite par analyse HPLC-MS après 7h de réaction. Dans ces conditions, quatre produits d'oxydation ont été détectés contre un seul lors de l'autoxydation de la catéchine en absence d'ion métallique ajouté (**Figure 5, figure 35, tableau 11**).



**Figure 35.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la catéchine ( $10^{-3} \text{ M}$ ) en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (2 *equiv.*) après 7h de réaction, tampon phosphate à pH 7,4,  $37^\circ\text{C}$ .

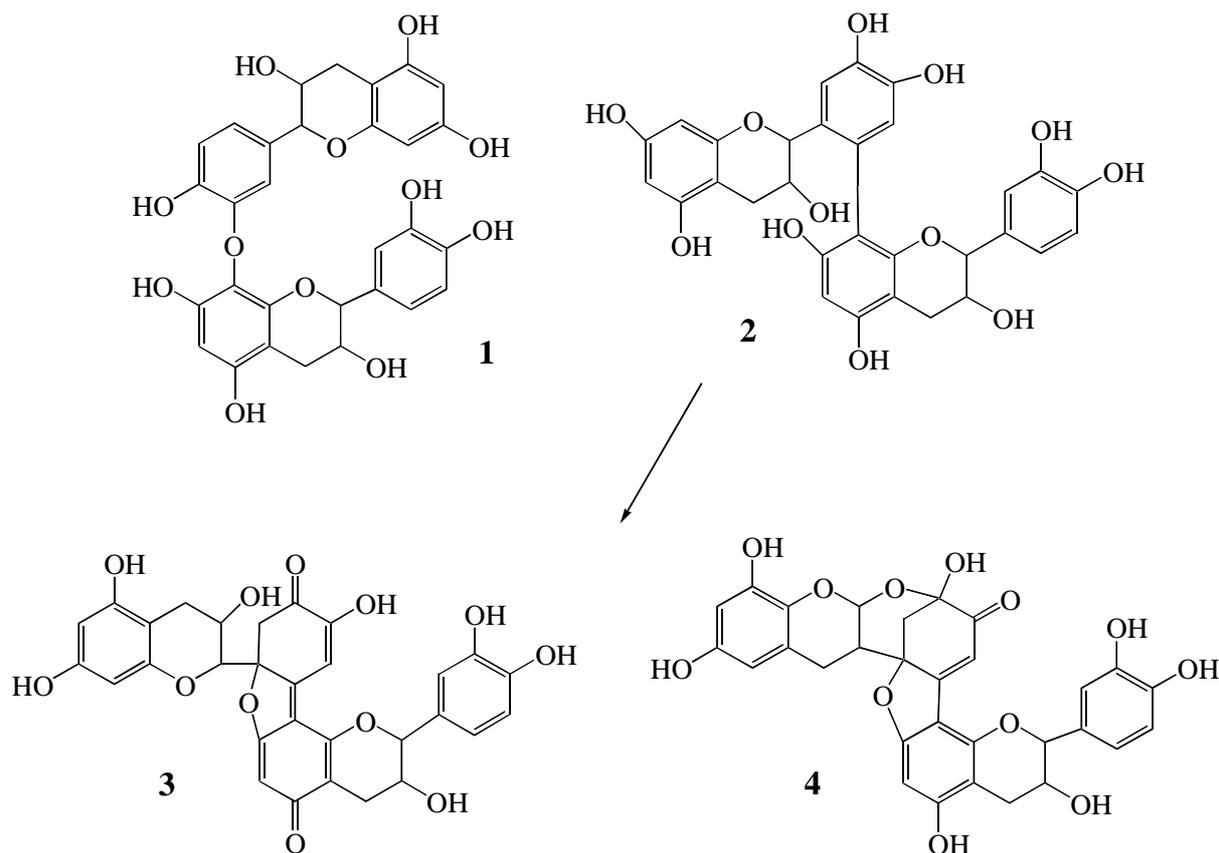
**Tableau 11.** Analyse HPLC-MS des produits d'oxydation de la catéchine en présence de Cu<sup>II</sup> (2 équiv) (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C). Catéchine = CatH<sub>2</sub> (M = 290).

t <sub>R</sub> (min)	m/z	λ <sub>max</sub> (nm)	Structure proposée
12,18	135, 287, 439, 577, 640	280	<b>2</b> = (CatH) <sub>2</sub> (C-C), <b>2</b> + Cu <sup>I</sup> - 4H Fragment = Cat
12,37	137, 289, 352	280	CatH <sub>2</sub> , CatCu <sup>I</sup>
13,96	289, 439, 577, 640	280	<b>1</b> = (CatH) <sub>2</sub> (C-O), <b>1</b> + Cu <sup>I</sup> - 4H Fragment = CatH <sub>2</sub>
14,74	135, 287, 394, 575, 638	278, 416	<b>3</b> = (CatH) <sub>2</sub> (C-C) - 2H, <b>3</b> + Cu <sup>I</sup> - 2H Fragment = Cat
16,21	135, 287, 394, 575, 638	256, 280, 385	<b>4</b> = (CatH) <sub>2</sub> (C-C) - 2H, <b>4</b> + Cu <sup>I</sup> - 2H Fragment = Cat

Les produits identifiés lors de l'autoxydation de la catéchine en présence de Cu<sup>II</sup> sont en bon accord avec ceux obtenus par l'oxydation catalysée par l'enzyme polyphénol oxydase.<sup>23</sup>

Le dimère **1** de type biaryléther provient d'une attaque du radical semi-quinone sur le noyau A d'une 2<sup>e</sup> molécule de catéchine et a déjà été détecté au cours de l'autoxydation 'spontanée' de la catéchine. Les dimères **2-4** proviendraient plutôt d'un couplage non radicalaire entre l'o-quinone de la catéchine (noyau B) et le noyau A d'une 2<sup>e</sup> molécule de catéchine (dimère **2**) suivi d'une oxydation du noyau catéchol ainsi régénéré et d'une ou deux étapes de cyclisation intramoléculaire qui finalement conduisent aux dimères colorés **3** et **4**. Ce mécanisme est en accord avec les courtes phases de latence observées dans les cinétiques de formation des produits colorés (**Figure 33**).

<sup>23</sup> Guyot S. et coll., 1996. *J. Phytochem.*42, 1279-1288.

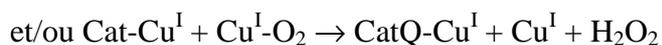


**Schéma 4.** Principaux produits d'autoxydation de la catéchine en présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$

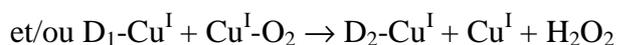
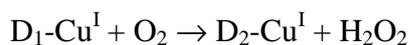
L'accumulation plus rapide des dimères colorés en présence de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  peut s'interpréter en distinguant les évolutions possibles des complexes métalliques :

Evolution du complexe catéchine- $\text{Cu}^{\text{I}}$

(Cat = catéchine, CatQ = o-quinone,  $\text{D}_1$  = dimère,  $\text{D}_2$  = dimère oxydé)



Dimérisation (avec maintien de Cu au DO I)



Evolution possible du complexe catéchine-Cu<sup>II</sup> (CatSQ = semi-quinone)

Dimérisation:  $(2 \text{ Cat-Cu}^{\text{II}} \leftrightarrow 2 \text{ CatSQ-Cu}^{\text{I}}) \rightarrow (\text{Cat-Cu}^{\text{I}})_2$  (dimères C-O ou biaryléthers)

Dismutation:  $2 \text{ Cat-Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{CatQ-Cu}^{\text{I}} + \text{Cat-Cu}^{\text{I}}$

et  $\text{Cat-Cu}^{\text{II}} + \text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{CatQ-Cu}^{\text{I}} + \text{Cu}^{\text{I}}$

Puis intervention des processus enclenchés d'emblée avec Cu<sup>I</sup> (voir ci-dessus).

On peut donc supposer que la formation des dimères incolores (biaryléthers), en compétition avec la formation des dimères colorés, soit favorisée avec Cu<sup>II</sup> et n'implique pas O<sub>2</sub>. Cette hypothèse est en accord avec une production plus faible de dimères colorés et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lors de l'oxydation de la catéchine en présence de Cu<sup>II</sup>.

#### 2-5-4 Conclusion

En absence d'ion métallique, l'acide gallique est moins stable que la catéchine dans le tampon phosphate à pH neutre. La formation de dimères de type biaryléther (probablement via des intermédiaires radicalaires de type semi-quinone) a été mise en évidence.

L'interaction de l'acide gallique et de la catéchine avec les ions du fer et du cuivre s'accompagne de l'autoxydation rapide de Fe<sup>II</sup> en Fe<sup>III</sup> et de la réduction rapide de Cu<sup>II</sup> en Cu<sup>I</sup>. La complexation des ions Cu<sup>II</sup>, Cu<sup>I</sup> et Fe<sup>II</sup> par l'acide gallique et la catéchine est rapide. La complexation de Fe<sup>III</sup> est lente en raison de la compétition avec les ions phosphates.

Les cinétiques d'autoxydation et de production de peroxyde d'hydrogène mettent en évidence l'ordre de réactivité suivant :



Les complexes de Cu<sup>I</sup> permettraient une activation directe de O<sub>2</sub> avec oxydation du ligand et production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alors que les complexes de Cu<sup>II</sup> seraient également impliqués dans des réactions de transfert d'électron intramoléculaire sans participation de O<sub>2</sub>.

En plus des dimères de type biaryléther détectés au cours de l'autoxydation 'spontanée', l'ajout de Cu<sup>II</sup> induit la formation de dimères de type biaryl qui peuvent s'oxyder à leur tour.

## Références bibliographiques

- [1] Ryan P, Hynes J.M., 2007. *J. Inorg. Biochem.* ,101, 585-593
- [2] Yongnian Ni, Shan Du, Serge Kokot, 2007. *Anal. Chim. Acta*, 584, 19-27
- [3] El Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. 2006. *Free Radical Res.*, 40, 303-320.
- [4] Khokhar S., Apenten R. K. O., 2003. *Food Chem*, 81, 133–140.
- [5] Moran J. F., Klucas R. V., Grayer R. J., Abian J., Becana M., 1997. *Free Radical Bio. Med.*, 22, 861–870.
- [6] Yusuf Yilmaz, 2006. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 64–71
- [7] Zaveri NT, 2006. *Life Sci.*, 78, 2073–2080.
- [8] Zuo Y, Chen H, Deng Y, 2002. *Talanta*, 57, 307–316
- [9] Fujiki H., 2005. *Chem. Rec.*, 5,119–132.
- [10] Xu X. Q., Huang, H., 2004. *J. Tea*, 30, 141–142.
- [11] Yang D-J. , Hwang L. S., Lin. J-T, 2007. *J. Chromatography A* ,1156, 312–320.
- [12] Alexandropoulou I., Komaitis M., Kapsokefalou M., 2006. *Food Chem.*, 94,359-365.
- [13] Argyri K., Komaitis M., Kapsokefalou M., 2006. *Food Chem.*, 96, 281-289.
- [14] Argyri K., Proestos C., Komaitis M., Kapsokefalou M., 2005. *Int. Food Sci. Nutr.*, 56, 213 - 22.
- [15] Kapsokefalou M., Zhu L., Miller D., 2006. *Nutr. Res.*, 26, 480– 485.
- [16] Jovanovic S. V., Simic M. G., Steenken S., Hara Y.,1998. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* ,11, 2365-2370.
- [17] Kumamoto M., Sonda T., Nagayama K., Tabata M., 2001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 126-132.
- [18] Hayakawa F., Ishizu Y., Hoshino N., Yamaji A., Ando T., Kimura T., 2004. *Biosci, Biotechnol. Biochem.*, 68,1825-1830.

- [19] Andjelkovic M., Van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo, M., 2006. *Food Chem.*, 98, 23–31.
- [20] Cao G. H., Sofic E., Prior R. L., 1997. *Free Radical Bio. Med.*, 22, 749–760.
- [21] Hider R. C., Liu Z. D., Khodr H. H., 2001. *Flavonoids and Other Polyphenols*, 335, 190–203.
- [22] Fiuza S. M., Van Besien E., Milhazes N., Borges F., Marques M. P. M., 2004. *J. Mol. Struct.*, 693, 103–118.
- [23] Guyot S., Vercauteren J., Cheynier V., 1996. *J. Phytochem.*, 42, 279–1288.

---

## CHAPITRE 2-6

### Discussion & Conclusion

---

Différentes composés polyphénoliques abondants dans l'alimentation et représentatifs des différentes classes de polyphénols ont été sélectionnées pour ce travail: le flavanol quercétine et son glycoside le plus commun, la rutine, l'acide caféique (3,4-dihydroxycinnamique), le flavanol catéchine et l'acide gallique (3,4,5-trihydroxybenzoïque). Toutes présentent un noyau catéchol (1,2-dihydroxybenzène), principal déterminant structural de l'activité antioxydante et complexante d'ions métalliques. Cependant, ces interactions et les processus d'oxydation qui peuvent en découler dépendent fortement de la nature de l'ion métallique et du polyphénol, de la température et du pH ainsi que de la nature du tampon utilisé.

Dans ce travail, nous avons étudié la stabilité des polyphénols sélectionnés en absence et en présence des ions du fer et du cuivre) dans un tampon phosphate à pH neutre à 37°C. A titre de comparaison, quelques expériences ont été conduites en solution acide.

#### Stabilité des polyphénols en absence d'ion métallique

On peut dresser un bilan récapitulatif (**Tableau 1**) qui nous renseigne sur l'ordre de stabilité.

**Tableau 1.** Récapitulation des données d'autoxydation spontanée des polyphénols sélectionnées dans le mélange tampon phosphate/MeOH 95/5 (pH=7,4, 37°C).

Polyphénol	Quercétine	Rutine	Acide caféique	Catéchine	Acide gallique
$k_a \times 10^5 \text{ (s}^{-1}\text{) a)}$	6 ( $\pm$ 3)	1.0 ( $\pm$ 0.3)	8 ( $\pm$ 1)	3 ( $\pm$ 1)	19 ( $\pm$ 4)
$C_1 \text{ (}\mu\text{M) b)}$	19	-	25	10	50
$t_{1/2} \text{ (h) c)}$	3,2	-	2,4	6,4	1,0
$C'_1 \text{ (}\mu\text{M) d)}$	41	8	13	16	50
$C'_1/C_1$	2,2	-	0,5	1,6	1,0
Type de produit d'oxydation détecté e)	Addition de solvant sur <i>p</i> -quinoneméthide	Pas d'oxydation	Dimère C-O	Dimère C-O	Dimère C-O

a) Constante de vitesse apparente du 1<sup>er</sup> ordre

b) Concentration de polyphénol consommé après 1h (concentration initiale =  $C_0 = 100 \mu\text{M}$ ),  $C_1 = C_0(1 - \exp(-k_a t))$

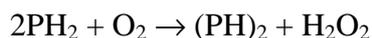
c) Temps de demi-réaction =  $\text{Ln}2/k_a$

d) concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produite après 1h d'autoxydation du polyphénol ( $100 \mu\text{M}$ )

e) Analyse CLHP-SM après 7h d'autoxydation des polyphénols

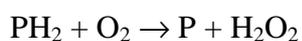
D'après les valeurs de  $k_a$ , la sensibilité des polyphénols à l'autoxydation spontanée suit l'ordre suivant: acide gallique > acide caféique > quercétine > catéchine > rutine. En outre, la teneur de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée lors de l'autoxydation des polyphénols étudiés dans le tampon phosphate suit l'ordre suivant: acide gallique > quercétine > catéchine > acide caféique > rutine.

Le bilan de l'autoxydation d'un catéchol ( $\text{PH}_2$ ) avec dimérisation s'écrit :



Ainsi, après consommation totale du catéchol, la quantité théorique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formée serait 0,5 équivalent.

Le bilan de l'autoxydation d'un catéchol ( $\text{PH}_2$ ) avec formation de l'*o*-quinone (ou autre tautomère avec ou sans addition de solvant) s'écrit:



Ainsi, après consommation totale du catéchol, la quantité théorique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formée serait 1 équivalent.

Le dosage de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intervenant après 1 h d'autoxydation, les différents polyphénols ne sont que très partiellement consommés (au plus 50% dans le cas de l'acide gallique). Ainsi, le nombre de moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit par mole de polyphénol consommé varie selon: quercétine > catéchine > acide gallique > acide caféique (**Tableau 1**).

Par ailleurs, les produits d'autoxydation de la quercétine sont la conséquence de l'addition d'eau ou de MeOH sur la *p*-quinoneméthide formée par l'oxydation à deux électrons de la quercétine même si la teneur en MeOH dans le tampon phosphate est faible (5%). En revanche, les produits d'autoxydation détectés avec l'acide gallique, la catéchine et l'acide caféique sont des dimères de type C-O formés par couplage radicalaire.

Ainsi, la plus forte capacité de la quercétine à produire du peroxyde d'hydrogène par réduction de  $\text{O}_2$  est en accord avec la formation d'un intermédiaire de type *p*-quinoneméthide mais suggère que les produits d'oxydation de la quercétine eux-mêmes participent à la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par autoxydation. C'est aussi le cas de la catéchine et de l'acide gallique puisque, malgré la tendance à la dimérisation de ces composés, la quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produite est bien supérieure à 0,5 équivalent.

La rutine est de loin le polyphénol le moins sensible à l'autoxydation dans la série étudiée.

### Interaction des polyphénols avec les ions du fer et du cuivre

Pour les acides phénoliques et la catéchine, la complexation se manifeste via le noyau catéchol. Dans le cas des flavonols, les autres sites de complexation (5-hydroxy-4-oxo voire 3-hydroxy-4-oxo) peuvent également contribuer, particulièrement dans le cas de la complexation de la quercétine par les ions du cuivre.

La formation de complexes stables implique le remplacement d'un ou deux protons par l'ion métallique. Ainsi, à pH acide, la protonation des polyphénols est dominante et la complexation est négligeable. Par ailleurs, dans le tampon neutre, la compétition entre les ions phosphates et le polyphénol est clairement mise en évidence par l'influence de l'ordre d'addition des réactifs sur la cinétique de complexation mais aussi par une complexation typiquement plus rapide avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$  et les ions du cuivre qu'avec  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (plus fortement associé aux ions phosphates). Dans la série étudiée, la cinétique de complexation pour un polyphénol donné suit l'ordre suivant :  $\text{Cu}^{\text{I}} > \text{Cu}^{\text{II}} > \text{Fe}^{\text{II}} > \text{Fe}^{\text{III}}$ .

Nous pouvons séparer les polyphénols étudiés en deux groupes selon leur affinité pour les ions du fer ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) mesurée par la constante de vitesse de complexation: le premier groupe comprend la rutine et la quercétine ( $k_1 = 5-10 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) et le second groupe comprend l'acide gallique, l'acide caféique et la catéchine ( $k_1 \approx 1-2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). La complexation des ions du fer par le second groupe est significativement plus rapide qu'avec le premier.

Quand  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est en défaut, le complexe formé est stable peut-être en raison de stoechiométries métal:ligand plus élevées (1:2 ou 1:3). Quand  $\text{Fe}^{\text{II}}$  est en excès, un déclin de l'absorbance du complexe est détecté après la complexation qui pourrait traduire l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dans le complexe et/ou la coordination d'ions phosphate par  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Quel que soit le polyphénol considéré, le dosage de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  confirme que cet ion est instable dans le complexe (temps de demi-vie  $\approx 5-8 \text{ s}$ ) et évolue rapidement en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  par autoxydation. La réduction de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  n'est pas détectée dans ces conditions. Une très faible quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2-8%) est accumulée durant les 4 premières minutes de la réaction entre les polyphénols et  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (1 *equiv.*), ce qui suggère que  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas un intermédiaire majeur dans l'autoxydation de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  dont le bilan peut s'écrire :  $4\text{Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 4\text{Fe}^{\text{III}} + 2\text{H}_2\text{O}$ .

La complexation des polyphénols est beaucoup plus rapide en présence d'ions du cuivre qu'en présence d'ions du fer. La complexation par  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  est complète dès les cinq premières secondes qui suivent l'addition de  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  à la solution de polyphénols dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C). Dans ces conditions, la complexation est quasi-irréversible. La quantification de l'étape rapide de la complexation du  $\text{Cu}^{\text{I}}$  par l'acide gallique, l'acide caféique et par la catéchine est presque impossible. La complexation de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  par la quercétine est plus rapide qu'avec les autres polyphénols étudiés. Cela peut s'expliquer par la participation du groupement 3-hydroxy-4-oxo (voire 5-hydroxy-4-oxo) à la complexation.

Quand  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  est en défaut, les modifications spectrales sont marginales après l'étape rapide de complexation. De même qu'avec  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , le complexe formé est stable.

En présence d'un excès de  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ , un processus multi-étapes est observé : après l'étape rapide de complexation, un déclin de l'absorbance du complexe est observé qui traduit l'amorce de l'oxydation du ligand. Avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , l'oxydation du ligand est confirmée par la réduction rapide de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans le complexe (dosage de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  par la méthode à la bathocuproïne) Par ailleurs, la formation notable de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dès les premières minutes de la réaction montre que  $\text{O}_2$  participe aux transferts d'électrons. Avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , le degré d'oxydation du métal est maintenu et la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est plus importante.

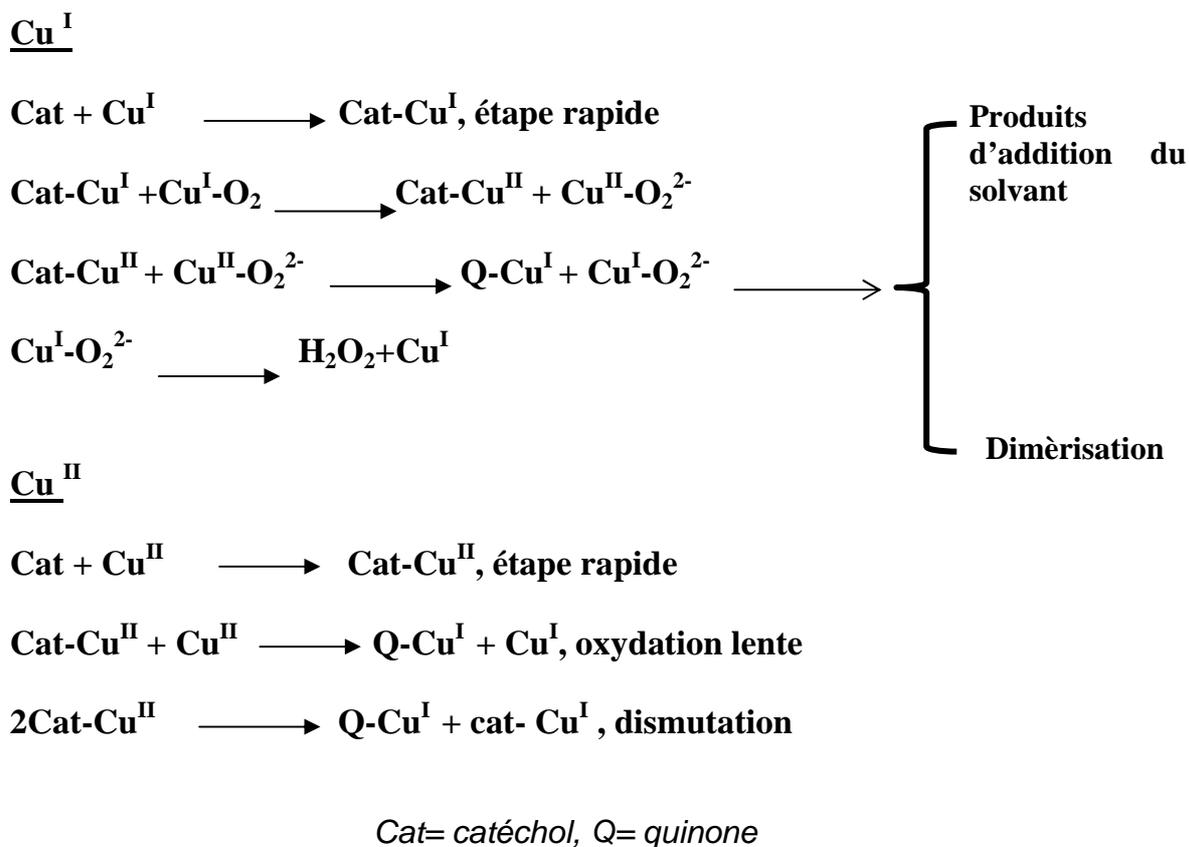
Les complexes métalliques de la rutine sont plus stables que ceux des autres polyphénols étudiés. Cette stabilité illustre la forte influence du résidu glycosyle en position 3 sur le caractère réducteur du ligand.

À l'exception de l'acide caféique, Les valeurs des constantes de vitesse apparentes d'oxydation des polyphénols en présence des ions du fer sont typiquement du même ordre que pour les formes libres, ce qui montre que les complexes polyphénol-fer sont peu réactifs. Une explication peut être l'autoxydation rapide de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (sans formation d'espèces oxygénées réactives intermédiaires qui permettraient l'oxydation du ligand), lequel est très peu oxydant dans nos conditions du fait de la coordination de divers ligands oxygénés durs (polyphénols, ions phosphates et  $\text{HO}^-$ ) qui abaissent fortement son potentiel redox. Il est donc probable que le transfert d'un électron du polyphénol vers  $\text{Fe}^{\text{III}}$  au sein du complexe soit peu favorable.

À l'exception du complexe rutine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  qui est inactif, les complexes des polyphénols avec les ions du cuivre sont beaucoup plus sensibles à l'oxydation que les complexes des ions du fer. La concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulée sur une heure est typiquement beaucoup plus élevée. L'oxydation du ligand et la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont en outre plus rapides avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$  qu'avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . En présence de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , l'oxydation des polyphénols est probablement ralentie par l'étape initiale de réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  dans le complexe.

En excès de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , l'oxydation du ligand procéderait par transfert de 2 électrons du complexe polyphénol- $\text{Cu}^{\text{I}}$  vers  $\text{O}_2$  lui-même activé par un 2<sup>e</sup> ion  $\text{Cu}^{\text{I}}$  avec formation simultanée d'une *o*-quinone et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et maintien du cuivre au degré d'oxydation I.

Une représentation possible de ce processus est proposée sur le **schéma 1**:



**Schéma 1.** Mécanisme proposé de l'oxydation à l'air du polyphénol initiée par Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup>

Les analyses CLHP-SM ont mis en évidence une variété de produits d'oxydation des polyphénols en présence de Cu<sup>II</sup> (sauf dans le cas du complexe rutine-Cu<sup>II</sup> qui est stable durant 7h dans le tampon phosphate neutre). L'oxydation de la quercétine suit le mécanisme habituel de formation d'un intermédiaire *p*-quinoneméthide qui subit l'addition du solvant (MeOH ou H<sub>2</sub>O) avec déconjugaison du cycle central. L'oxydation de la catéchine, de l'acide gallique et de l'acide caféique entraîne la formation des produits de dimérisation, voire d'oligomérisation (cas de l'acide gallique). La réaction peut procéder par addition nucléophile d'une molécule de polyphénol sur l'*o*-quinone correspondante.

En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le complexe rutine-Cu<sup>II</sup> conduit à des produits d'oxydation qui résultent vraisemblablement de l'addition du solvant (MeOH ou H<sub>2</sub>O) sur l'intermédiaire *o*-quinone.

Les interactions des polyphénols avec les ions des métaux de transition peuvent jouer un rôle important dans l'activité antioxydante des polyphénols via la formation de complexes inertes. Toutefois, si la réaction de complexation est suivie par l'autoxydation, l'antioxydant peut être rapidement consommé et la protection peut en être affaiblie. C'est sans doute la raison de l'efficacité modeste (plus faible que celle de la rutine) qu'a montré la quercétine dans l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique induite par  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$  (voir la suite, chapitre 3). En outre, un effet pro-oxydant pourrait apparaître dû à la formation d'espèces oxygénées réactives (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl).

En présence d'ions  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , l'oxydation des polyphénols peut être rapide à pH acide, c'est-à-dire dans des conditions où  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est faiblement lié et fortement oxydant. Il n'y a alors pas participation de  $\text{O}_2$ . À pH neutre, la complexation est forte et les complexes sont relativement stables. En revanche, les ions du cuivre sont très efficaces pour amorcer l'autoxydation des polyphénols en milieu neutre avec production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Des traces d'ions du cuivre faiblement liés en milieu biologique ou dans l'aliment pourraient constituer un élément déterminant de la stabilité des polyphénols, tout particulièrement pendant les traitements thermiques appliqués dans l'industrie alimentaires ou au cours de la conservation et de la cuisson des aliments.

---

*CHAPITRE 3*

*Interactions de polyphénols avec les ions  
du Cuivre: Pouvoir antioxydant*

---

### **Chapitre 3. Interactions de Polyphénols avec les ions du Cuivre : Pouvoir antioxydant**

**Résumé**—La famille des polyphénols renferme de très nombreux composés à potentialités antioxydantes plus au moins fortes. Ces propriétés jouent un rôle de prévention important contre le stress oxydant initié par les métaux de transition dans les tissus et organes végétaux. Dans ce chapitre, nous allons étudier les conséquences des interactions des polyphénols sélectionnés avec les ions du cuivre sur le pouvoir antioxydant mesuré par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par le système  $H_2O_2/Cu^{II}$  (pH 7.4, 37°C).

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont indispensables à l'homme. Ils sont notamment impliqués dans la formation des membranes cellulaires, la synthèse hormonales et participent à la prévention des maladies cardiovasculaires. Or, ces AGPI (oméga 6 et oméga 3) sont particulièrement sensibles à l'oxydation pendant les traitements thermiques, culinaires<sup>1</sup> ou au cours de la conservation des aliments,<sup>2</sup> ce qui constitue ainsi un frein majeur au développement de produits riches en AGPI. En outre, après l'ingestion ces lipides polyinsaturés peuvent aussi subir un catabolisme oxydant dans le tractus digestif du fait la présence d'agents pro-oxydants d'origine alimentaire (ex : fer héminique).<sup>3</sup> Dans les aliments, les lipides sont souvent dispersés dans la phase aqueuse. Cette dispersion accroît leur sensibilité à l'autoxydation en favorisant les contacts avec le dioxygène et les espèces pro-oxydantes comme les ions des métaux de transition (fer et cuivre). Ces phénomènes d'oxydation altèrent les propriétés gustatives des lipides de l'alimentation et conduisent à des produits d'oxydation (composés carbonylés, hydroperoxydes) potentiellement toxiques en

<sup>1</sup> Berset C., Cuvelier M-E., 1997. *Adria*, 4-13.

<sup>2</sup> Sanchez-Alonso et coll., 2007. *Food Chem.*, 101, 372-378.

<sup>3</sup> Kanner J., Lapidot T., 2001. *Free Radical Biol. Med.*, 31, 1388-1395.

raison de leur caractère électrophile et/ou oxydant. L'autoxydation des lipides est responsable non seulement de la détérioration des aliments (rancissement), mais aussi, in vivo, de dommage aux tissus. Ainsi, ce phénomène est impliqué dans diverses pathologies courantes telles que les maladies cardiovasculaires,<sup>4,5,6</sup> certains types de cancers,<sup>7,8,9</sup> divers préjudices inflammatoires, immunitaires<sup>10</sup> et neurodégénératifs.<sup>11,12</sup> Le fait que les antioxydants puissent prévenir ou ralentir la progression de telles maladies a des implications importantes en terme de nutrition et santé. Chez l'homme et l'animal, des systèmes de défense ont été développés contre les processus d'oxydation lipidique. En particulier, les glutathion peroxydases (en association avec la glutathion réductase) sont capables de réduire une variété d'hydroperoxydes en les alcools correspondants. Par ailleurs, l'alimentation apporte une grande variété d'antioxydants (vitamine C et E, polyphénols, caroténoïdes) susceptibles de participer à la prévention de l'oxydation lipidique dans les aliments et chez l'homme.<sup>13,14,15</sup> De nombreux travaux expérimentaux et études épidémiologiques soulignent l'intérêt d'une alimentation variée, riche en fruits et légumes. Plusieurs hypothèses suggèrent que la consommation de produits végétaux en quantité suffisante serait bénéfique pour l'homme, en réduisant le risque de développer certaines pathologies. Ainsi, la préservation des antioxydants dans les formulations alimentaires n'a plus pour seul but de préserver les qualités sensorielles du produit mais aussi de renforcer sa valeur nutritionnelle.

La famille des polyphénols renferme de très nombreux composés à potentialités antioxydantes plus au moins fortes qui peuvent intervenir dans l'inhibition de la peroxydation lipidique en chélatant les ions des métaux de transitions (fer, cuivre) qui initient l'autoxydation des lipides et/ou en réduisant (directement ou plus probablement en association avec l' $\alpha$ -tocophérol qu'ils contribuent à régénérer) les radicaux oxyl et peroxyyl lipidiques impliqués dans le processus.<sup>16,17,18,19</sup> Enfin, certains polyphénols sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation, en particulier de la lipoxigénase.<sup>20</sup>

---

<sup>4</sup> Pamplona R. et coll., 2008. *Free Radical Biol. Med.*, 45, 1159-1166.

<sup>5</sup> Mircoli L. et coll., 2008. *Nutr. Metab. Cardiovas. Diseases*, 18, Supplement S51-S52.

<sup>6</sup> Rehman A. et coll., 1999. *FEBS Lett.* 448, 120-122.

<sup>7</sup> Genestra M., 2007. *Cell. Signalling*, 19, 1807-1819.

<sup>8</sup> Laguerre M. et coll., 2007. *Prog. Lipid Res.*, 46, 244-282.

<sup>9</sup> Koteish A. et coll., 2003. *Gastroenterology*, 124, Supplement 1, A689.

<sup>10</sup> Black P.H. 2002. *Brain, Behav., Immun.*, 16, 622-653.

<sup>11</sup> Mandel S. et coll., 2007. *Prog. Neurobiol.*, 82, 348-360.

<sup>12</sup> Mandel S., Youdim M.B. H., 2004. *Free Radical Bio. Med.*, 37, 304-317.

<sup>13</sup> Sukkar S.G., Rossi E., 2004. *Autoimmun. Rev.*, 3, 199-206.

<sup>14</sup> Boskou D., 2006. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 505-512.

<sup>15</sup> Stangeland T. et coll., 2009. *Food Chem.*, 113, 85-9.

<sup>16</sup> Van Acker S.A. B. E. et coll., 1997. *Biochem. Pharmacol.*, 56, 935-943.

<sup>17</sup> Saskia A. B. E. Van Acker et coll., 1996. *Free Radical Bio. Med.*, 20, 331-342.

Pour répondre aux exigences à la fois de la technologie industrielle et de la santé publique, un bon antioxydant alimentaire doit être efficace à faible concentration, facile à incorporer dans le produit et résistant aux traitements thermiques.

En outre, il ne doit pas modifier les propriétés sensorielles de l'aliment ni présenter de toxicité pour le consommateur.<sup>21</sup>

L'oxydation lipidique et son inhibition par des antioxydants dépendent fortement du milieu : polarité, température, nature de substrat, milieu solide, milieu liquide homogène ou émulsionné. C'est la raison pour laquelle de nombreux résultats publiés apparaissent divergents, particulièrement, dans les classements différents de l'ordre d'efficacité des antioxydants. Les nombreux travaux de la littérature mettent en œuvre des méthodologies diverses, selon le processus modélisé : oxydation des huiles et émulsions alimentaires riches en AGPI,<sup>22,23</sup> oxydation dans le tractus digestif,<sup>24</sup> oxydation des LDL et des phospholipides membranaires.<sup>25,26,27</sup>

Suite à notre travail sur les interactions des polyphénols de l'alimentation avec les ions du fer et du cuivre, nous allons maintenant brièvement étudier l'influence de ces mêmes polyphénols sur la peroxydation de l'acide linoléique induite par  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Nos efforts pour comparer l'efficacité antioxydante de ces polyphénols et pour rationaliser leurs mécanismes d'action seront décrits.

### 3-1 Mécanisme d'oxydation et d'inhibition de la peroxydation des lipides

#### 3-1-1 Mécanisme de peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI)

La peroxydation non-enzymatique des lipides polyinsaturés est une réaction radicalaire en chaîne qui comporte les trois phases typiques suivantes :

\***Initiation** : les principales espèces responsables de l'amorçage de l'autoxydation sont les ions des métaux de transition (y compris les métalloprotéines) d'origine endogène ou

---

<sup>18</sup> Tuba Ak, İlhami Gülçin, 2008. *Chem-Biol. Interact.*, 174, 27-37.

<sup>19</sup> Dangles O., Dufour C., 2008. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 67-87.

<sup>20</sup> Soobrattee M.A. et coll., 2005. *Mut. Res.-Fund. Mol. M. Mutagenesis*, 579, 200-213.

<sup>21</sup> Berset C., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. *Edit Lavoisier*, 264-293.

<sup>22</sup> Natalia Fagali N., Catalá A., 2008. *Biophys. Chem.*, 137, 56-62.

<sup>23</sup> İlhami Gülçin, 2006. *Toxicology*, 217, 213-220.

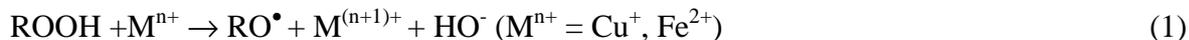
<sup>24</sup> Kanner J., Lapidot T., 2001. *Free Radical Bio. Med.*, 31, 1388-1395.

<sup>25</sup> Lotito S.B., Frei B., 2006. *Free Radical Bio. Med.*, 41, 1727-1746.

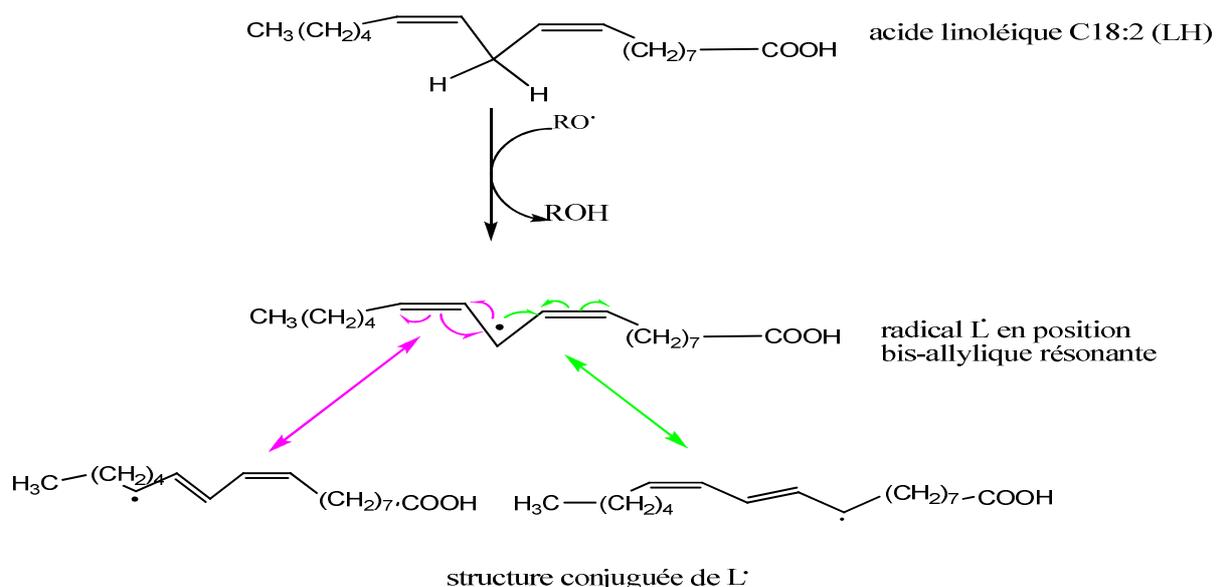
<sup>26</sup> Lotito S.B., Frei B., 2004. *Free Radical Bio. Med.*, 37, 251-258.

<sup>27</sup> Yang B. et coll., 2001. *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 747-751.

exogène (contaminants métalliques). Ils enclenchent l'oxydation par coupure homolytique de traces d'hydroperoxydes lipidiques contaminant le système lipidique considéré voire de petites concentrations de peroxyde d'hydrogène. Ces hydroperoxydes seront notés ROOH. L'étape d'initiation peut alors s'écrire:



Sur le schéma 1, la deuxième étape est explicitée dans le cas de l'acide linoléique



**Schéma 1.** Initiation de l'oxydation de l'acide linoléique par les radicaux oxydes <sup>28</sup>

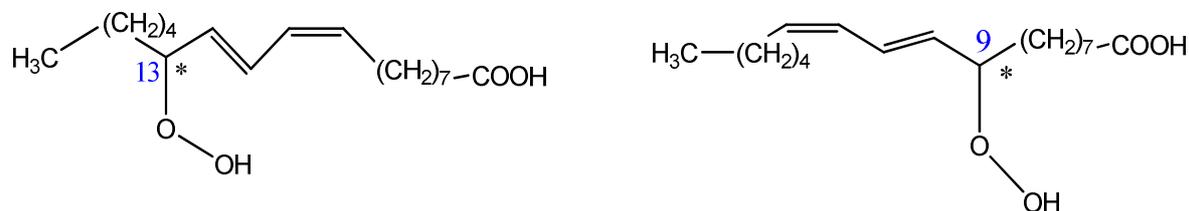
\*Propagation:



La première étape (réaction 3) est rapide en raison de la nature biradicalaire de O<sub>2</sub>. On peut donc considérer que c'est le seul processus de consommation de L• en présence de dioxygène. Les radicaux peroxydes LOO• sont assez réactifs pour réagir avec une 2<sup>e</sup> molécule d'acide linoléique LH (réaction 4) et reformer L• bouclant ainsi le cycle de propagation. C'est la raison du caractère pernicieux de la peroxydation lipidique: une faible concentration d'espèces initiatrices (ions métalliques, hydroperoxydes) suffit à enclencher un processus auto-entretenu avec production de concentrations beaucoup plus élevées d'hydroperoxydes

<sup>28</sup> Gardès-Albert M., Jore D., 2005. "Radicaux libres et Stress oxydant", *Aspects Biologiques et Pathologiques*, Lavoisier, 1-23.

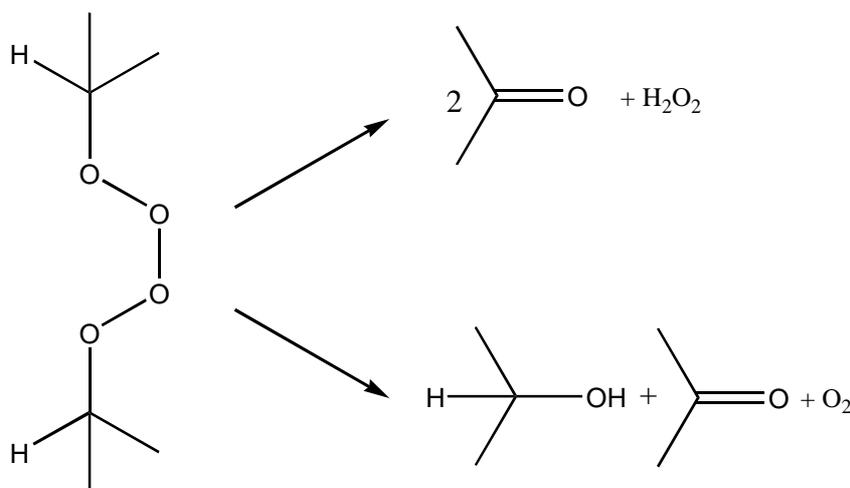
lipidiques. Les hydroperoxydes formés sont un mélange de régiosomères 9 et 13, de diastéréoisomères (Z, E) et (E, E) et d'énantiomères R et S (Figure 1).



**Figure 1.** Structure des hydroperoxydes formés pendant la peroxydation de l'acide linoléique

\* terminaison :

$2 \text{ LOO}^\bullet \rightarrow$  produits non radicalaires (LOH, composés carbonylés) *via* un intermédiaire de type LOO-OOL instable, qui se décompose en éliminant  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{O}_2$  (Figure 2).



**Figure 2.** Décomposition des tétraoxydes formés dans la phase de terminaison

### 3-1-2 Mécanisme général d'action des antioxydants phénoliques

La réduction (transfert d'atome H ou d'électron) des radicaux oxyles et peroxydes par les phénols ( $\text{ArOH}$ ) est généralement rapide en raison de la stabilisation par délocalisation électronique des radicaux aryloxydes ( $\text{ArO}^\bullet$ ) ainsi produits. Ces réactions inhibent les étapes d'initiation (réduction de  $\text{RO}^\bullet$ ) et de propagation (réduction de  $\text{LOO}^\bullet$ ).



Les réactions (5) et (6) sont exothermiques. Leurs énergies d'activation diminuent avec l'enthalpie de dissociation homolytique de la liaison ArO-H. La délocalisation de l'électron non apparié de ArO<sup>•</sup> sur le cycle aromatique et le fait que l'addition de O<sub>2</sub> sur ArO<sup>•</sup> (qui conduirait à des radicaux peroxytes réactifs, réactions 7 et 8) soit en général négligeable permettent d'interpréter l'inhibition observée. Cependant, des effets pro-oxydants liés à la réactivité de ArO<sup>•</sup> (réaction 9) peuvent se manifester.



Les antioxydants capables de réduire rapidement les radicaux LOO<sup>•</sup> sont dits 'briseurs de chaîne'. C'est le cas de l'α-tocophérol. L'inhibition se traduit alors par une phase de latence pendant laquelle la vitesse de peroxydation est quasi-nulle et qui correspond à la consommation de l'antioxydant. En revanche, les antioxydants hydrophiles tels que les polyphénols agissent principalement par inhibition de l'initiation typiquement à l'interface eau-lipide. En conséquence, ils ralentissent la peroxydation sans l'inhiber totalement. On n'observe donc pas une phase de latence nette.

Parmi les polyphénols, ceux qui possèdent un noyau catéchol sont typiquement de bien meilleurs antioxydants en raison de la stabilité relative de la semiquinone formée lors de la réduction des radicaux (stabilisation par effet électronique et liaison H intramoléculaire).<sup>19,29,30</sup> La semiquinone est capable de réduire un 2<sup>e</sup> équivalent de radicaux pour donner une o-quinone. D'une manière générale, lors de l'action antioxydante, les polyphénols subissent des réactions d'oxydation successives qui s'accompagnent de la réduction de plusieurs équivalents de radicaux (stoechiométrie > 2), ce qui prolonge la protection.<sup>31</sup> Dans l'inhibition de la peroxydation lipidique, ces avantages sont tempérés par la faible affinité des polyphénols pour les phases lipidiques qui semble limiter leur action à une inhibition de l'étape d'initiation et à la régénération de l'α-tocophérol à l'interface eau-lipide.

<sup>29</sup> Lucarini M. et coll., 2002. *J. Org. Chem.*, 67, 928-931.

<sup>30</sup> Mira L. et coll., 2002. *Free Radical Res.*, 36, 1199-1208.

<sup>31</sup> Goupy P. et coll., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 615-622.

### 3-2 Etude d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Cu<sup>II</sup>

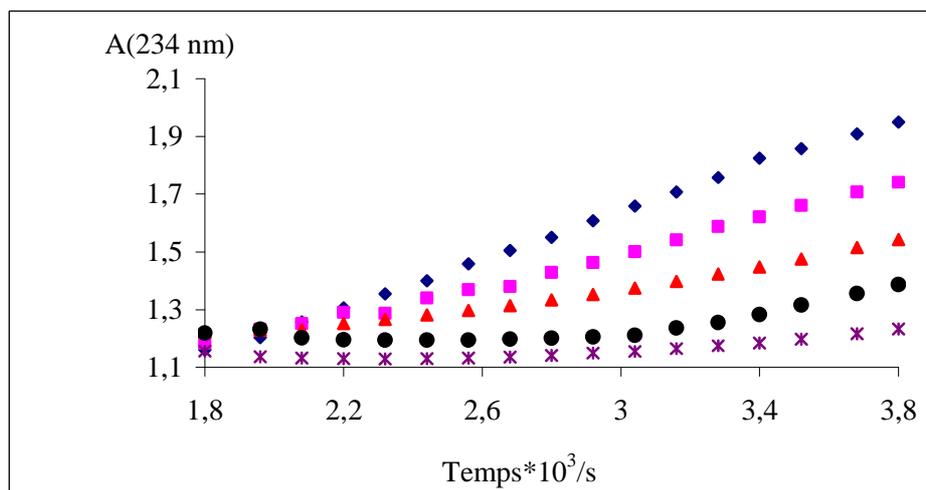
#### Description de l'expérience

L'acide linoléique (LH, concentration finale: 2 mM) est solubilisé dans un tampon phosphate 0,01 M (pH 7.4, 37°C) par insertion dans des micelles de tween 20 (1,22 M). La peroxydation est amorcée par addition successive de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentration finale: 5 mM) et Cu<sup>II</sup> (concentration finale: 50 µM). Elle est suivie par spectroscopie UV-visible avec détection des hydroperoxydes lipidiques (diènes conjugués) à 234 nm. Après établissement d'une vitesse constante de peroxydation non inhibée ( $V_0$ ), l'antioxydant (quercétine, rutine, catéchine, acide gallique et acide caféique) est ajouté à différentes concentrations (C) environ 30- 40 min après l'ajout de Cu<sup>II</sup>, ce qui (sauf exception) diminue la vitesse de peroxydation (vitesse de peroxydation inhibée  $V_i$ ).

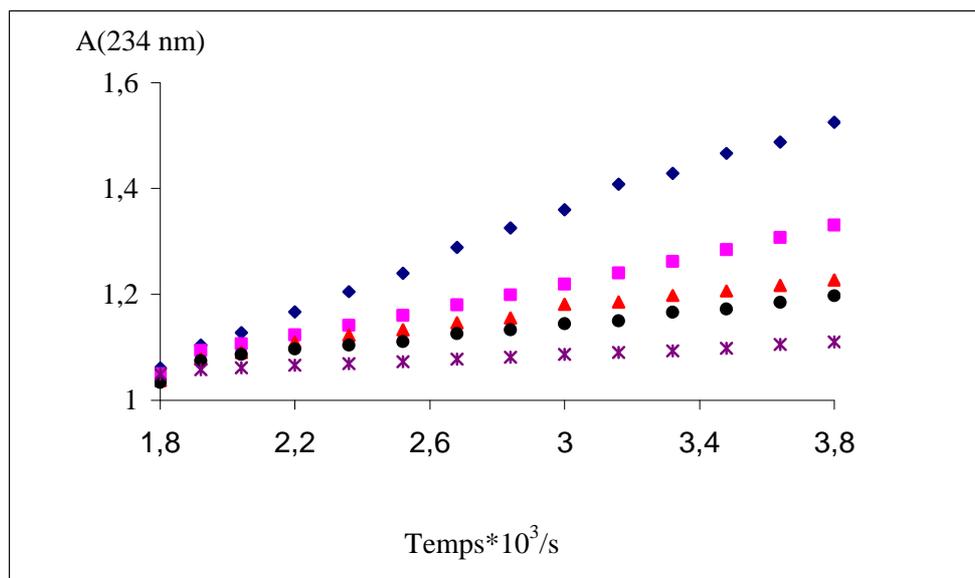
Le rapport  $V_i/V_0$  est tracé en fonction de la concentration totale d'antioxydant. Le paramètre IC<sub>50</sub> (concentration d'antioxydant correspondant à 50% d'inhibition, soit  $V_i/V_0 = 0.5$ ) peut alors être estimé. Plus IC<sub>50</sub> est faible, plus l'antioxydant est efficace.

#### 3-2-1 Inhibition par les flavonoïdes

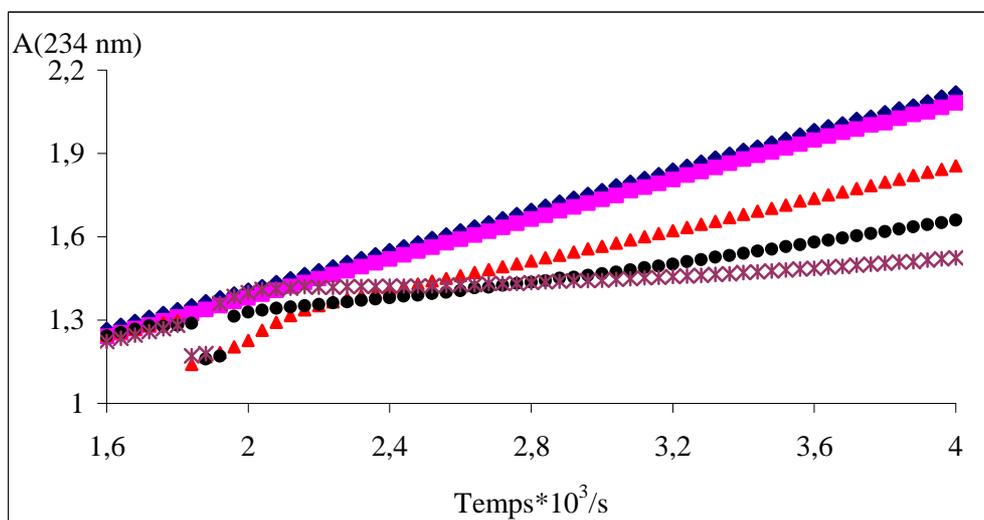
Les tracés de l'absorbance à 234 nm en fonction du temps avec et sans antioxydant sont représentés sur les figures 3 à 5.



**Figure 3.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et Cu<sup>II</sup> (50 µM) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C de quercétine. ♦ C = 0 µM, ■ C = 7,5 µM, ▲ C = 10 µM, ● C = 12,5 µM, \* C = 15 µM.



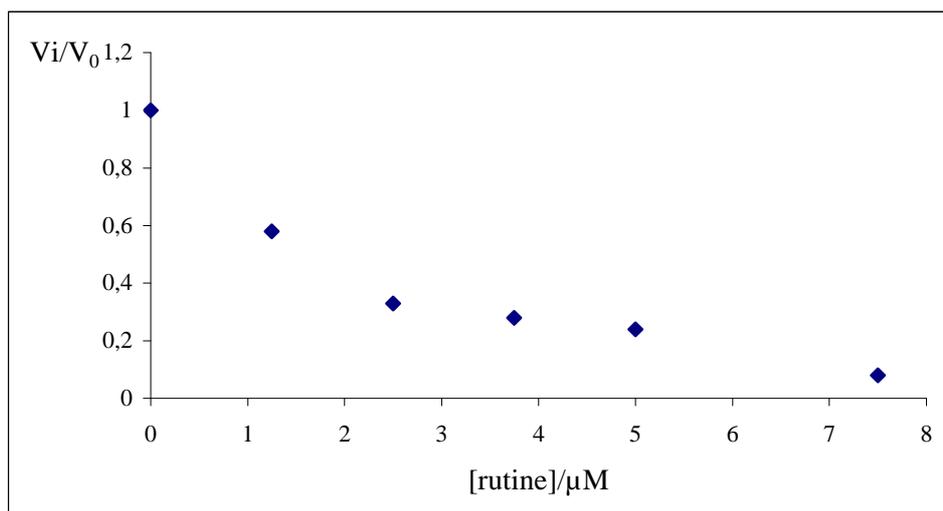
**Figure 4.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C de rutine.  $\blacklozenge$  C = 0  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$  C = 2,5  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$  C = 3,5  $\mu\text{M}$ ,  $\bullet$  C = 5  $\mu\text{M}$ ,  $*$  C = 7,5  $\mu\text{M}$ .



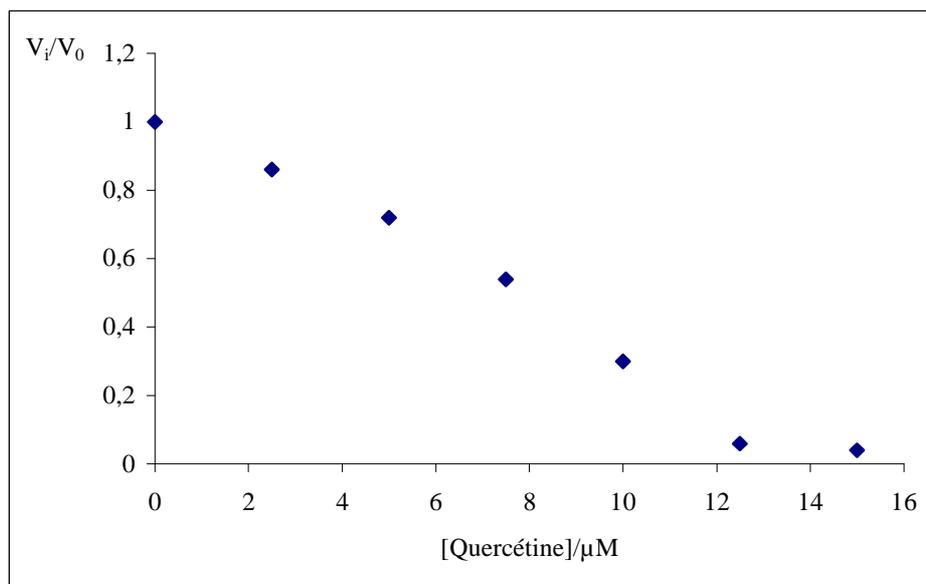
**Figure 5.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C de catéchine.  $\blacklozenge$  C = 0  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$  C = 7,5  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$  C = 10  $\mu\text{M}$ ,  $\bullet$  C = 12,5  $\mu\text{M}$ ,  $*$  C = 17,5  $\mu\text{M}$ .

D'après les tracés de  $A(234 \text{ nm}) = f(t)$ , des différences assez nettes apparaissent selon le polyphénol considéré. Après l'ajout de la rutine, la vitesse de peroxydation demeure quasi-constante mais se trouve réduite par rapport à la vitesse initiale de peroxydation (**Figure 4**). En présence de quercétine, on observe une pseudo phase de latence (peroxydation très lente) puis une nette accélération de la peroxydation qui tend à ramener la vitesse de peroxydation à sa valeur initiale ( $V_0$ ). Ainsi, la quercétine semble plus rapidement consommée que la rutine. Dans le cas de la catéchine, la vitesse de peroxydation reste proche de la vitesse initiale de peroxydation non inhibée sauf à forte concentration d'antioxydant. La catéchine semble un inhibiteur de peroxydation médiocre dans ces conditions.

Le tracé du rapport  $V_i/V_0$  (**Figures 6 et 7**) en fonction de la concentration d'antioxydant nous permet de déterminer la valeur du  $IC_{50}$  de chaque composé.



**Figure 6.** Tracé du rapport de la vitesse de peroxydation inhibée sur la vitesse de peroxydation non inhibée en fonction de la concentration de rutine.



**Figure 7.** Tracé du rapport de la vitesse de peroxydation inhibée sur la vitesse de peroxydation non inhibée en fonction de la concentration de la quercétine.

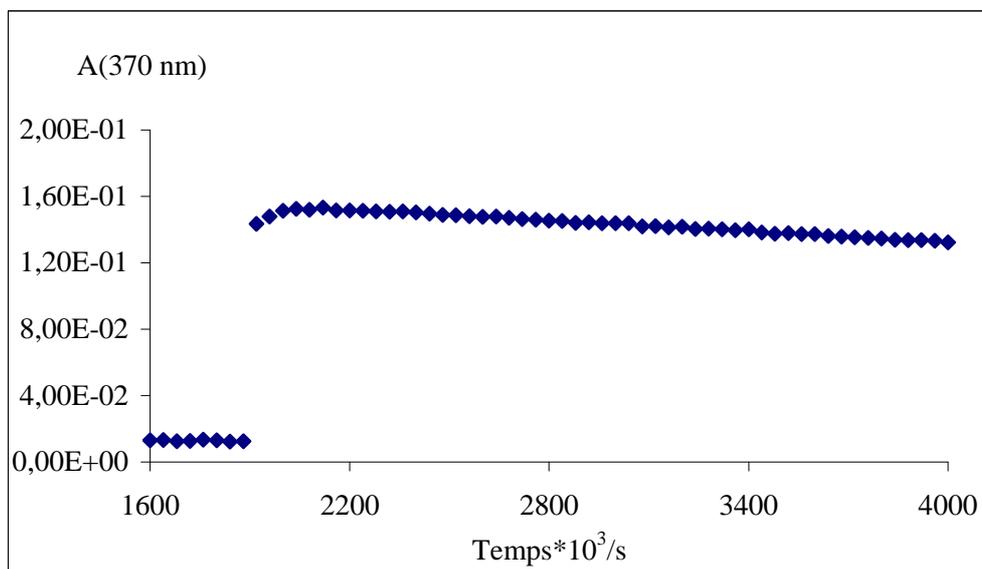
**Tableau 1.** Valeurs de  $IC_{50}$  pour l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (Tween 20 / tampon phosphate, pH 7.4, 37°C) initiée par  $H_2O_2$  (5 mM) et  $Cu^{II}$  (50  $\mu\text{M}$ ).

Antioxydant	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Rutine	1,1
Quercétine	6,9
Catéchine	10,4
Acide gallique	a)
Acide caféique	19,3

a) effet pro-oxydant

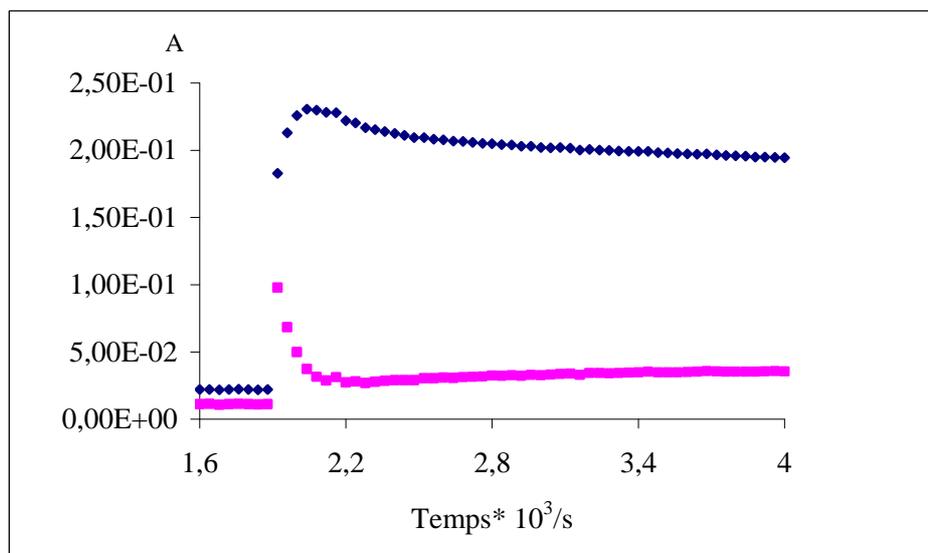
De manière assez inattendue, la complexation rutine- $Cu^{II}$  semble marginale dans le système. En effet, c'est bien la forme libre de la rutine qui est détectée et lentement consommée au cours de l'inhibition (**Figure 8**). Il semble donc que la complexation des ions du cuivre par les groupements carboxylates des anions linoléates et par les têtes polaires des molécules de Tween 20 à la surface des micelles soit plus forte que la complexation par la rutine. Ainsi, c'est la rutine libre qui est responsable du piégeage des radicaux oxygénés. L'absence de phase de latence nette suggère que l'inhibition procède par réduction des

espèces initiatrices de la peroxydation en accord avec le fort caractère hydrophile de la rutine qui ne permet vraisemblablement pas une insertion du polyphénol dans les micelles.



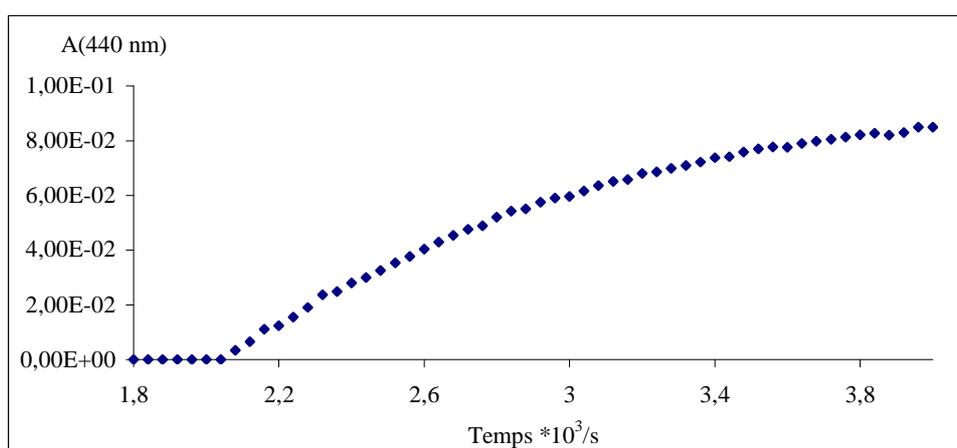
**Figure 8.** Inhibition par la rutine (7,5  $\mu\text{M}$ ) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 370 nm de la consommation de la rutine libre.

Nous avons déjà démontré que la quercétine est le polyphénol de la série étudiée qui s'oxyde le plus vite en présence des ions du cuivre dans un tampon phosphate neutre (**Chapitre 2-2**). La **figure 9** confirme qu'à la différence de la rutine, la complexation de la quercétine persiste dans le milieu et que l'oxydation du flavonol est rapide. L'inhibition observée met donc en jeu les produits d'oxydation de la quercétine et/ou leurs complexes avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . C'est sans doute pourquoi l'inhibition par la quercétine est plus faible que celle observée avec la rutine.



**Figure 9.** Inhibition par la quercétine (12,5  $\mu\text{M}$ ) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C).  $\blacklozenge$  produit d'oxydation (détection à 330 nm),  $\blacksquare$  complexe quercétine- $\text{Cu}^{\text{II}}$  (détection à 450 nm).

Dans le cas de la catéchine, l'inhibition est modeste et on observe une accumulation rapide des dimères colorés (**Figure 10**). On peut donc admettre que la catéchine reste essentiellement localisée dans la phase aqueuse où elle subit une autoxydation rapide en des dimères qui participent peu à l'inhibition de la peroxydation lipidique.

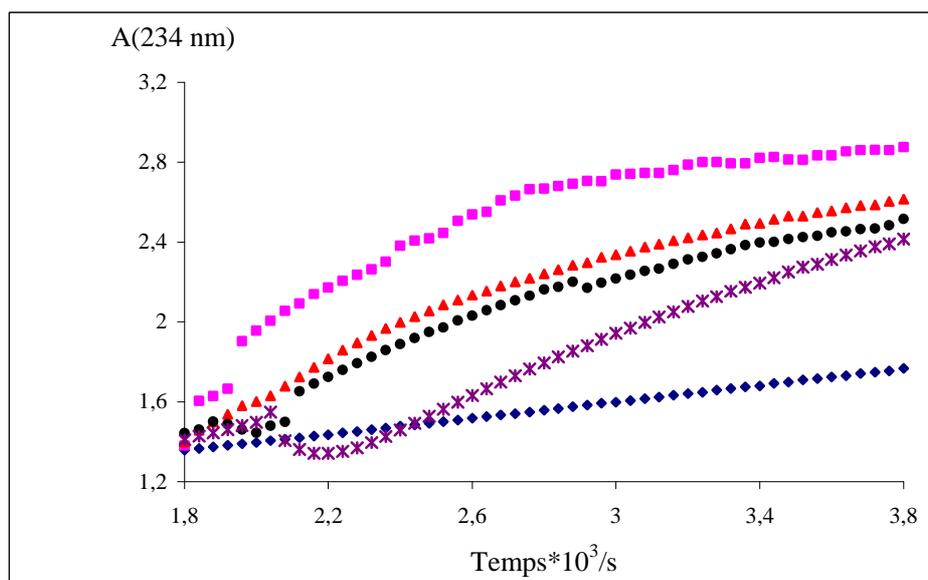


**Figure 10.** Inhibition par la catéchine (10  $\mu\text{M}$ ) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 440 nm de l'accumulation des produits d'oxydation de la catéchine.

### 3- 2-2 Inhibition par les acides phénoliques

Les figures 11 et 12 montrent que les comportements de l'acide gallique et de l'acide caféique dans l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique sont différents.

Dans le cas de l'acide gallique, la vitesse de peroxydation est plus élevée en présence du polyphénol. On peut donc conclure que l'acide gallique stimule la production des radicaux initiateurs probablement par réduction de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , lequel participe ensuite à la coupure homolytique des hydroperoxydes ( $\text{ROOH}$  avec  $\text{R} = \text{H}$  et/ou  $\text{L}$ ). Il s'agit donc d'un effet pro-oxydant.



**Figure 11.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C d'acide gallique. ◆ C = 0  $\mu\text{M}$ , ■ C = 7,5  $\mu\text{M}$ , ▲ C = 10  $\mu\text{M}$ , ● C = 12,5  $\mu\text{M}$ , \* C = 17,5  $\mu\text{M}$ .

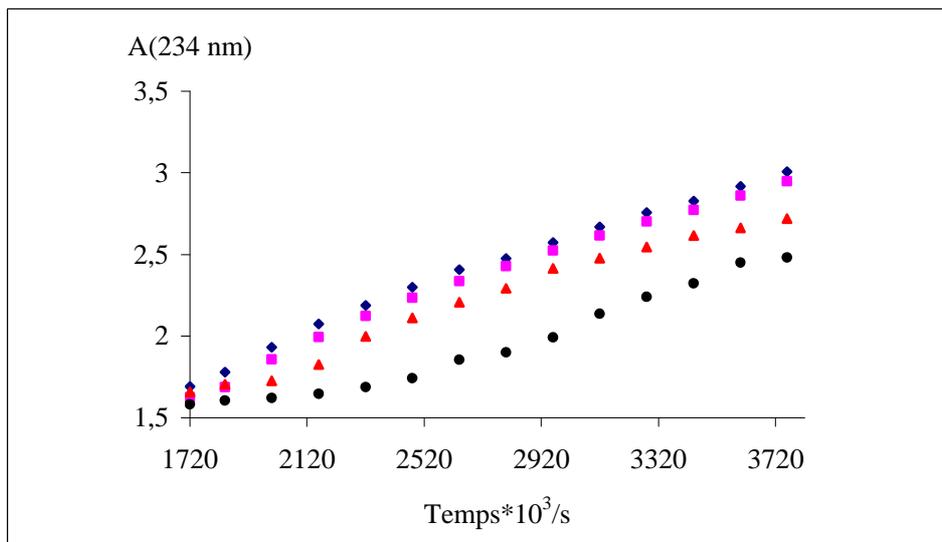


Figure 12. Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C d'acide caféique.  $\blacklozenge$  C = 0  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$  C = 5  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$  C = 15  $\mu\text{M}$ ,  $\bullet$  C = 17,5  $\mu\text{M}$ .

Au cours de la peroxydation, l'acide gallique est rapidement consommé comme le montre la croissance rapide de A(295 nm) vers un palier (Figure 13).

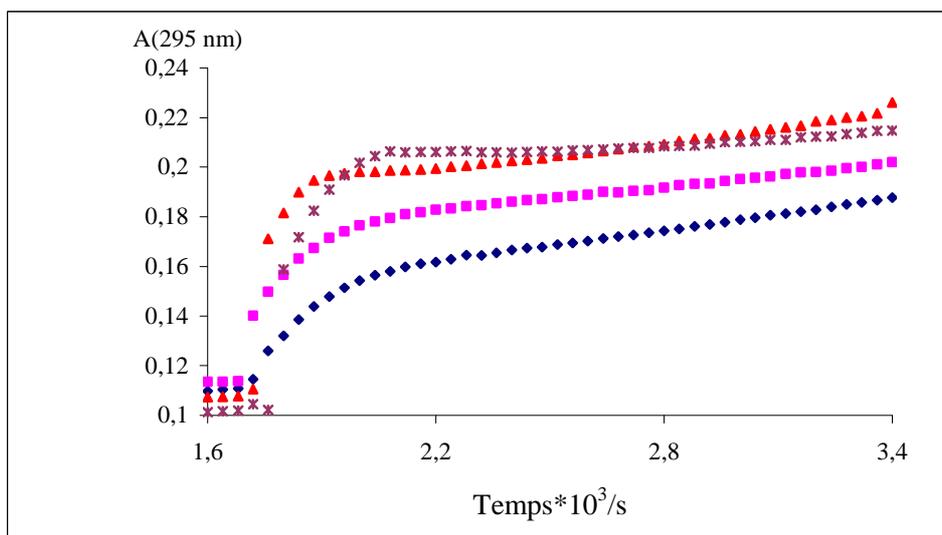
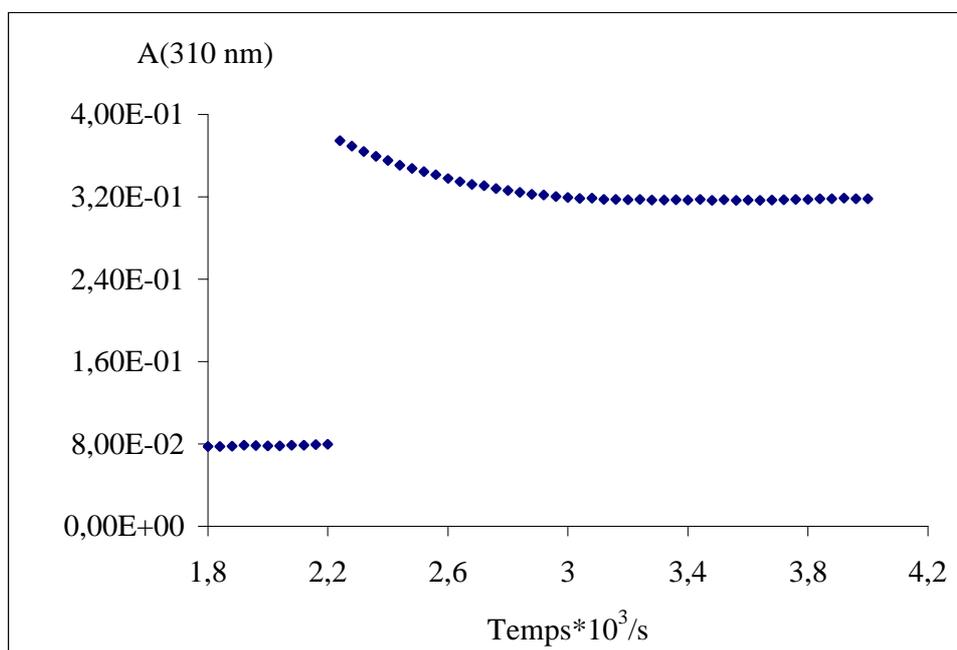


Figure 13. Peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 295 nm de l'accumulation des produits d'oxydation de l'acide gallique.  $\blacklozenge$  C = 5  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$  C = 10  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$  C = 12,5  $\mu\text{M}$ , \* C = 15  $\mu\text{M}$ .

Nos résultats sont en bon accord avec une étude de la capacité de l'acide gallique à inhiber ou stimuler la production de radicaux par la réaction de Fenton en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .<sup>32</sup>

Quant au comportement de l'acide caféique, il est proche de celui de la quercétine. La figure 13 montre que l'inhibition par l'acide caféique de la peroxydation de l'acide linoléique est modeste et ne se manifeste qu'à fortes concentrations ( $C > 15\mu\text{M}$ ). On observe alors une phase de latente puis une nette accélération et un retour de la vitesse de peroxydation à sa vitesse initiale avant l'ajout de l'antioxydant. Cette évolution s'accompagne de la consommation de l'antioxydant qui est principalement détecté sous forme libre (**Figure 14**).

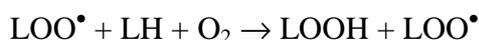
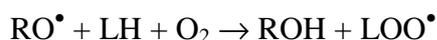
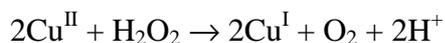


**Figure 14.** Inhibition par l'acide caféique (10  $\mu\text{M}$ ) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 310 nm de la consommation de l'acide caféique.

<sup>32</sup> Strlic M., et coll., 2002, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6313-6317

### 3-3 Conclusion

On peut considérer que la peroxydation de l'acide linoléique induite par  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$  obéit au mécanisme suivant :



En présence d'un grand excès de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , on pouvait supposer une complexation totale des polyphénols. Il semble que ce ne soit le cas que de la quercétine dont le groupement 3-hydroxy-4-oxo a assez d'affinité pour  $\text{Cu}^{\text{II}}$  pour complexer cet ion malgré la compétition des groupements complexants en fort excès à la surface des micelles (groupements sorbitol et éthylèneglycol du tween 20, groupement carboxylate de l'anion linoléate). En revanche, la rutine et l'acide caféique restent sous forme libre, ce qui indique que leur groupement catéchol n'a pas assez d'affinité pour  $\text{Cu}^{\text{II}}$  pour former un complexe dans ces conditions. C'est probablement aussi le cas de l'acide gallique et de la catéchine. On peut donc distinguer 3 comportements selon l'antioxydant considéré :

- La rutine, l'acide caféique et la catéchine inhibent la peroxydation sous forme libre, c'est-à-dire en réduisant les radicaux impliqués dans le mécanisme. Compte tenu de leur caractère hydrophile, il est probable que l'inhibition procède surtout par réduction des radicaux  $\text{HO}^\bullet$  produits à l'interface des micelles par réaction de Fenton plutôt que par inhibition de la propagation par réduction directe des radicaux  $\text{LOO}^\bullet$ .
- La quercétine forme un complexe avec  $\text{Cu}^{\text{II}}$  puis s'oxyde rapidement avec réduction probable de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$  selon le mécanisme déjà mis en évidence en l'absence de lipide. Ainsi, ce seraient les produits d'oxydation de la quercétine et leurs complexes de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  qui seraient responsables de l'inhibition assez modeste (plus faible qu'avec la rutine) qui est observée.

- L'acide gallique est assez réducteur pour réduire rapidement  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . A la différence de la quercétine, la réduction pourrait procéder par sphère externe (sans complexation préalable) et produirait des ions  $\text{Cu}^{\text{I}}$  libres susceptibles de participer à la réaction de Fenton. Il y a donc accélération globale de la peroxydation (effet pro-oxydant).

Dans l'évaluation des antioxydants pour leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique initiée par les ions des métaux de transition, il est clair que le classement des antioxydants dépend de nombreux facteurs selon le système considéré : pouvoir réducteur de l'antioxydant vis-à-vis des ions métalliques (transfert d'électrons) et des radicaux oxygénés (transfert d'électrons et/ou d'atomes H), sensibilité de l'antioxydant à l'autoxydation, stabilité des complexes métalliques de l'antioxydant et compétition avec d'autres agents complexants présents dans le milieu, partition de l'antioxydant entre phase aqueuse et phase lipidique. Il est donc important d'étudier ces différents phénomènes à l'aide de systèmes plus simples avant de tenter d'interpréter la capacité antioxydante observée dans le système complet.

**Références bibliographiques**

- [1] Berset C., Cuvelier M-E., 1997. *Adria*, 4-13.
- [2] Sanchez-Alonso I., Jimenez-Escrig A., Saura-Calixto F., Borderias A. J., 2007. *Food Chem.*, 101,372-378.
- [3] Kanner J., Lapidot T., 2001. *Free Radical Biol. Med.*, 31,1388-1395.
- [4] Pamplona R, Naudí A., Gavín R, Pastrana M.A, Sajnani G, Ilieva E. V., del Río, Manuel J.A. Portero-Otín, Ferrer I, Requena J.R., 2008. *Free Radical Bio. Med.*, 45, 1159-1166.
- [5] Mircoli L., Negrini M., Turri C., Protasoni G., Brusoni B., Seregni R. 2008. *Nutr. Metab. Cardiovas. Diseases*, 18, Supplement S51-S52.
- [6] Rehman A., Nourooz-Zadeh J., Möller W, Tritschler H, Pereira P., Halliwell B, 1999. *FEBS Lett.*, 448, 120-122.
- [7] Genestra M., 2007. *Cell. Signalling*, 19, 1807-1819.
- [8] Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., 2007. *Prog. Lipid Res.*, 46, 244-282.
- [9] Koteish A., Roskams T, Yang S., Huang J., Anne D., Devos R., Verslype C., Mae Diehl A., 2003. *Gastroenterology*, 124, Supplement 1, A689.
- [10] Black P.H., 2002. *Brain Behav. Immun.*, 16, 622-653.
- [11] Mandel S., Amit T., Bar-Am O, Youdim M. B.H., 2007. *Prog. Neurobiol.*, 82, 348-360.
- [12] Mandel S., Youdim M.B. H., 2004. *Free Radical Bio. Med.*, 37, 304-317.
- [13] Sukkar S.G., Rossi E., 2004. *Autoimmunity Rev.*, 3, 199-206.
- [14] Boskou D., 2006. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 505-512.
- [15] Stangeland T., Remberg S. F., Lye K. A. 2009. *Food Chem.*, 113, 85-91.
- [16] Van Acker S.A. B. E., Plemper Van Balen G., Van den Berg D-J , Bast A., Wim J. F. van der Vijgh, 1997. *Biochem.Pharmacol.*, 56, 935-943.
- [17] Saskia A. B. E. Van Acker, Dirk-jan Van Den Berg, Michel N. J. L. Tromp, Désirée H. Griffioen, Wout P. Van Bennekom, Wim J. F. Van Der, 1996. *Free Radical Bio. Med.*, 20, 331-342.
- [18] Tuba Ak, İlhami Gülçin, 2008. *Chem.-Biol. Interact.*, 174, 27-37.
- [19] Dangles O., Dufour C., 2008. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 67-87.
- [20] Soobrattee M.A., Neergheen, V.S. Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T., 2005. *Mut. Res. –Fund. Mol. M. Mutagenesis*, 579, 200-213.
- [21] Berset C. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. *Edit Lavoisier*, 264-293.
- [22] Natalia Fagali N., Catalá A., 2008. *Biophys. Chem.*, 137, 56-62.
- [23] İlhami Gülçin, 2006. *Toxicology*, 217, 213-220.

- [24] Kanner J., Lapidot T., 2001. *Free Radical Bio. Med.*, 31, 1388–1395.
- [25] Lotito S.B., Frei B., 2006. *Free Radical Bio. Med.*, 41, 1727-1746.
- [26] Lotito S.B., Frei B., 2004. *Free Radical Bio. Med.*, 37, 251-258.
- [27] Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F., 2001. *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 747-751.
- [28] Gardès-Albert M., Jore D., 2005. “*Radicaux libres et Stress oxydant*”, *Aspects Biologiques et Pathologiques*, Lavoisier, 1-23.
- [29] Lucarini M., Mugnaini V., Pedulli G. F., 2002. *J. Org. Chem.*, 67, 928-931.
- [30] Mira L., Fernandez MT., Santos M., Rocha R., Florencio MH., Jennings KR., 2002. *Free Radical Res.*, 36,1199–1208.
- [31] Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 615-622.
- [32] Strlic M., Radovic T., Kolar J., Pilhlar B., 2002, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6313-6317.

## **TROISIEME PARTIE**

**Étude comparée de l'extraction des polyphénols  
du thé vert sous chauffage micro-ondes et  
chauffage conventionnel**

---

*CHAPITRE 1*  
*Matériels & Méthodes*

---

Ce chapitre définit l'ensemble des réactifs, matériels, et méthodes analytiques utilisés au cours de ce travail.

### 1-1 Réactifs et solvants

- Thé vert « *Caravane* » est un produit de la Société Marocaine du Thé et du Sucre (SMS Thé, Maroc).
- Réactif de Folin-Ciocalteu (Fluka, France).
- Les standards (extra synthèse, France)
- L'acide formique est de chez Prolabo, France. L'acétonitrile de chez Merck, Allemagne.
- Eau de résistivité 18,2  $\Omega$  (Merck, Darmstadt).

### 1-2 Matériels et méthodes

**Spectroscopie UV-visible** : les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre UV-visible à barrettes diodes (HP 8453).

**CLHP-UV-Visible** : les analyses de chromatographie liquide haute performance sont réalisées sur une station *Waters* constituée d'une pompe 600 E, d'un détecteur à barrettes de photodiodes 996 et d'une station de pilotage *Empower 2*.

La séparation est menée à l'aide de deux phases stationnaires. La première est une colonne particulière « *Purospher Star* » RP-18e (Merk, Allemagne) (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m de diamètre de particules) et d'une colonne de garde ayant les mêmes caractéristiques.

Les solvants utilisés sont : (A) eau / acide formique (99 :1) et (B) acétonitrile. Le volume injecté est de 20  $\mu$ l après plusieurs filtrations successives à travers une membrane *Whatman* 0,45  $\mu$ M TF et *Whatman* 0,2  $\mu$ M TF. La détection est menée à 254 nm.

**Séparation sur colonne *Purospher Star*** : le gradient est un gradient linéaire avec un débit de 1,2 ml/min dont les proportions en fonction du temps sont les suivantes :

**Tableau 1** : Gradient d'élution

Temps (min)	Débit (ml /min)	A (%)	B (%)
0	1,20	99,0	1,0
5	1,20	95,0	5,0
12.00	1,20	80,0	20,0
25.00	1,20	70,0	30,0

**CLHP-SM :** les analyses de chromatographie liquide haute performance couplées à la spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes *Hewlett Packard* 1100 muni d'une pompe *Hewlett Packard* 1100, avec un débit 1,2 ml/min et d'une colonne RP-18e (*PurospherStar*), couplée avec un spectromètre de masse *Micromass Platform*, utilisé en mode ESI<sup>-</sup> ou ESI<sup>+</sup>, avec une température de désolvatation de 80°C, un débit d'azote de 300 L/h et une tension de 25 V. Le volume injecté est de 20 µL. Les analyses ont été menées dans les mêmes conditions de gradient que les analyses par CLHP-UV-visible. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel *Masslynx* version 3.4.

**Four micro-ondes:** les préparations d'extraits de thé assistées par micro-ondes ont été réalisées dans un four micro-onde du laboratoire Milestone «DryDist». C'est un réacteur multi-mode avec un maximum de puissance de 1000 W par incrément de 10 W. La cavité est recouverte par PTFE : 35 cm×35 cm. Ce four est connecté à un logiciel de contrôle « *easy-wave* » pour suivre la durée, la température et la puissance durant l'expérience. La température du four est suivie par un thermocouple de type ATC-300 et/ou par une sonde infra-rouge interne à la cavité.

### 1-3 Méthodes expérimentales

**Extraction à l'eau par chauffage classique à différentes températures:** 6g de thé Caravane ont été ajoutés à 120 ml d'eau à différentes températures (80°C et 100°C) sous agitation. Des extraits issus de l'infusion sont prélevés pour mesurer l'absorbance aux longueurs d'ondes caractéristiques des polyphénols du thé vert: 280 nm (phénols totaux), 330 nm (acides hydroxycinamiques) et 350 nm (flavonols).

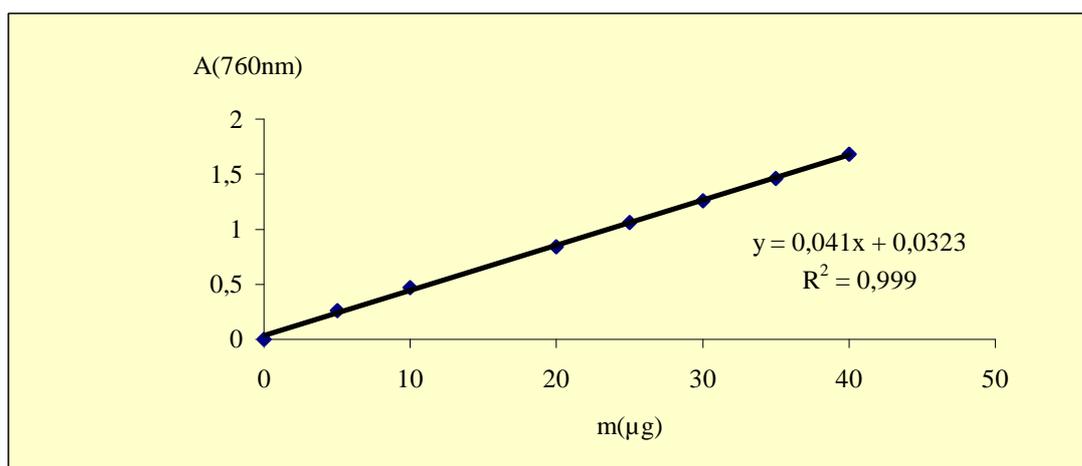
**Extraction à l'eau par chauffage micro-ondes à différentes températures:** 6g de thé Caravane ont été extraits à l'eau à 80°C ou 100°C sous micro-onde (480 W). L'absorbance aux différentes longueurs d'onde a été mesurée en fonction du temps (Figure 1).



**Figure 1.** Extraction des polyphénols du thé caravane sous chauffage micro-ondes

**Dosage des phénols totaux :** Le dosage des phénols totaux (TPC) pour chaque extrait du thé a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu.<sup>1</sup> Ce dosage repose sur l'oxydation en milieu basique des fonctions oxydables de polyphénols par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite possède une absorption maximale au environ de 760 nm. Elle est proportionnelle au taux des composés phénoliques. L'étalon choisi est l'acide gallique (AG). Les concentrations dans les échantillons sont obtenues en mg équivalent AG l<sup>-1</sup>. La courbe de calibration est illustrée dans la figure 2.

<sup>1</sup> Montreau, F. R.,1972. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *Connaissance de la vigne et du vin*, 6: 397-404.



**Figure 2.** Courbe étalon de l'absorbance du complexe molybdène tungstène phénolate (760 nm) en fonction de la masse gallique en µg

Par la suite le dosage a été effectué selon la méthode décrite en :<sup>2</sup> à 5 µl d'extrait du thé, on ajoute 1,70 ml d'eau et 0,25 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 3 fois. Après trois minutes, 0,50 ml d'une solution à 20 % de carbonate de sodium est ajoutée.

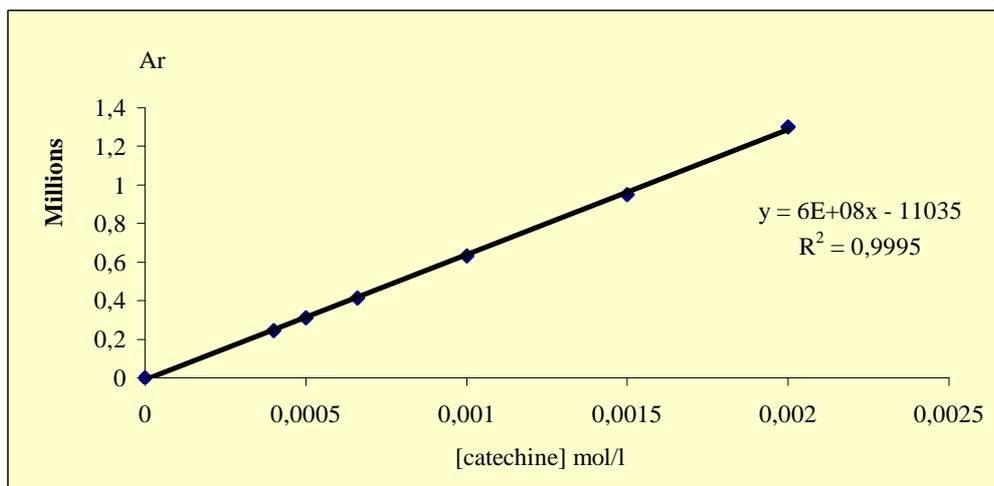
Les tubes sont immédiatement agités puis incubés à une température de 40 °C pendant 30 minutes. La densité optique du complexe formé est lue à 760 nm. Les teneurs des phénols totaux sont exprimées en milligramme d'acide gallique par gramme de thé sec.

**Dosage externe par CLHP :** les dosages des principaux composés phénoliques sont effectués par étalonnage externe.

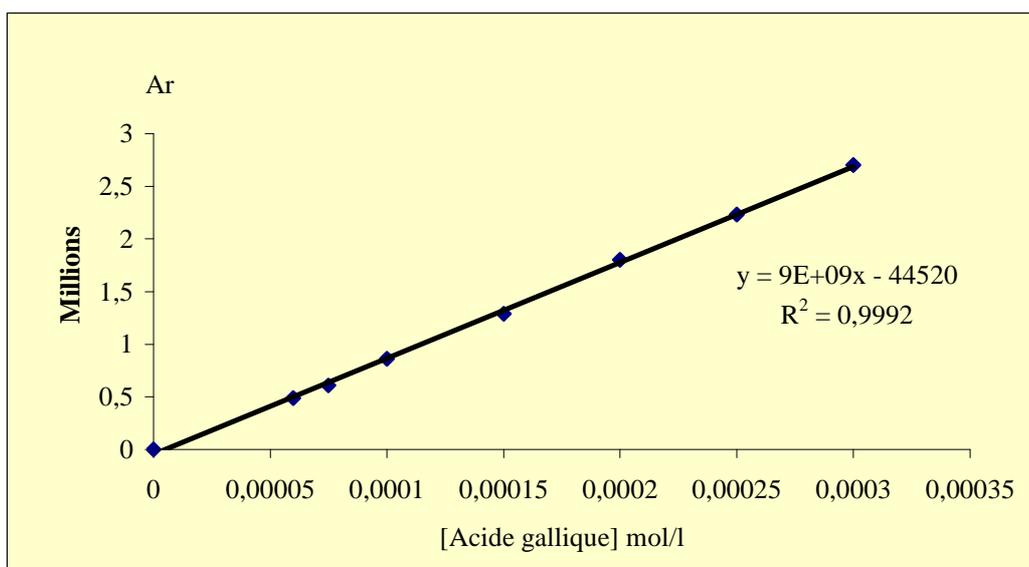
La concentration des flavanols, acides phénoliques et flavonols présents dans le thé vert est mesurée par la courbe d'étalonnage respectivement de la catéchine, de l'acide gallique et de la rutine :

- La courbe d'étalonnage de la catéchine est déterminée par variation de la concentration de la catéchine fraîchement préparée dans l'eau MQ (**Figure 3**)
- La courbe d'étalonnage de la catéchine est tracée par variation de la concentration de l'acide gallique fraîchement préparé dans l'eau (**Figure 4**)
- La courbe d'étalonnage de la rutine est tracée par variation de la concentration de la rutine préparée dans le mélange (H<sub>2</sub>O/MeOH : 98 /2) (**Figure 5**). L'addition de 2% de méthanol dans l'eau est effectuée pour solubiliser la rutine.

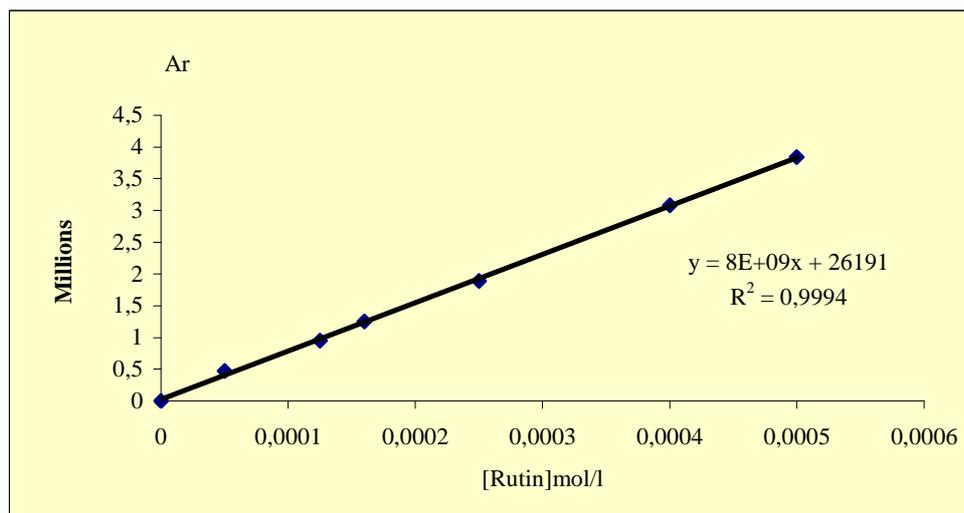
<sup>2</sup> Zheng. W, Wang. S.Y, 2001. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5165-5170.



**Figure 3.** Courbe d'étalonnage de la catéchine



**Figure 4.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



**Figure 5.** Courbe d'étalonnage de la rutine

**Inhibition de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique par des extraits du thé vert (Caravane):** nous avons suivi le même protocole expérimental du chapitre I de la deuxième partie (p. 78). La peroxydation de l'acide linoléique est initiée par  $H_2O_2/Cu^{II}$  dans le tampon phosphate pH 7,4, 37°C. Après établissement d'une vitesse constante de peroxydation non inhibée à  $\lambda = 234$  nm, longueur d'onde des hydroperoxydes, l'antioxydant ( $20\text{ mm}^3$ ) d'extrait de thé fraîchement préparé, est ajouté.

#### Références bibliographiques.

- [1] Montreau, F. R., 1972. *Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin- Ciocalteu. Connaissance de la vigne et du vin*, 6: 397-404.
- [2] Zheng. W, Wang. S.Y, 2001. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5165-5170.

---

## *CHAPITRE 2*

*Étude comparée de l'extraction des  
polyphénols du thé vert sous chauffage  
micro-ondes et chauffage conventionnel*

---

## CHAPITRE 2. Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel

**Résumé** – Un intérêt grandissant se porte sur l'extraction de métabolites secondaires de plantes sous chauffage micro-ondes. Dans ce chapitre, l'extraction des polyphénols du thé vert sous micro-ondes a été étudiée en fonction de la durée d'extraction et de la température (80 et 100°C) par spectroscopie UV-visible et CLHP. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par chauffage conventionnel. Une meilleure efficacité de l'extraction sous micro-ondes à 80°C ainsi qu'une bonne reproductibilité des résultats ont été observées.

À l'heure où l'efficacité est devenue une des caractéristiques principales d'une bonne technique d'extraction, les travaux sur l'extraction assistée par micro-ondes ne cessent de croître. La chimie analytique a permis ces dernières années de réduire considérablement les temps d'analyses grâce au développement des techniques chromatographiques en partie. L'extraction solide-liquide à laquelle nous nous intéressons dans le cadre d'extraction des polyphénols du thé vert, se devait de réduire elle aussi ces durées, tout en conservant son efficacité en terme cinétique ou de rendement. Les procédés d'extractions assistées par micro-ondes ont apporté une solution de choix. Grâce à un chauffage sélectif, sans inertie, les micro-ondes combinées à des procédés d'extraction conventionnels ont permis de remédier aux problèmes des temps d'extraction souvent trop longs.

Cette nouvelle technique a fait beaucoup parler d'elle par les spécialistes des procédés d'extraction. Récemment, l'extraction assistée par micro-ondes est entreprise pour extraire des molécules bio-actives<sup>1</sup>, des huiles essentielles<sup>2</sup>, des acides gras<sup>3</sup>, des substances polluantes dans l'eau ou le sol<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Yuegang Z. et coll., 2007. *J. Chromatography A*, 1148, 211-218.

<sup>2</sup> Lucchesi M. E et coll., 2004. *J. Chromatography A*, 1043, 323-327.

<sup>3</sup> Young J.C, 1995. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2904-2910.

<sup>4</sup> Vidal L. et coll., 2007. *Anal. Chim. Acta*, 592, 9-15.

Les travaux recensés sur l'extraction des polyphénols du thé vert assistée par micro-onde (MO) sont bien comptés.<sup>5,6</sup> Sur cette base de donnée, nous allons développer et optimiser cette nouvelle technique afin d'extraire les polyphénols du thé vert. L'optimisation de l'extraction par ce nouveau procédé (MO) ainsi que sa comparaison avec l'extraction par chauffage conventionnel ont été réalisés (CC).

## 2-1 Généralité sur les Micro-ondes

### 2-1-1 Définition

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière. Elles sont caractérisées par une fréquence comprise entre 300 MHz et 30 GHz. Les longueurs d'ondes associées s'étalent de 1 millimètre à 1 mètre. Sur le spectre électromagnétique, elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges. La fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz correspondant à la fréquence de la majorité des magnétrons des fours micro-ondes de cuisine ayant une puissance de 600 à 1000 Watts et une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm.

### 2-1-2 Equipement d'un four micro-ondes

Les principaux éléments d'un équipement four micro-ondes sont :

- Le générateur micro-ondes ;
- Le guide d'ondes
- La cavité micro-ondes

Le magnétron est l'élément du générateur qui transforme l'énergie électrique en énergie micro-ondes. Il est constitué d'un tube sous vide dans lequel sont disposés deux électrodes entre lesquelles est appliquée une différence de potentiel élevée. Un aimant permanent ou un électroaimant produit un champ magnétique continu perpendiculaire au champ électrique appliqué entre les deux électrodes.

Le guide d'onde permet de convoyer et de guider les ondes émises par le magnétron. Le guide est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique dont la section droite est limitée par un contour fermé pouvant contenir d'autres contours. Sa génératrice sera choisie comme axe de propagation. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode TM (transverse magnétique), ou bien, le mode TE (transverse électrique).

---

<sup>5</sup> Gulati A. et coll., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4764-4768

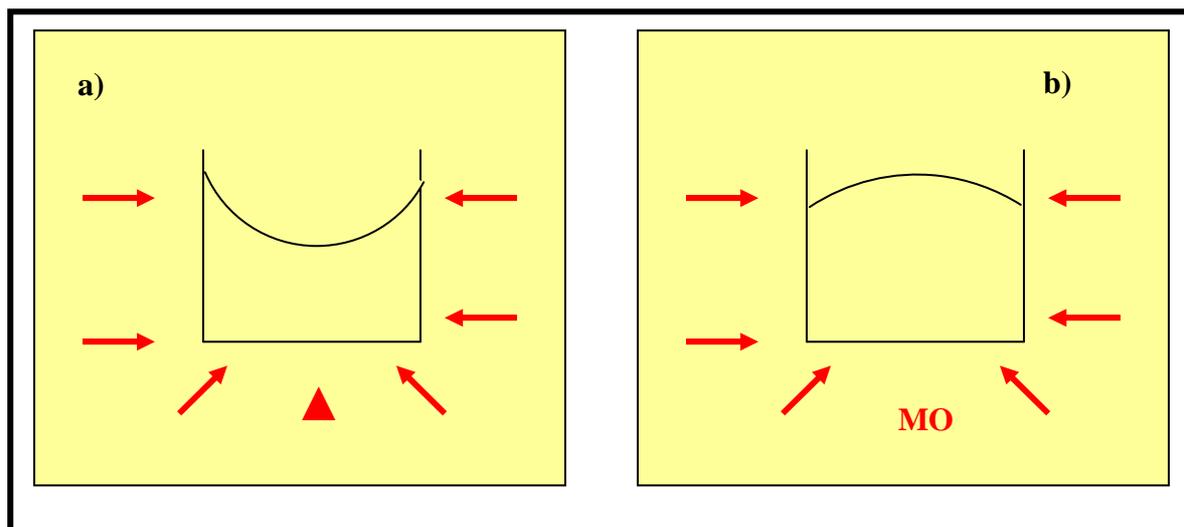
<sup>6</sup> Chan E.W.C. et coll., 2007. *J. Food Chem.*, 102, 1214-1222

L'applicateur permet le traitement des produits par les micro-ondes. La configuration d'un applicateur dépend principalement des caractéristiques diélectriques du produit à traiter, du mode d'extraction, de la nécessité ou non de chauffer le produit par conduction à partir d'une enveloppe ou de travailler sous vide. Deux grandes catégories d'applicateurs existent : les applicateurs monomodes et les applicateurs multimodes. Un applicateur est dit monomode lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une configuration de champ. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à des ondes stationnaires. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis du champ électrique, il est cependant réservé aux matériaux de petit volume. L'applicateur multimode consiste en une cavité suffisamment grande afin qu'il existe plusieurs types de configurations de champ. Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. Les industriels préfèrent donc utiliser des applicateurs multimodes pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu.

### 2-1- 3 Chauffage par four micro-ondes

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inverse par rapport au chauffage conventionnel. Le transfert de chaleur nécessaire à une extraction solide-liquide traditionnelle est obtenu en général par conduction à partir d'une paroi chaude, convection dans le milieu d'extraction. Il s'agit plus souvent d'une convection forcée par agitation, puis conduction dans la matrice solide, la chaleur pénétrant lentement dans le produit à chauffer. Il s'établit dans celui-ci un gradient de température, avec la température la plus basse au fond du produit.

Sous chauffage micro-onde, le volume traité devient lui-même source d'énergie. La chaleur se dégage de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que le milieu du réacteur dans le cas de chauffage micro-onde, et inversement pour le cas de chauffage classique par double enveloppe, plaque chauffante et flamme. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection n'ont qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. Des surchauffes locales peuvent également se produire. La figure (1) illustre les deux modes de chauffage.



**Figure 1.** Gradient de température au sein d'un composé solide soumis :  
a) au chauffage conventionnel par conduction ;  
b) à l'exposition aux micro-ondes.

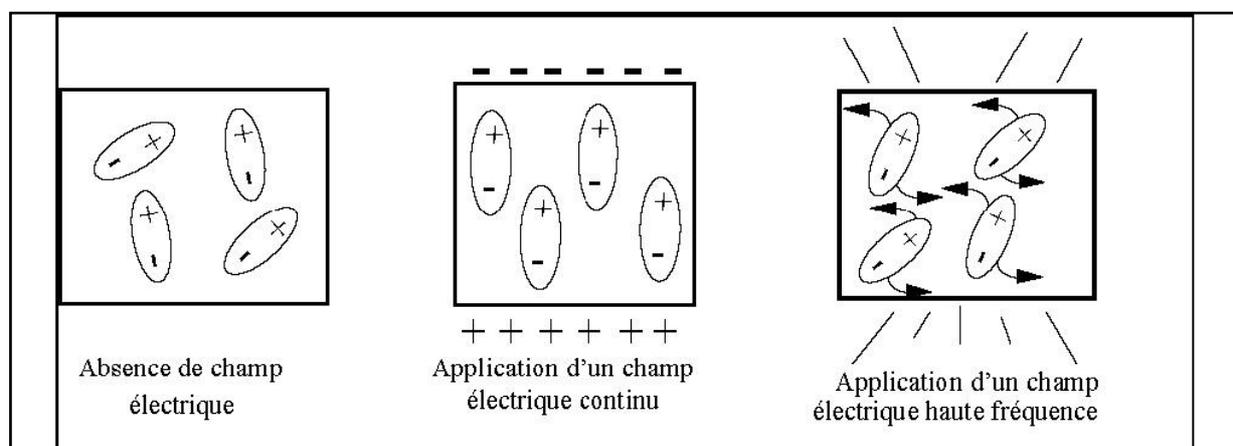
#### 2-1- 4 Interactions micro-ondes- matière

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires telles que l'eau, possèdent une partie chargée positivement et l'autre partie négativement. Ces molécules forment donc des dipôles électriques.

En l'absence du champ électrique, l'orientation de ces dipôles est plus ou moins au hasard sous l'action de l'agitation thermique du milieu. En présence de champ électrique, les dipôles s'orientent dans le sens du champ électrique. Plus le champ électrique est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a d'importance. Dans un champ électrique alternatif, l'orientation de chaque dipôle change à alternance du sens du champ électrique.

L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de *Van der Waals*). Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur. La dissipation d'énergie par le produit peut être maximale si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence de relaxation. Le phénomène de relaxation correspond à l'apparition d'un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et

celui des dipôles. Les fréquences micro-ondes étant imposées, l'échauffement d'un produit avec une efficacité maximale est exceptionnel. Dans ce cas, une grande partie des molécules soumises à l'action du champ micro-ondes ne tourne pas avec le changement alternatif du champ mais frissonne comme le montre la figure 2.



**Figure 2.** Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes.

### 2-1-5 Etude bibliographique sur l'extraction assistée par micro-ondes des polyphénols du thé vert

Une grande partie des travaux concernant le four micro-ondes et le thé vert, est rapportée sur l'inactivation des enzymes présents dans les feuilles de thé fraîches ou sèches.

Seung-Cheol Lee et coll. (2006)<sup>7</sup>, Sharma Vaishali et coll (2004)<sup>8</sup>, Gulati Ashu et coll. (2003)<sup>9</sup> et Mi-Ji Kim et coll. (2002), ont montré que le traitement du thé par micro-ondes permet d'obtenir une élévation rapide de la température à l'intérieure des feuilles « *Camilla sinensis* » et de diminuer ou de supprimer l'activité enzymatique « polyphénols oxydase » (PPO) tout en limitant les réactions de dégradation thermique des catéchines à extraire. Cette application a été réalisée à l'échelle industrielle pour garder la qualité de thé vert et éviter sa transformation en thé noir.

L'extraction des polyphénols de thé vert assistée par micro-onde a fait l'objet de deux travaux :

Le premier est celui de Xuejun Pan et coll. (2003)<sup>5</sup>. Ils ont réalisé une étude qui a pour but le développement, la validation et l'optimisation de cette nouvelle technique. Ils ont testé tout d'abord différents solvants d'extraction des antioxydants du thé vert par le four micro-ondes et confirmé que l'extractant « Ethanol/Eau (1/1) » est le plus efficace et le plus sélectif

<sup>7</sup> Seung-Cheol Lee et coll., 2006. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 399-403.

<sup>8</sup> Sharma Vaishali et coll., 2005. *J. Food Chem.*, 93, 141-148.

<sup>9</sup> Gulati A. et coll., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4764-4768.

pour l'extraction des polyphénols et de la caféine du thé vert par micro-ondes (90°C). Ils ont ensuite comparé ce nouveau procédé par chauffage conventionnel et extraction par ultrason. Ils ont constaté que l'extraction assistée par micro-onde est plus rapide (4 min) que le chauffage conventionnel (45 min) et que l'ultrason (90 min). Enfin, ils ont conclu que l'extraction assistée par micro-ondes des polyphénols et de la caféine du thé vert est plus rapide, plus sélectif et plus efficace.

Le deuxième travail est celui de Chan E.W.C et coll. (2007) <sup>6</sup>. Ils ont commencé par tester l'efficacité d'extraction des polyphénols du thé vert par l'eau ou le méthanol en utilisant le four micro-onde. Après une heure d'extraction, ils ont dosé les phénols totaux par le réactif de *Folin*, puis ils ont testé l'activité antioxydante de l'extrait par le DPPH. Ils ont démontré que les valeurs de dosage des phénols totaux et les valeurs d'activité antioxydante de l'extrait préparé par l'eau sont plus faibles que celles du méthanol. Enfin ils ont confirmé que le méthanol est le plus efficace et le plus sélectif pour extraire les polyphénols du thé vert par micro-ondes.

De cette étude bibliographique, nous avons remarqué l'absence des travaux de couplage des techniques de caractérisation telles que la chromatographie en phase liquide avec cette nouvelle technique d'extraction.

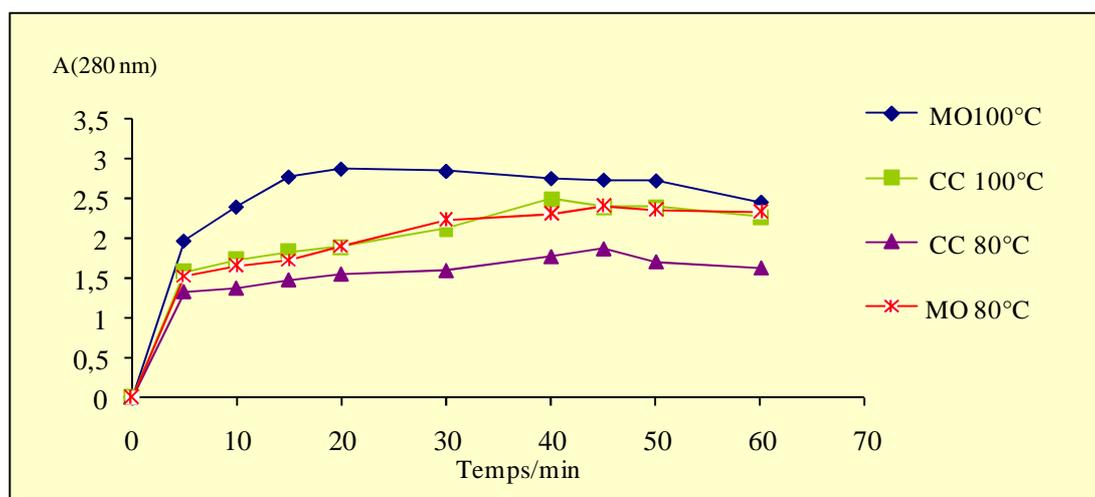
## **2-2 Extraction des polyphénols du thé vert assistée par micro-ondes à différentes températures : Analyse et Caractérisation**

### **2-2-1 Extraction à l'eau par chauffage micro-ondes à différentes températures**

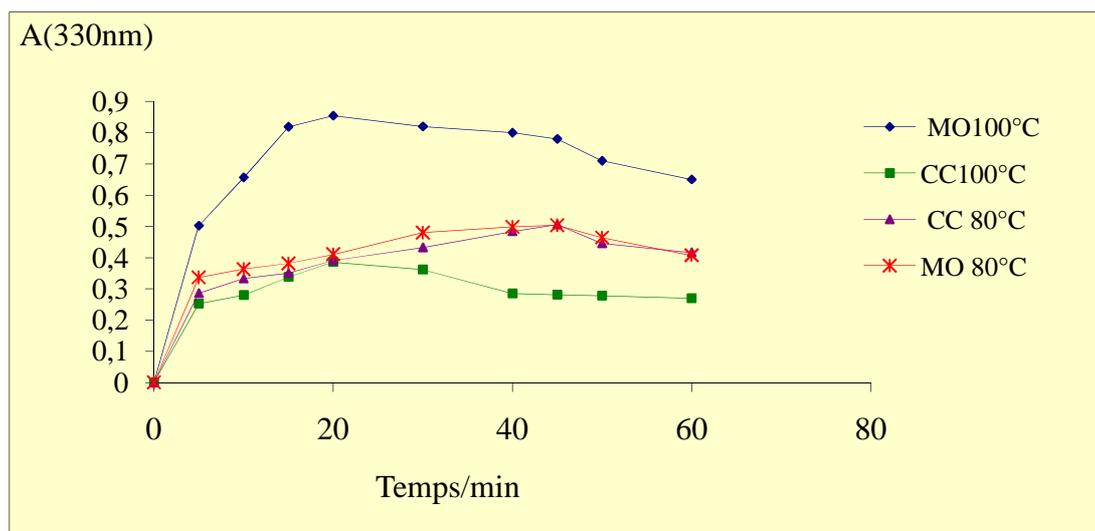
Une masse de thé Caravane a été extraite à l'eau chauffée à 80°C ou à 100°C sous micro-ondes. La puissance du four micro-ondes a été fixée à 480 Watt de telle manière que la dégradation des polyphénols soit minimisée. Des échantillons ont été prélevés tous les cinq minutes. L'étude cinétique a été suivie par spectroscopie UV-Visible sur une durée d'une heure. Le spectre UV-Visible de l'extrait du thé a été caractérisé par trois longueurs d'ondes qui sont :  $\lambda = 280$  nm,  $\lambda = 330$  nm et  $\lambda = 350$  nm qui correspondent respectivement aux phénols totaux, aux dérivés hydroxycinamique et enfin aux flavonols. Les absorbances à ces longueurs d'onde ont été mesurées en fonction du temps. L'extraction des polyphénols du thé par chauffage sous MO est comparée par celle de chauffage conventionnel aux différentes températures.

### 2-2 -2 Etude cinétique de l'extraction par UV-Visible

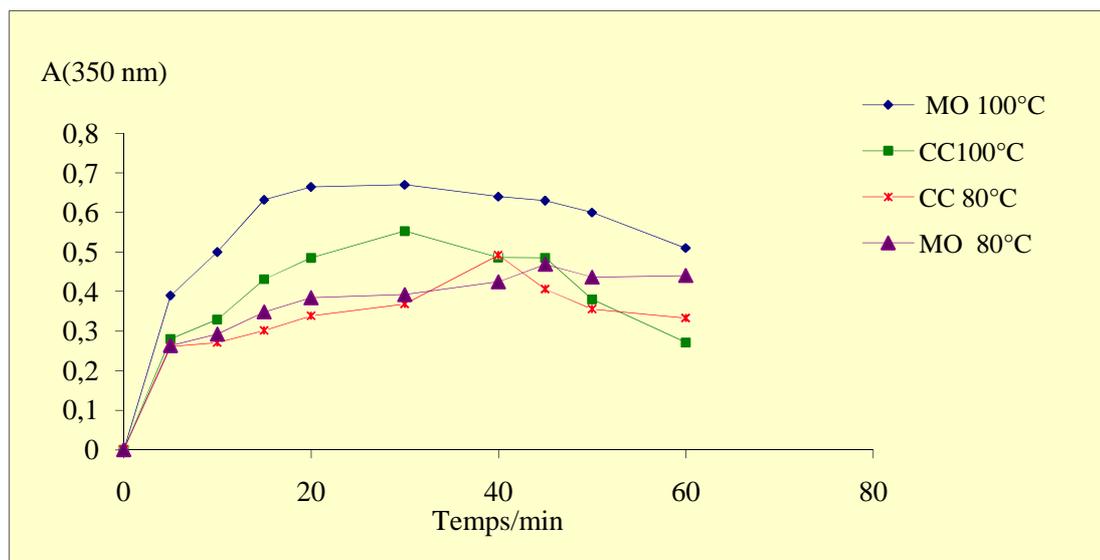
Dans cette partie du travail, nous avons effectué une étude cinétique de l'extraction par infusion sous micro-ondes à 80°C et à 100°C. Afin d'étudier la rapidité d'extraction par micro-ondes, nous avons comparé les résultats d'absorbances en fonction du temps des extraits de micro-ondes à ceux du chauffage conventionnel à 80°C et 100°C. Les courbes d'absorbances à différentes longueurs d'ondes des extraits du thé vert en fonction du temps sont représentées dans les figures 3a, 3b et 3c.



**Figure 3a.** Variation de l'absorbance à  $\lambda = 280$  nm en fonction du temps des extraits de thé obtenus par chauffage conventionnel (CC) et sous micro-ondes (MO).



**Figure 3b.** Variation de l'absorbance à  $\lambda = 330$  nm) en fonction du temps des extraits de thé obtenus par chauffage conventionnel (CC) et sous micro-ondes (MO).



**Figure 3c.** Variation de l'absorbance à  $\lambda = 350$  nm en fonction du temps des extraits de thé obtenus par chauffage conventionnel (CC) et sous micro-ondes (MO).

Les résultats de l'analyse cinétique par UV-Visible font ressortir les remarques et les interprétations suivantes :

- Il est clair que l'extraction par MO à 100°C est la meilleure technique tout en terme de rendement et la durée, ce qui conduit à une extraction quantitative des trois familles des polyphénols après 20 min;
- Le rendement d'extraction par MO à 80°C est à peu près équivalent à CC à 100°C;
- Le gain d'extraction est plus marqué pour les acides hydroxycinamiques.
- L'un des avantages de l'extraction assistée par micro-ondes est incontestablement le gain de temps et donc par conséquent l'économie de l'énergie. En ce qui concerne cette partie analytique, nous pouvons conclure que l'extraction assistée par micro-onde des polyphénols du thé est plus rapide du point de vue cinétique et plus efficace du point de vue quantitatif.

### 2-2 -3 Dosage des phénols totaux

Pour doser les phénols totaux, nous avons suivi le même protocole expérimental cité dans le chapitre I de cette partie.

Après la fixation du temps d'extraction à partir de l'étude cinétique par spectroscopie UV-visible, nous avons pu quantifier nos extraits de thé fraîchement préparés que se soit par

chauffage conventionnel ou par micro-ondes. Les extraits sont filtrés successivement par une membrane Wathman TF 0,45 µm et 0,2 µm. Nous avons dosé les extraits en phénols totaux en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. La teneur d'extrait en phénols totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de thé sec (l'équation de la courbe de calibration est :  $y = 0,041x + 0,0323$  avec  $R^2 = 0,9997$ ). Les résultats du dosage des phénols totaux sont regroupés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Teneurs en phénols totaux d'extrait du thé vert avec  $\pm$  ET (n = 3) exprimé en mg d'acide gallique/g de thé. *M.O* = micro-ondes et *C.C* = Chauffage conventionnel

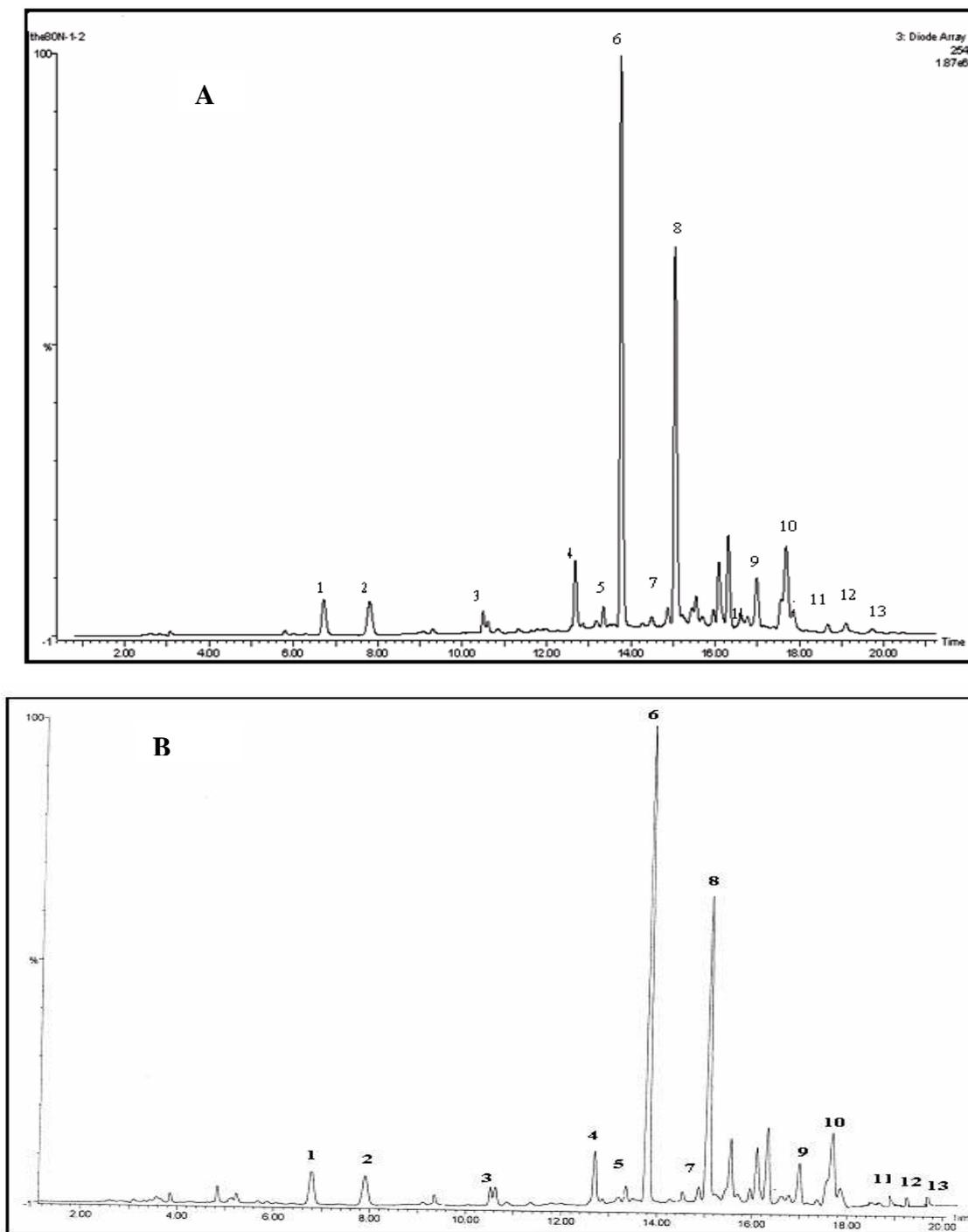
T (°C), <i>technique</i> , t (min)	Teneur en phénols totaux en mg équivalent
100, <i>M.O</i> 20	111,28 $\pm$ 0,05
80, <i>M.O</i> 30	84,10 $\pm$ 0,05
100, <i>C.C</i> , 40	102,20 $\pm$ 0,15
80, <i>C.C</i> , 45	87,09 $\pm$ 0,02

L'estimation totale des phénols totaux dans les extraits du thé par le test de Folin Ciocalteu confirme que l'extraction par MO est supérieure à CC.

### 2-3 Caractérisation des extraits du thé Caravane préparés par MO et CC: analyse quantitative et qualitative par CLHP-UV-MS.

#### 2-3-1 Analyse quantitative et qualitative par CLHP-UV-MS

Après l'optimisation du temps d'extraction des polyphénols du thé vert par micro-ondes et par chauffage conventionnel à 100°C ou à 80°C, les extraits fraîchement préparés par les deux méthodes sont injectés sur colonne en phase inverse C18e puis élués avec un gradient CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/HCOOH.



**Figure 4.** Chromatogramme CLHP des extraits du thé vert obtenus par CC à 80°C durant 45 min (A) et MO à 100°C durant 20min (B). 1 = acide gallique, 2 = acide 5-galloylquinique, 3 = gallocatéchine (GC), 4 = epigallocatéchine (EGC), 5 = catéchine (C), 6= caféine, 7 = épicatechine (EC), 8 = epigallocatéchine gallate (EGCG), 9 = rutine (quercétine-3-rutinoside), 10 = épicatechine gallate (ECG), 11 = quercétine-3-glucoside ou galactoside, 12 = kaempferol-3-glucoside or galactoside, 13 = kaempferol-3-glucoside ou galactoside.

La comparaison des deux procédés a été réalisée, tout d'abord par identification et caractérisation des pics chromatographiques, puis par le calcul des concentrations massiques pourcentages de chaque famille en équivalent d'un standard phénolique fréquemment rencontré dans le thé vert.

L'identification des flavanols et caféine a été effectuée en comparant les spectres UV-visible, les valeurs de  $m/z$  (ion moléculaire et les fragments) avec ceux des standards. En outre, les flavonols glucosides ont été identifiés à partir de leurs valeurs  $m/z$  (ion moléculaire et fragment des aglycones) et leurs spectres UV-visible caractéristiques par deux bandes d'absorption dans le domaine 240-285 nm (bande II, noyau A) et 300-350 nm (bande I, noyau B) ainsi par les données de la littérature.<sup>10, 11, 12</sup>

Les résultats des analyses CLHP-UV-SM sont représentés dans les figures (4), et le tableau (2)

**Tableau 2.** Analyse CLHP-DAD-MS des extraits du thé obtenus par MO et CC.

pic	$t_R$ / min	Technique d'extraction	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	$m/z$ , fragment ions	$\lambda_{max}$ (nm)	Structure proposée
1	6.83	4 techniques	169		272	Acide gallique
2	7.86	4 techniques	343	191-169	274	Acide Galloylquinique
3	10.62	MO et CC à 100°C	305	261 - 221 - 179	274	Gallocatechine
4	12.72	4 techniques	305	261 - 221 - 179	274	Epigallocatechine
5	13.35	4 techniques	289	245 - 205	276	Catechine
6	13.78	4 techniques	193		274	Caffeine
7	14.94	MO à 100°C	289	245 - 205	280	Epicatchine
8	15.03	4 techniques	457	331 - 305 - 169	276	Epigallocatechin-3-gallate
9	17.04	4 techniques	609	301 - 271 - 151 - 108	256, 352	Rutine
10	17.67	4 techniques	441	331 - 289 - 169	278	Epicatechin-3-gallate
11	18.67	4 techniques	463	301	266, 350	Quercétine-3-galactoside
12	19.07	MO and CC à 100°C	447	285	266, 346	Kaempferol-galactoside
13	19.73	4 techniques	447	285	266, 346	Kaempferol-3-glucoside

<sup>10</sup> Atoui A. K et coll., 2005. *J. Food Chem.*, 89, 27-36.

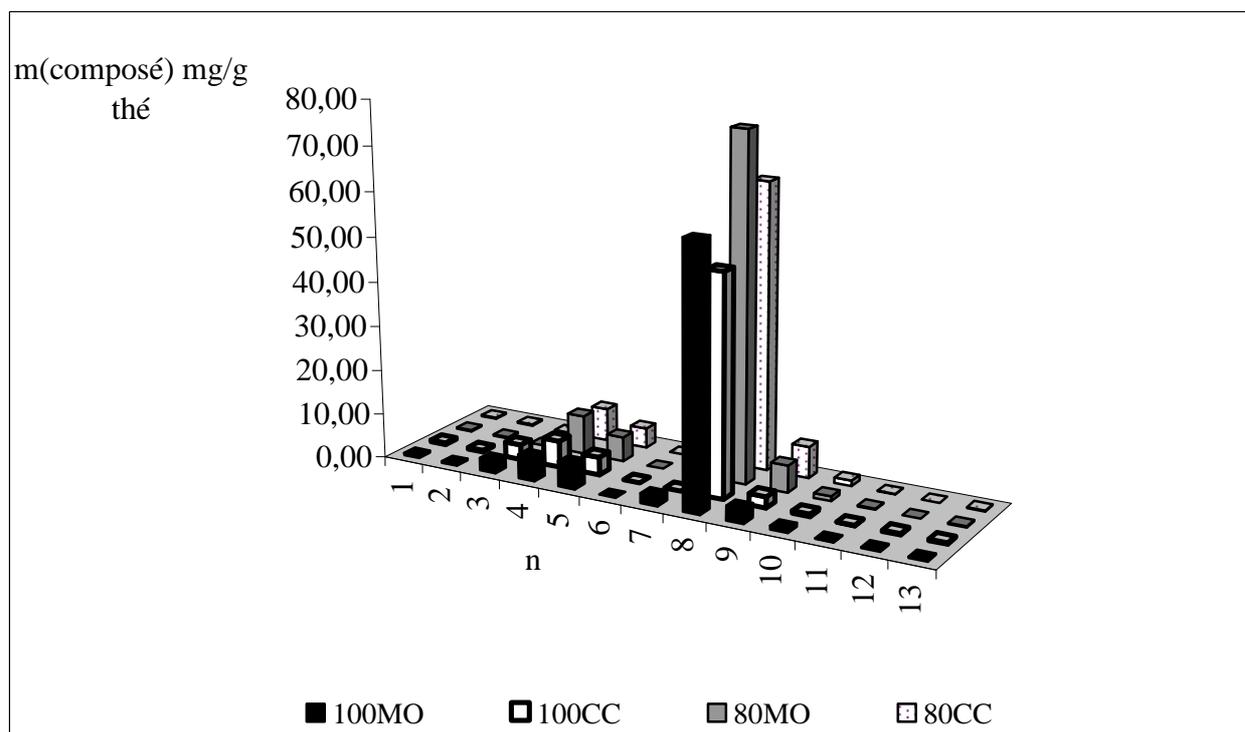
<sup>11</sup> Del Rio D. et coll., 2004. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2807-2815.

<sup>12</sup> Sakakibara H., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.

Les concentrations totales des acides phénoliques, flavanols et flavonols présents dans les extraits de thé vert ont été estimées à partir des courbes d'étalonnage établies respectivement de l'acide gallique, catéchine et rutine. Les résultats sont représentés dans le **tableau 3, tableau 4, figure 5**.

**Tableau 3.** La teneur phénolique dans les extraits du thé vert de différents techniques d'extraction (n=3)

Polyphénols du thé vert	MO, 100°C 20 min	CC, 100°C 40 min	MO, 80°C 30 min	CC, 80°C 45 min
Acides phénoliques/ μM	230 (± 7)	199 (± 6)	180 (± 9)	163 (± 5)
Flavanols / mM	13.42 (± 0.52)	11.26 (± 0.13)	16.80 (± 0.36)	14.31 (± 0.50)
Flavonols / μM	120 (± 9)	107 (± 11)	130 (± 6)	128 (± 4)



**Figure 5.** Caféine et les composés majoritaires de polyphénols dans les infusions de (100°C, MO, 20 min), (100°C, CC, 40 min), (80°C, MO, 30 min) and (80°C, CC, 45 min). mg d'équivalent / g d'extrait thé ± SD (n=3)

**Tableau 4.** Composition chimique des extraits de thé vert obtenus par MO et CC.  
mg d'équivalent / g d'extrait thé  $\pm$  SD (n=3)

Pic	t <sub>R</sub> (min)	Composé	100MO	100CC	80MO	80CC
1	6,83	Acide gallique	0,49 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02
2	7,86	Acide galloylquinique	0,34 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01
3	10,62	Gallocatechine	2,90 $\pm$ 0,02	3,38 $\pm$ 0,01	-	-
4	12,72	Épigallocatechine	5,48 $\pm$ 0,03	5,99 $\pm$ 0,05	8,67 $\pm$ 0,03	7,33 $\pm$ 0,02
5	13,35	catechine	5,77 $\pm$ 0,02	4,06 $\pm$ 0,03	5,49 $\pm$ 0,02	4,43 $\pm$ 0,02
6	13,78	cafeine	ND	ND	ND	ND
7	14,94	Epicatechine	2,17 $\pm$ 0,02	-	-	-
8	15,03	Epigallocatechin-3-gallate	58,38 $\pm$ 0,34	49,47 $\pm$ 0,53	77,14 $\pm$ 0,26	64,18 $\pm$ 0,26
9	17,04	Epicatechine-3-gallate	3,23 $\pm$ 0,01	2,48 $\pm$ 0,01	6,16 $\pm$ 0,01	7,12 $\pm$ 0,02
10	17,67	rutine	0,81 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,02	1,23 $\pm$ 0,03
11	18,67	Quercétine-3-galactoside	0,11 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01
12	19,07	Kaempferol-3-galactoside	0,24 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,03	-	-
13	19,73	kaempferol 3- glucoside	0,26 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01

### Interprétation des résultats

L'extraction assistée par MO à 100°C pendant 20 min produit des concentrations plus élevées dans toutes classes des polyphénols que l'extraction assistée par CC pendant 40 min à 100°C (tableau 3). L'extraction des acides phénoliques et flavanols est plus efficace à 100°C. Tandis que les flavanols thermiquement sensibles ont été mieux extraits à 80°C (tableau 3 et 4).

Comme on pouvait s'y attendre l'épigallocatechine gallate EGCG est le plus abondant dans l'extrait MO à 80°C en comparaison avec les trois autres extraits. Pour une technique (MO ou CC), la concentration d'EGCG, ECG et EGC semble plus faible dans les extraits obtenus à température plus élevée (100°C contre 80°C). Ceci peut traduire par des processus d'autoxydation accélérés par la température. Ce phénomène est aussi observé dans le cas de la quercétine glucoside. En effet le groupement pyrogallol (1,2,3 trihydroxybenzène) présent dans l'ensemble de ces phénols est particulièrement riche en électrons qui font l'objet d'autoxydation initiée par des traces de métaux de transition.<sup>13</sup> Ce qui est plus surprenant est que la GC a aussi la partie pyrogallol et est détectée seulement dans les processus à 100°C. Par conséquent une partie de la concentration d'EGC est diminuée lorsque la température est augmentée en passant de 80°C et 100°C ce qui pourrait résulter l'épimérisation de (2,3 cis) EGC en (2,3 trans)GC le plus stable.<sup>14</sup> De même, EC, qui est détectée dans l'extrait 100°C MO, pourrait être libérée ECG par l'hydrolyse du groupement ester.

Globalement l'extraction par MO à 80°C semble la meilleure technique pour l'extraction des flavanols du thé vert thermiquement sensible. En particulier, elle permet d'une manière très significative l'obtention de concentrations élevées en EGCG, EGC, C.

L'ensemble des résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus par CLHP montre que l'extraction assistée par micro-ondes fournit des rendements plus élevés. L'explication de la différence de composition chimique entre le procédé par chauffage conventionnel et celui par micro-ondes pourrait être basée principalement sur des phénomènes de solubilités.

Le chauffage par micro-ondes peut inhiber la dégradation ou la décomposition des polyphénols, y compris celle des flavanols dans la matrice végétale, et par conséquent

---

<sup>13</sup> Roginsky V. Alegria A.E., 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4529-4535.

<sup>14</sup> Wang L. Weller C. L., 2006. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 300-312

augmenter leurs solubilités<sup>15,16</sup>. De plus, la chaleur produite par l'irradiation par micro-ondes peut libérer facilement les composés phénoliques présents dans la matrice végétale<sup>17</sup>.

Pour une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction par micro-ondes, Paré et Bélanger<sup>18</sup> ont démontré un mécanisme thermique qui explique la domination des produits obtenus par micro-ondes. Ce mécanisme est que la matrice végétale s'endommage en raison de l'explosion produite au niveau de la paroi cellulaire, conséquence de l'augmentation soudaine de la température. Ces dommages sont générés par des points chauds produits à l'interface des parois lors de l'irradiation par micro-ondes. En effet, quand les glandes sont sujettes à un stress thermique très sévère et de haute pression localisée, induit par un chauffage spécifique de type micro-ondes, la pression interne dans les glandes peut excéder leur capacité d'expansion externe. En conséquence, une rupture plus rapide survient par rapport à celle réalisée par chauffage conventionnel ou par macération. De plus, la présence des composés polaires tels que l'eau et les composés oxygénés, peut provoquer une augmentation soudaine de la température favorisant un processus de déshydratation localisé avec une vitesse de chauffage très élevée à l'intérieur de la cellule. Ce dernier phénomène augmente la vitesse de transfert des constituants de la cellule à travers les parois cellulaires.

Les micro-ondes présentent l'intérêt d'être une source d'énergie contrôlable de façon instantanée et réglable avec précision. Le chauffage micro-ondes n'a pas l'inertie thermique du chauffage par conduction et convection à partir d'une paroi chaude, pour lequel l'efficacité du transfert thermique est limitée. L'extraction sous micro-ondes est caractérisée par des vitesses d'extraction supérieures à celle de l'extraction traditionnelle et qui peuvent s'accompagner d'une modification de la sélectivité et la reproductibilité d'extraction.

#### **2-4 Activité antioxydante par inhibition de la peroxydation lipidique**

Des nombreuses études expérimentales et épidémiologiques ont démontré l'activité antioxydante puissante d'extrait du thé vert.<sup>19,20</sup> Comme on pouvait s'y attendre de la variabilité des concentrations en polyphénols, la capacité antioxydante des extraits du thé vert dépend aussi le procédé d'extraction utilisé. Dans cette étude, la capacité antioxydante a été évaluée par l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par Cu<sup>II</sup> dans le tween 20.

---

<sup>15</sup> Gulati, A. et coll., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4764–4768

<sup>16</sup> Seung-Cheol Lee et coll., 2006. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 399-403

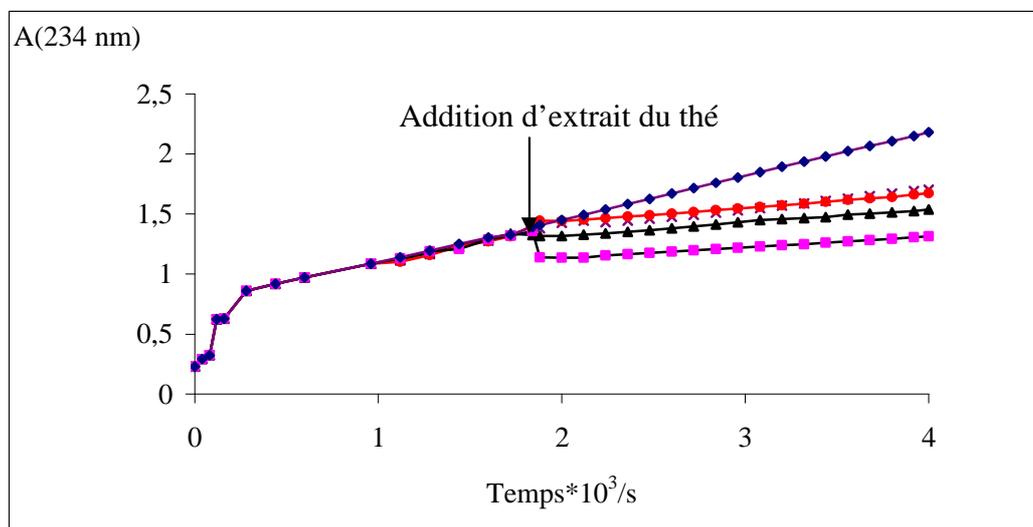
<sup>17</sup> Dewanto V. et coll., 2002, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4959–4964.

<sup>18</sup> Paré J.R.J., Bélanger J.M.R., 1997. *Elsevier*, Amsterdam.

<sup>19</sup> Gramza A. Korczak, J., 2005. *Trends Food Sci. Tech.*, 16, 351-358.

<sup>20</sup> Valcic S. et coll., 2000. *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 801-810.

L'accumulation des hydroxyperoxydes de lipide (LOOH, diènes conjuguées) a été suivie à 234 nm bande caractéristique de peroxydation en absence ou présence d'extrait du thé vert (Respectivement  $V_{p0}$ ,  $V_p$ ) ( **Figure 6**, **tableau 5**).



**Figure 6.** Inhibition de peroxydation de l'acide linoléique initiée par  $Cu^{II}$  et  $H_2O_2$  dans le Tween 20 à  $37^\circ C$ ,  $pH=7.4$ . Inhibition par des extraits du thé obtenus par les 4 processus étudiés: MO,  $100^\circ C$ , 20 min ( $\blacktriangle$ ), MO,  $80^\circ C$ , 30 min ( $\blacksquare$ ), CC,  $80^\circ C$ , 45 min ( $\bullet$ ), CC,  $100^\circ C$ , 40 min ( $\times$ ). Control: no antioxidant, ( $\blacklozenge$ ).

**Tableau 5.** Rapport de la vitesse de peroxydation inhibée par extrait du thé sur la vitesse de peroxydation non inhibée  $\pm$  SD (n=3).

T ( $^\circ C$ ), technique, t (min)	$V_p/V_{p0}$
100, M.O 20	$0.38 \pm 0,05$
80, M.O, 30	$0.22 \pm 0,03$
100, CC, 40	$0.4 \pm 0,03$
80, CC, 45	$0.35 \pm 0,01$

Pour un volume d'extrait, plus le rapport  $V_p/V_{p0}$  est faible plus le pouvoir antioxydant est élevé. L'extrait obtenu par MO à  $80^\circ C$  a montré une meilleure inhibition de la peroxydation de lipide que les autres extraits, ceci est en accord avec sa concentration élevée en flavanols (tableau 3). Les flavanols sont probablement les principaux contributeurs à l'activité antioxydante des extraits du thé vert en raison de leurs concentrations élevées et parce qu'elles sont des donneurs des électrons et d'hydrogènes par le baies de leurs groupes

catéchols et pyrogallols. On outre la capacité de piégeages des radicaux libres par les flavanols du thé est classée comme suit : EGCG > ECG > EGC > C.<sup>21</sup>

Il n'est donc pas surprenant que l'extrait obtenu par MO à 80°C ayant la concentration totale plus élevée en flavanols, en particulier EGCG, présent aussi la plus grande capacité antioxydante.

## 2-5 Conclusion

La qualité thérapeutique d'un extrait du thé vert est liée essentiellement à l'efficacité et à la sélectivité de la méthode d'extraction utilisée.

L'étude bibliographique a montré qu'il y a peu de travaux concernant l'extraction des polyphénols du thé vert assistée par micro-ondes. En raison de ce manque, un travail sur l'extraction des polyphénols du thé vert par micro-ondes a été réalisé. Dans le but d'étendre et d'optimiser cette nouvelle technique d'extraction, un protocole expérimental a été mis au point. La rapidité, l'efficacité et la sélectivité de ce nouveau procédé ont été suivies par une étude comparative entre l'extraction par chauffage micro-ondes et celle par chauffage conventionnel.

La comparaison des deux techniques a montré :

Du point de vue cinétique : l'étude cinétique de l'extraction par spectroscopie UV-visible a montré que le procédé micro-ondes accélère de façon spectaculaire les cinétiques d'extraction. L'extraction par micro-ondes à 100 °C durant 20 min fournit la teneur la plus importante (maximale) en polyphénols du thé.

Au niveau quantitatif : tout d'abord, pour l'ensemble des quatre extraits du thé Caravane obtenus à la fois par micro-ondes et par chauffage traditionnel, l'analyse des compositions a permis quantitativement l'identification de 13 composés phénoliques en plus de la caféine (un alcaloïde).

De plus, le chauffage par micro-ondes à 100°C a permis d'extraire une quantité plus importante de polyphénols en 15 min que le chauffage conventionnel à 80°C en 45 min.

Du point de vue qualitatif : l'étude qualitative a permis de montrer des différences significatives dans la composition des polyphénols selon leurs modes d'extraction, qu'il s'agisse du chauffage sous micro-ondes ou conventionnel :

Premièrement, les composés majoritaires des polyphénols du thé Caravane diffèrent en proportion. Généralement ces composés ont une teneur beaucoup plus élevée dans l'extrait obtenu par micro-ondes à comparer à celui obtenu par chauffage classique.

De plus, les analyses chromatographique ont montré que la température peut influencer la sélectivité d'extraction quelque soit le mode d'extraction utilisé. Les produits de dégradation thermiques apparaissent à 100 °C.

La qualité thérapeutique d'extrait du thé est liée à sa teneur en flavanols notamment les gallates d'épicatéchine (ECG) et les gallates d'épigallocatechine (EGCG). Les analyses qualitatives ont montré que l'extrait préparé par micro-ondes à 80 °C durant 30 min est plus riche en ECG et EGCG.

En conclusion, on peut dire que l'extraction des polyphénols du thé vert par micro-ondes apporte des résultats extrêmement intéressants par rapport au chauffage classique.

**Références bibliographiques**

- [1] Yuegang Zuo, Kai Zhang, Yuejan Lin, 2007. *J. Chromatography A*, 1148, 211-218.
- [2] Lucchesi M. E., Chemat F., Jacqueline S., 2004. *J. Chromatography A*, 1043, 323-327.
- [3] Young J.C., 1995. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2904-2910.
- [4] Vidal L., Domini C. E., Grané N., Psillakis E., Canals A., 2007. *J. Anal. Chim. Acta*, 592, 9-15.
- [5] Gulati A., Rawat R., Singh B., Ravindranath S.D., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4764-4768.
- [6] Xuejun P., Guoguang N., Huizhou L., 2003. *J. Chem. Eng. Proc.*, 42, 129-133
- [7] Seung-Cheol Lee, So-Young Kim, Seok-Moon Jeong, Ji-Hee Park, 2006. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 399-403.
- [8] Sharma V., Gulati A., Ravindranath S.D, 2005. *J. Food Chem.*, 93, 141-148.
- [9] Chan E.W.C., Lim Y.Y., Chew Y.L., 2007. *J. Food Chem.*, 102, 1214-1222.
- [10] Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P., 2005. *J. Food Chem.*, 89, 27-36.
- [11] Del Rio D., Stewart A. J., Mullen W., Burns J., Lean M. E. J., Brighenti F., Crozier A. 2004. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2807-2815.
- [12] Sakakibara H., Yoshinori H., Satoshi N., Hitoshi A., Kazuki K., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.
- [13] Roginsky V., Alegria A.E., 2005. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4529-4535.
- [14] Wang L., Weller C. L., 2006. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 300-312
- [15] Gulati A., Rawat R., Singh B., Ravindranath S. D., 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 5, 4764-4768.
- [16] Seung-Cheol Lee, So-Young Kim, Seok-Moon Jeong, Ji-Hee Park, 2006. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 399-403.
- [17] Dewanto, V., Wu, X., Liu, R. H. 2002. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4959-4964.
- [18] Paré J.R.J., Bélanger J.M.R., 1997. *Elsevier*, Amsterdam.
- [19] Gramza A., Korczak J., 2005. *Trends Food Sci. Tech.*, 16, 351-358.
- [20] Valcic S., Burr J. A., Timmermann B. N., Leibler D. C., 2000. *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 801-81

---

## Conclusion générale- Perspectives

---

La famille des polyphénols renferme de nombreux composés d'intérêt nutritionnel et valorisables dans l'industrie alimentaire et la cosmétologie en raison de leurs propriétés réductrices (antioxydantes) et de leur capacité à interagir avec les ions métalliques et une grande variété de protéines.

Cette étude a permis de mieux comprendre les paramètres qui gouvernent la réactivité des polyphénols en présence des ions du fer et du cuivre.

Dans des conditions fortement acides, la complexation métallique n'a pas lieu mais l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  est capable d'oxyder directement les polyphénols sans participation de  $\text{O}_2$ . Dans un tampon phosphate neutre, la complexation est en général rapide. Avec les ions du fer, elle conduit à des complexes relativement stables malgré l'autoxydation rapide de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Avec les ions du cuivre, elle conduit à des complexes capables d'activer  $\text{O}_2$  avec production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxydation rapide du ligand polyphénolique et maintien du cuivre au degré d'oxydation I.

L'étude comparée de la capacité des polyphénols sélectionnés à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique (solubilisé par le Tween 20) induite par  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$  a montré que la rutine, la catéchine et l'acide caféique ne complexent pas  $\text{Cu}^{\text{II}}$  dans ces conditions et agissent donc par leur forme libre en réduisant les espèces initiatrices de la réaction (radicaux  $\text{HO}^\bullet$ ). En revanche, la quercétine se lie à  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et subit vraisemblablement le processus d'autoxydation mis en évidence en absence de lipide. Ainsi, ce sont principalement les produits d'oxydation de la quercétine (ou leurs complexes avec  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) qui sont responsables de l'inhibition (assez modeste) observée. Un effet pro-oxydant est observé avec l'acide gallique qui doit être lié à sa capacité de réduire  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

Enfin, une étude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage par micro-ondes et chauffage conventionnel a été réalisée. Des différentes analyses pratiquées (suivi cinétique, dosage des phénols totaux, analyses par CLHP-SM, mesure de pouvoir antioxydant), il ressort que l'extraction des polyphénols du thé sous micro-ondes à  $80^\circ\text{C}$  est particulièrement appropriée pour l'obtention rapide d'extraits riches en flavanols.

Compte tenu des résultats intéressants obtenus dans l'étude des interactions des polyphénols avec les ions du fer et du cuivre, il serait bon d'étendre ces travaux aux principaux flavanols du thé vert et de comparer les résultats à ceux obtenus avec la catéchine et l'acide gallique. Compte tenu de la relative efficacité de l'autoxydation induite par les ions du cuivre, un suivi plus systématique de la réaction par CLHP-SM avec détection des phénols et de leurs principaux produits d'oxydation permettrait de confirmer nos hypothèses de mécanisme. Une étude dans des conditions d'acidité modérée (pH 4 à 6) reproduisant celles du compartiment gastrique permettrait de modéliser les phénomènes d'autoxydation susceptibles de se dérouler dans le tractus digestif. L'influence de macromolécules alimentaires (protéines, polysaccharides) susceptibles d'interagir avec les polyphénols et/ou les ions métalliques pourrait alors être examinée.

L'étude de l'extraction des polyphénols du thé sous chauffage par micro-ondes nous encourage à tester les potentialités de la méthode dans l'élaboration d'autres extraits végétaux riches en polyphénols et autres métabolites secondaires de plantes.

## Liste des tableaux

### Première Partie. Etude Bibliographique

#### Chapitre 1. Les Polyphénols, Structures, Stabilités et Propriétés

**Tableau 1.** Principales classes de composés phénoliques.....8

### Deuxième partie. Interactions de Polyphénols avec les ions du fer et du cuivre. Conséquences sur leur oxydation à l'air et leur pouvoir antioxydant.

#### Chapitre 1. Matériels & Méthodes

**Tableau 1.** Réactifs utilisés.....74

**Tableau 2.** Gradient d'éluion pour l'analyse CLHP-SM.....77

#### Chapitre 2. Interactions de Polyphénols avec les ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation

#### Chapitre 2-2. Interactions de la Quercétine avec les Ions du Cuivre et du Fer : Complexation, Oxydation

**Tableau 1.** Constante de stabilité des complexes quercétine-fer à pH 5 et 37°C.....100

**Tableau 2.** Complexation du Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup> par la quercétine (50 µM) dans un mélange tampon acétate (0,2 M)-MeOH (1/1) (pH 5, 37°C).....100

**Tableau 3.** Complexation de la quercétine (50 µM) par Fe<sup>II</sup> et Fe<sup>III</sup> dans un tampon phosphate à pH 7,4. La complexation est suivie à 460 nm durant 2 min.....103

**Tableau 4.** Constantes de stabilité des complexes quercétine-fer à pH 7,4 et 37°C (analyse à 460 nm sur 2 min) .....103

**Tableau 5.** Complexation de la quercétine (50 µM) par Cu<sup>II</sup> (n(équiv.)<1) dans un tampon phosphate à 37°C et pH 7,4. Suivi cinétique à 460 nm durant 2 min.....106

**Tableau 6.** Complexation de la quercétine (50 µM) par Cu<sup>II</sup> (n(équiv.)>1) dans un tampon phosphate à 37°C et pH 7,4. Analyse à 460 nm durant les 15 premières secondes.....107

**Tableau 7.** Complexation de la quercétine (50 µM) par Cu<sup>I</sup> dans un tampon phosphate à 37°C et pH 7,4. Analyse à 460 nm sur les 15 premières secondes.....108

**Tableau 8.** Constante de vitesse de complexation de Fe<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup> et Cu<sup>I</sup>.....108

**Tableau 9.** Données d'analyse HPLC-MS de l'autoxydation de la quercétine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). Analyse après 15 h d'autoxydation.....110

**Tableau 10.** Autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence de Fe<sup>III</sup> dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.....116

**Tableau 11.** Autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence de Fe<sup>II</sup> dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.....117

**Tableau 12.** Autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence d'ions du fer (rapport molaire Fe/quercétin < 1) dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.....119

**Tableau 13.** Autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence d'EDTA et de Fe<sup>II</sup> dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.....122

**Tableau 14.** Autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence d'EDTA et de Fe<sup>III</sup> dans un tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4 et 37°C.....122

**Tableau 15.** Paramètres de la réaction d'autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence de Cu<sup>II</sup> dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....128

**Tableau 16.** Paramètres de la réaction d'autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence de Cu<sup>II</sup> et d'EDTA (10 equiv.) dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....129

<b>Tableau 17.</b> Analyse HPLC-MS de l'autoxydation de la quercétine en présence de $\text{Cu}^{\text{II}}$ dans un mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) après 7h de réaction (pH 7,4, 37°C).....	131
<b>Tableau 18.</b> Paramètre de la réaction d'autoxydation de la quercétine (50 $\mu\text{M}$ ) en présence de $\text{Cu}^{\text{II}}$ dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....	132
<b>Tableau 19.</b> Constantes de vitesse de complexation métallique et d'autoxydation de la quercétine (50 $\mu\text{M}$ ) dans un tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	134
<b>Tableau 20.</b> Réduction de $\text{Fe}^{\text{III}}$ par la quercétine (50 $\mu\text{M}$ ) dans le mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1) (37°C). $\epsilon(\text{quercétine}, 370 \text{ nm}) = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .....	138

Chapitre 2-3. Interactions de la Rutine avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation, Oxydation.

<b>Tableau 1.</b> Les valeurs pka de E de la rutine et la quercétine.....	143
<b>Tableau 2.</b> Complexation $\text{Fe}^{\text{III}}$ -rutine dans le tampon phosphate à pH 7,4 et 37°C. Suivi spectroscopique à 420 ou 550 nm sur 5 min. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ . a) complexation rapide.....	147
<b>Tableau 3a.</b> Complexation $\text{Fe}^{\text{II}}$ -rutine (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 420 nm sur 45 s ou 2 min. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ . a) 3 étapes apparentes, lente croissance de A(420 nm) après 50 s non traitée.....	150
<b>Tableau 3b.</b> Complexation $\text{Fe}^{\text{II}}$ -rutine (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 388 ou 300 nm sur 45 s et analyse cinétique de la 2 <sup>e</sup> étape seulement. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ . a) absorbance maximale à la fin de l'étape rapide: $\epsilon_1 = 14370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 388 nm. b) $A_f$ : absorbance finale à 300 nm.....	151
<b>Tableau 3c.</b> Complexation $\text{Fe}^{\text{II}}$ -rutine (2e étape, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique sur 2 min. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ . a) absorbance à la fin de l'étape rapide de complexation. b) $A_f$ : absorbance finale.....	151
<b>Tableau 4.</b> Complexation $\text{Cu}^{\text{II}}$ -rutine dans un tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C. Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 min. Concentration de la rutine = 50 $\mu\text{M}$ .....	155
<b>Tableau 5.</b> Evolution du complexe $\text{Cu}^{\text{I}}$ -rutine en présence d'un excès de $\text{Cu}^{\text{I}}$ (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 210 nm sur 1 min. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ .....	157
<b>Tableau 6.</b> Les longueurs d'ondes maximales ( $\lambda_{\text{max}}$ ) et les constantes de vitesse des complexes lors de complexation de la rutine et la quercétine par $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ et $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ .....	158
<b>Tableau 7.</b> Oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}$ -rutine en présence de $\text{H}_2\text{O}_2$ (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 480 nm sur 1h et analyse selon un modèle biexponentiel. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ . Concentration de $\text{H}_2\text{O}_2 = 500 \mu\text{M}$ .....	164
<b>Tableau 8.</b> Autoxydation du complexe $\text{Cu}^{\text{I}}$ -rutine (2 <sup>e</sup> étape, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 h. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ .....	167
<b>Tableau 9.</b> Oxydation du complexe $\text{Cu}^{\text{I}}$ -rutine en présence de 500 $\mu\text{M}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ (2e étape, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 h. Concentration de rutine = 50 $\mu\text{M}$ .....	170
<b>Tableau 10.</b> Analyse par CLHP-UV-MS de l'oxydation de la rutine en présence de 2 équiv. de $\text{Cu}^{\text{II}}$ et de 10 équiv. de $\text{H}_2\text{O}_2$ (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C). Analyse réalisée après 7h d'oxydation.....	172

Chapitre 2-4. Interactions de l'Acide Caféique avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation, Oxydation

<b>Tableau 1.</b> Données d'analyse HPLC-MS de l'autoxydation de l'acide caféique dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). Analyse après 7h d'autoxydation en absence d'ion métallique.....	180
---	-----

<b>Tableau 2.</b> Complexation Fe <sup>III</sup> -acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 ou 285 nm sur 2 min. Concentration d'acide caféique = 50 µM. On note ρ= rapport molaire Fe <sup>III</sup> /AH <sub>2</sub> .....	185
<b>Tableau 3.</b> Complexation Fe <sup>II</sup> -acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 ou 285 nm sur 1 min. Concentration d'acide caféique = 50 µM.....	188
<b>Tableau 4.</b> Cu <sup>I</sup> + acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique sur 1 min (après l'étape rapide de complexation). Concentration de l'acide caféique = 50 µM.....	197
<b>Tableau 5.</b> Autoxydation de l'acide caféique induite par les ions du fer (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 ou 285 nm sur 1 h, intervalle de temps pour l'analyse cinétique = 40 - 1180 s a). Concentration d'acide caféique = 50 µM.....	199
<b>Tableau 6.</b> Autoxydation des complexes Cu <sup>II</sup> -acide caféique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique sur 1h à 350 nm (temps t <sub>0</sub> du début du calcul après addition de Cu <sup>II</sup> ). Concentration de l'acide caféique = 50 µM.....	203
<b>Tableau 7.</b> Données d'analyse HPLC-MS de l'autoxydation de l'acide caféique (AH <sub>2</sub> ) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). Analyse après 7h d'autoxydation en présence de Cu <sup>II</sup> (1 equiv.).....	205

#### Chapitre 2-5. Interactions de l'Acide Gallique et la Catéchine avec les Ions du Cuivre et du Fe : Complexation, Oxydation

<b>Tableau 1.</b> Valeurs de pKa des catéchines seuls dans l'eau, stoechiométrie (n) des complexes Fe <sup>III</sup> (ligands)n et leurs constantes apparentes de complexation.....	211
<b>Tableau 2.</b> Analyse HPLC-MS de l'autoxydation (7h) de l'acide gallique (10 <sup>-2</sup> M) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C) en absence d'ion métallique ajouté.....	217
<b>Tableau 3.</b> Analyse HPLC-MS de l'autoxydation (7h) de la catéchine (2x10 <sup>-3</sup> M) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C) en absence d'ion métallique ajouté.....	217
<b>Tableau 4.</b> Complexation de Fe <sup>II</sup> par l'acide gallique. Analyse à 295 nm et 550 nm après 2 min de réaction.....	221
<b>Tableau 5.</b> Complexation Fe <sup>II</sup> -acide gallique (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 550 nm sur 2 min. Concentration d'acide gallique = 50 µM.....	224
<b>Tableau 6.</b> Autoxydation de l'acide gallique induite par Cu <sup>II</sup> (tampon phosphate/MeOH (95/5) à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 400 nm sur 1 h. Concentration d'acide gallique = 50 µM. Traitement monoexponentiel.....	234
<b>Tableau 7.</b> Analyse HPLC-MS des produits d'oxydation de l'acide gallique (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C) formés après 7h d'autoxydation.....	237
<b>Tableau 8.</b> Analyse cinétique du déclin de A(580 nm) sur 1 min (2 <sup>e</sup> phase après complexation rapide) du complexe Fe <sup>II</sup> -catéchine (tampon phosphate 0,01/MeOH 95/5 à pH 7,4, 37°C). Concentration de catéchine = 50 µM. ρ = rapport molaire Fe <sup>II</sup> /catéchine.....	242
<b>Tableau 9.</b> Autoxydation de la catéchine (50 µM) dans le tampon phosphate à pH 7,4, 37°C. Analyse cinétique de la croissance de A(440 nm) entre 2000 et 3000 s.....	245
<b>Tableau 10.</b> Autoxydation de la catéchine (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Analyse cinétique de la croissance de A(395 nm), A(440 nm) et A(480 nm). Concentration de catéchine = 50 µM.....	248

#### Chapitre 2-6. Discussion et conclusion

<b>Tableau 1.</b> Récapitulation des données d'autoxydation spontanée des polyphénols sélectionnées dans le mélange tampon phosphate/MeOH 95/5 (pH=7,4, 37°C).....	256
--	-----

#### Chapitre 3. Interactions des polyphénols avec les ions du Cuivre : Pouvoir antioxydant

<b>Tableau 1.</b> Valeurs de IC <sub>50</sub> pour l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (Tween 20 / tampon phosphate, pH 7,4, 37°C) initiée par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 mM) et Cu <sup>II</sup> (50 µM).....	272
--	-----

**Troisième partie: Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel**

Chapitre 1. Matériels & Méthodes

**Tableau 1.** Gradient d'élution.....285

Chapitre 2. Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel

**Tableau 1.** Teneurs en phénols totaux d'extrait du thé vert avec  $\pm$  ET (n = 3) exprimé en mg d'acide gallique/g de thé. M.O = micro-ondes et C.C = Chauffage conventionnel.....299

**Tableau 2.** Analyse CLHP-DAD-MS des extraits du thé obtenus par MO et CC.....301

**Tableau 3.** La teneur phénolique dans les extraits du thé vert de différents techniques d'extraction (n=3).....302

**Tableau 4.** Composition chimique des extraits de thé vert obtenus par MO et CC.....302

**Tableau 5.** Rapport de la vitesse de peroxydation inhibée par extrait du thé sur la vitesse de peroxydation non nhibée.....306

## Liste des figures

Première Partie. Etude Bibliographique

Chapitre 1. Les Polyphénols, Structures, Stabilités et Propriétés

<b>Figure 1.</b> Exemples d'acide phénoliques.....	9
<b>Figure 2.</b> Structure de base des flavonoïdes.....	10
<b>Figure 3.</b> Biosynthèse des flavonoïdes.....	12
<b>Figure 4.</b> Structures chimiques des flavones et des flavonols.....	13
<b>Figure 5.</b> Structures chimiques des flavanones et flavanonols.....	14
<b>Figure 6.</b> Structures chimiques des flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.....	15
<b>Figure 7.</b> Structures chimiques des anthocyanes.....	15
<b>Figure 8.</b> Structures chimiques des chalcones et aurones.....	16
<b>Figure 9.</b> Formes mésomères du phénol.....	18
<b>Figure 10.</b> Oxydation mono-électronique d'un phénol et formes mésomères.....	19
<b>Figure 11.</b> Effet hydrophobe.....	20
<b>Figure 12.</b> Oxydation des polyphénols présentant un noyau catéchol et principales formes oxydées (o-quinones et semi-quinones).....	25
<b>Figure 13.</b> Réaction de transfert d'atome H depuis l'acide caféique, (En Kcal mol <sup>-1</sup> , BDE = bond dissociation energy : capacité du phénol à céder un hydrogène).....	26
<b>Figure 14.</b> Produits d'oxydation de l'acide caféique par voie de dimérisation.....	27
<b>Figure 15.</b> Produits d'oxydation de la catéchine par voie de dimérisation.....	28
<b>Figure 16.</b> Produits d'oxydation de la quercétine.....	29
<b>Figure 17.</b> Formation des espèces oxygénées activées (EOA).....	32
<b>Figure 18.</b> Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.....	33
<b>Figure 19.</b> Relation structure-activité des flavonoïdes sur l'inhibition de la xanthine oxydase (les valeurs sont les IC50).....	35
<b>Figure 20.</b> Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Men+).....	37
<b>Figure 21.</b> Piégeage des EOR par les flavonoïdes.....	38
<b>Figure 22.</b> Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonoïdes. Les valeurs sont exprimées en mM.....	39
<b>Figure 23.</b> Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3. Les valeurs sont exprimées en mM.....	40
<b>Figure 24.</b> Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol sur le cycle B pour l'activité antioxydante des flavones. Les valeurs sont exprimées en mM.....	41
<b>Figure 25.</b> Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones. Les valeurs sont exprimées en mM.....	41
<b>Figure 26.</b> Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones. Les valeurs sont exprimées en mM.....	42
<b>Figure 27.</b> Structure chimique de la butéine.....	43
<b>Figure 28.</b> Activité antioxydante de la catéchine et de la catéchine gallate.....	44
<b>Figure 29.</b> Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidines. Les valeurs sont exprimées en mM.....	45
<b>Figure 30.</b> Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	46
<b>Figure 31.</b> Mécanisme de formation d'espèces réactives par l'acide gallique, métabolite du propylgallate.....	50

## Chapitre 2. Thé vert, consommation, composition et propriétés biologiques

**Figure 1.** Les principales étapes du traitement des feuilles de théiers après récolte.....56

Figure 2. Les catéchines de thé vert .....60

**Figure 3.** Biosynthèse des catéchines dans les feuilles de « *Camellia sinensis* ».....63

Deuxième partie. Interactions de Polyphénols de l'alimentation avec les ions du fer et du cuivre, conséquences sur leur oxydation à l'air et leur pouvoir antioxydant.

## Chapitre 1. Matériels &amp; Méthodes

**Figure 1.** Courbe d'étalonnage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....76

## Chapitre 2. Interactions de Polyphénols avec les ions du Cuivre et du Fer: Complexation et Oxydation

## Chapitre 2-2. Interactions de la Quercétine avec les Ions du Cuivre et du Fer:Complexation, Oxydation

**Figure 1.** Structure chimique de la quercétine .....96

**Figure 2.** Spectres UV-visible de la complexation de FeII ou FeIII (1 équiv.) par la quercétine (50µM) dans le mélange tampon acétate (0,2 M) / MeOH (1/1) à 37°C et pH 5. Spectres enregistrés 10 min après addition des ions métalliques .....97

**Figure 3.** Complexation de la quercétine par différents équiv. de FeIII (A) et FeII (B) dans le mélange tampon acétate (0,2M)/MeOH (1:1) (pH 5, 37°C).. Concentration de la quercétine = 50µM.....98

**Figure 4.** Spectre UV-visible de la complexation. quercétine-FeIII (A) et quercétine-FeII (B) (0-1,5 équiv.) (tampon acétate 0,2M/méthanol 1/1, pH 5, 37°C) Concentration de la quercétine = 50µM.....99

**Figure 5.** Spectres UV-visible de la complexation de FeII ou FeIII (1 équiv.) par la quercétine dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/méthanol (95/5) à 37°C et pH 7,4. FeIII. Spectres enregistrés 2 min après addition des ions métalliques.....102

**Figure 6.** Spectres UV-visible de la complexation du CuII ou CuI (1 équiv.) par la quercétine (50µM) dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/méthanol (95/5) à 37°C et pH 7,4. Spectres enregistrés 1 min après addition des ions métalliques.....105

**Figure 7.** Variation de l'absorbance à 460 nm en fonction du temps pour différents rapport molaire CuII/quercétine. Quercétine = 50 µM.....105

**Figure 8.** Complexation de la quercétine (50µM) par CuI dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95:5) (pH 7,4, 37°C.....107

**Figure 9.** Autoxydation de la quercétine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C). .....109

**Figure 10.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine. Autoxydation de la quercétine (0.01 M) dans un mélange de tampon phosphate (0.01M)/ MeOH, pH 7.4, 37°C, durant 7h.....110

**Figure 11.** Autoxydation de la quercétine (50µM) initiée par (1équiv.) FeII (Figure 11a) et par FeIII (Figure 11b) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4). Variation de A(460 nm) en fonction du temps et (0.5-2 équivalents) de FeII (Figure 11c). Cinétique de consommation de la quercétine (380 nm) et d'apparition des produits d'oxydation en présence de FeIII (1 équiv.) (Figure 11d).....114

**Figure 12.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine. Autoxydation sur 7h de la quercétine (0.01 M) initiée par (2 équiv.) FeII dans un mélange de tampon phosphate (0.01M)/ MeOH, pH 7.4, 37°C.....118

**Figure 13.** Variation de la concentration de FeII en fonction du temps dans le tampon phosphate 0,01 M (pH 7,4, 37°C) en présence ou en absence de quercétine (100 µM).....120

<b>Figure 14.</b> Autoxydation de la quercétine (5x10 <sup>-5</sup> M) en présence d'EDTA (5x10 <sup>-4</sup> M) après addition d'ion du fer dans un tampon phosphate (0,01 M) (pH 7,4, 37°C). Fig. A : 1 équiv. de Fe <sup>II</sup> . Fig. B : variation de A(380 nm) et A(330 nm) en fonction du temps pendant l'addition d'1 équiv. de Fe <sup>II</sup> à une solution de la quercétine (50µM).....	121
<b>Figure 15.</b> Production de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans une solution de quercétine (100 µM) en présence d'ion métallique (1 equiv.) (Tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4, 37°C).....	125
<b>Figure 16.</b> Autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence de CuI (a) ou de CuII (b) (2 équiv.) dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....	126
<b>Figure 17.</b> Variation de A(330 nm), A(420 nm) (partie a) et de A(380 nm) (partie b) lors de l'autoxydation de la quercétine (50 µM) en présence de 2 équiv. de CuI (pH 7,4, 37°C).....	127
<b>Figure 18.</b> Autoxydation de la quercétine (50µM) en présence de CuII (1 équiv. ) et d'EDTA (10 equiv.) dans un mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....	129
<b>Figure 19.</b> Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine. Autoxydation sur 7h de la quercétine (0.01 M) initiée par (2 équiv.) CuII dans un mélange de tampon phosphate (0.01M)/ MeOH, pH 7.4, 37°C.....	130
<b>Figure 20.</b> Variation de la concentration du CuI en fonction du temps dans le tampon phosphate 0,01 M (pH =7,4, 37°C) en présence ou en absence de quercétine (50 µM).....	133
<b>Figure 21.</b> Oxydation de la quercétine (50 µM) par FeIII (50 µM) dans un mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1) (pH 1.4, 37°C).....	136
Figure 22. Variation de l'absorbance à 370 nm de la quercétine en fonction du temps après addition de Fe <sup>III</sup> (2,5 équiv.) (mélange HCl 0,1 M/MeOH (1/1), pH 1.4, 37°C).....	137
 <u>Chapitre 2-3. Interactions de la Rutine avec les Ions du Cuivre et du Fer: Complexation, Oxydation</u>	
<b>Figure 1.</b> a) Structure chimique de la rutine. b) Sites de complexation métallique de la rutine.....	142
<b>Figure 2.</b> Analyse CLHP-UV des produits d'oxydation de la rutine 10 <sup>-3</sup> M . Autoxydation sur 10 h de la rutine dans le tampon phosphate pH 7.4, 37°C.....	144
<b>Figure 3.</b> Complexation de la rutine (50µM) par 1 équiv. de FeII /FeIII dans le tampon phosphate /MeOH (1/1) à pH =7.4 et T= 37°C.....	145
<b>Figure 4.</b> Confirmation de la stoechiométrie 1 :1 pour : a) le complexe rutine (50µM)-Fe <sup>III</sup> . b) rutine (50µM)-Fe <sup>III</sup> (Tampon phosphate 0,01M/MeOH 1/1pH =7.4, 37°C).....	146
Figure 5. Suivi cinétique de la complexation rutine-FeIII (tampon phosphate 0,01M/MeOH 95/5, pH 7,4,37°C).....	146
Figure 6. Suivi cinétique de la complexation de la rutine par les ions du fer dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. a) Fer/rutine = 1. b) Fer/rutine = 2.....	148
<b>Figure 7.</b> Suivi cinétique de la complexation de la rutine (50 µM) par les ions du fer dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. a) Fer/rutine = 2. b) Fer/rutine =1.....	149
Figure 8. Autoxydation de FeII (100 µM) en absence ou en présence de rutine (1 équiv.) (tampon phosphate pH 7,4, 37°C).....	152
Figure 9. Complexation de la rutine (50 µM) par 2 équiv. CuII et CuI dans un mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C. Complexation de rutine-CuI/CuII sur une minute.....	153
Figure 10. Suivi cinétique de la complexation rutine-CuII à pour différents rapports molaires rutine/CuII (Tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).....	154
Figure 11. Tracé de l'absorbance finale du complexe en fonction du rapport molaire Cu/rutine. Complexes rutine-CuII (11 a) et rutine-CuI (11 b) (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH7,4,37°C).....	155

Figure 12. Suivi cinétique de la complexation rutine-CuI pour différents rapports molaires CuI/rutine (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).....	156
Figure 13. Complexation de la rutine par CuI. Variation de A(400 nm) et de A(210 nm) en fonction du temps (tampon phosphate (0,01 M)/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).....	157
Figure 14. Suivi cinétique sur 1h de l'autoxydation de la rutine (50µM) initiée par 1 équiv. FeII ou FeIII dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	160
Figure 15. Suivi cinétique de l'autoxydation de la rutine (50µM) en présence de FeIII.....	160
Figure 16. Suivi cinétique de l'autoxydation de la rutine (50µM) en présence de FeII.....	161
Figure 17. Concentrations de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> accumulées lors de l'autoxydation de la rutine (100 µM) en présence d'ion métallique (1 equiv.) (tampon phosphate, pH 7,4, 37°C).....	162
<b>Figure 18.</b> Analyse CLHP-UV-DAD d'oxydation de la rutine (10-3M) en présence 2 équiv FeIII. Autoxydation de la rutine en présence FeIII pendant 7h dans le tampon phosphate pH 7.4, 37°C.....	162
<b>Figure 19.</b> Suivi cinétique d'oxydation de la rutine (50 µM) en présence 3 équiv de FeII avec et sans 10 équiv de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 37°C et pH 7.4.....	163
<b>Figure 20.</b> a) Autoxydation de la rutine (50 µM) en présence de CuI (50 µM) (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4 37°C). b) Suivi cinétique pour différents rapports molaires CuI/rutine.....	165
<b>Figure 21.</b> a) Autoxydation de la rutine (50 µM) en présence de CuII (50 µM) (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4 37°C). b) Suivi cinétique pour différents rapports molaires CuII/rutine.....	166
<b>Figure 22.</b> Analyse CLHP-UV-DAD d'oxydation de la rutine (10-3M) en présence 2 équiv CuII. Autoxydation de la rutine en présence CuII pendant 7h dans le tampon phosphate pH 7.4, 37°.....	166
Figure 23. Evolution de la teneur en CuI en absence ou en présence de rutine (1 equiv.) (tampon phosphate pH 7,4, 37°C).....	168
Figure 24. a) Suivi cinétique de l'évolution du complexe rutine-CuI en présence de différents rapports molaires CuI/rutine et de 10 équiv. de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C) b) Oxydation de la rutine (50 µM) en présence du CuI (1 équiv.) et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 équiv.).....	169
Figure 25. Analyse HPLC-UV des produits d'oxydation de la rutine 10-3 M dans le tampon phosphate 0.01M/ MeOH 95/5 après 7h d'oxydation à T= 37°C, pH= 7.4. Autoxydation de la rutine catalysée par 2 équiv. de CuII en présence de 10 équiv. de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	171
 <b>Chapitre 2-4. Interactions de l'Acide Caféique avec les Ions du Cuivre et du Fer :Complexation, Oxydation</b>	
<b>Figure 1.</b> a) Autoxydation de l'acide caféique (50µM) dans un mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. b) Variation de l'absorbance des produits d'oxydation de AH <sub>2</sub> à 390 nm en fonction du temps.....	179
<b>Figure 2.</b> Analyse CLHP des produits d'autoxydation de l'acide caféique (10-3 M) après 7h de réaction dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	180
<b>Figure 3.</b> Les spectres UV-visible de l'acide caféique (t <sub>R</sub> = 15.2 min) et son dimère (t <sub>R</sub> =17.1 min).....	181
<b>Figure 4.</b> Complexation de FeII/FeIII (50 µM) par l'acide caféique (1 équiv.) dans un mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	183
<b>Figure 5.</b> Suivi cinétique de A(360 nm) et A(285 nm) lors de la complexation AH <sub>2</sub> -FeIII (tampon phosphate 0,01M/MeOH 95/5, pH =7,4, 37°C). Concentration de l'acide caféique= 50 µM, FeIII=100µM.....	184

<b>Figure 6.</b> Complexation de l'acide caféique (50µM) par FeII (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 360 nm (fig. a), 600 nm (fig. b), 285 nm (fig. c) et 390 nm (fig. d) sur 1 min.....	187
<b>Figure 7.</b> Evolution de l'absorbance à 360 et 285 nm après addition de FeII/III (1 équiv.) à une solution d'acide caféique (50 µM) dans un tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	190
<b>Figure 8.</b> Autoxydation de FeII (100 µM) dans le tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) en présence ou en absence d'acide caféique AH2 (1 équiv.), 37°C et pH =7,4.....	190
<b>Figure 9.</b> Concentration de H2O2 produite au cours d'une heure d'autoxydation de l'acide caféique (100 µM) en présence d'ions métallique (1 equiv.), pH 7,4, 37°C.....	191
<b>Figure 10.</b> Complexation de CuI (fig. a) et CuII (fig. b) par l'acide caféique (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C. Acide caféique = 50µM.....	192
<b>Figure 11.</b> Complexation de CuII (0,5 à 2 équiv.) par l'acide caféique (pH= 7,4, 37°C). Suivi spectroscopique à 390, 350, 285 et à 210 nm sur une minute. Acide caféique = 50 µM.....	193
<b>Figure 12.</b> Evolution du degré d'oxydation des ions du cuivre dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) avec ou sans AH2 (1 équiv.), pH 7,4, 37°.....	194
<b>Figure 13.</b> Complexation de CuI (0,5 à 2 équiv.) par l'acide caféique (50 µM). Suivi spectroscopique à 390, 350, 285 et 210 nm (pH 7,4, 37°C).....	196
<b>Figure 14.</b> Autoxydation de l'acide caféique (50 µM) initiée par FeII (fig. 14a) ou FeIII (fig. 14b) (1 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) (pH 7,4).....	198
<b>Figure 15.</b> Evolution des absorbances à 390, 360 et 600 nm après addition de FeII (1 équiv.) à une solution d'acide caféique (50µM) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	198
<b>Figure 16.</b> Evolution de A(390 nm) et A(360 nm) pendant l'autoxydation de l'acide caféique (50 µM) en présence de FeII/FeIII (1 equiv.) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	200
<b>Figure 17.</b> Autoxydation de l'acide caféique (50µM) initiée par CuI (fig. 17a) ou CuII (fig.17b) (1 équiv.) dans le mélange tampon phosphate (0.01 M)/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....	201
<b>Figure 18.</b> Evolution des absorbances à 390, 350, 210 et 260 nm au cours de l'autoxydation de l'acide caféique (50 µM) en présence de CuI ou CuII (1 equiv.) (tampon phosphate, pH 7,4, 37°C).....	202
<b>Figure 19.</b> Analyse CLHP des produits d'autoxydation de l'acide caféique (10-3M) produits après 7h de réaction en présence de CuII (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	204
<b>Figure 20.</b> Les spectres UV-visible de l'acide caféique et ses produits d'oxydation.....	205
<b>Chapitre 2-5.</b> Interactions de l'Acide Gallique et la Catéchine avec les Ions du Cuivre et du Fer :Complexation, Oxydation	
<b>Figure 1.</b> a) Autoxydation de l'acide gallique (50 µM) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. b) Variation de l'absorbance des produits d'oxydation de GH2 à 330 nm en fonction du temps.....	213
<b>Figure 2.</b> a) Autoxydation de la catéchine (50 µM) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), 37°C, pH 7,4. b) Variation de l'absorbance des produits d'oxydation de CH2 à 450 nm en fonction du temps.....	214
<b>Figure 3.</b> Teneur de H2O2 produite lors de l'autoxydation de l'acide gallique et de la catéchine dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. Concentration initiale de phénol = 100 µM.....	215
<b>Figure 4.</b> Chromatogramme CLHP des produits d'autoxydation de l'acide gallique (0.01 M) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....	216
<b>Figure 5.</b> Chromatogramme CLHP des produits d'autoxydation de la catéchine (2x10-3 M) dans le	

	mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5) (pH 7,4, 37°C).....	216
<b>Figure 6.</b>	Complexation de l'acide gallique (50 µM) par un FeII/FeIII et CuI/CuII (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M) / MeOH (95/5) (37°C, pH 7,4).....	219
<b>Figure 7.</b>	Variations spectrales en fonction du temps après addition de FeIII (0,5-2 équiv., partie a) et de FeII (0,5-2 équiv., partie b) à une solution d'acide gallique (50 µM) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	220
<b>Figure 8.</b>	Tracé de A (550 nm) en fonction du temps après addition de FeII/FeIII (1 equiv.) à une solution d'acide gallique (50µM) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	221
<b>Figure 9.</b>	Tracé de Amax(550 nm) (ca. 2 min après addition de FeII, plateau stable) en fonction de la concentration totale de FeII. La courbe est le résultat de l'analyse quantitative pour la détermination de la constante de complexation.....	222
<b>Figure 10.</b>	Tracé de Amax(295 nm) en fonction de la concentration totale de FeII (Mt). La courbe est le résultat de l'analyse quantitative pour la détermination de la constante de complexation.....	222
<b>Figure 11.</b>	Autoxydation de FeII (100 µM) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) en présence et en absence d'acide gallique (1 équiv.) (37°C, pH 7,4).....	223
<b>Figure 12.</b>	Concentration de H2O2 produite sur une heure d'autoxydation de l'acide gallique (100 µM) en présence (1 équiv.) des ions du fer et du cuivre (pH 7,4, 37°C).....	224
<b>Figure 13.</b>	Tracés de A(230 nm) (a) et A(300 nm) (b) en fonction du temps après addition de CuI (0,5-2 équiv.) à une solution d'acide gallique (50 µM) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	225
<b>Figure 14.</b>	Tracés de A(230 nm) (a) et A(300 nm) (b) en fonction du temps après addition de CuII (0,5-2 équiv.) à une solution d'acide gallique (50µM) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	226
<b>Figure 15.</b>	Tracé de Amax(300 nm) en fonction de la concentration totale de CuI.....	226
<b>Figure 16.</b>	Tracé de Amax(300 nm) en fonction de la concentration totale de CuII.....	227
<b>Figure 17.</b>	Evolution de l'état redox des ions du cuivre (1 équiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) avec ou sans acide gallique (100 µM) (pH 7,4, 37°C).....	228
<b>Figure 18.</b>	Autoxydation sur une heure de l'acide gallique (50 µM) en présence d'ion métallique (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C. a) en présence de FeII. b) en présence de FeIII. c) en présence de CuI. d) en présence de CuII.....	229
<b>Figure 19.</b>	Suivi spectroscopique de l'autoxydation de l'acide gallique (50 µM) en présence de FeII(0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	230
<b>Figure 20.</b>	Suivi spectroscopique de l'autoxydation de l'acide gallique (50 µM) en présence de FeIII (0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	231
<b>Figure 21.</b>	Suivi cinétique à 230 nm, 300 nm et 400 nm de l'autoxydation de l'acide gallique (50 µM) en présence de CuI(0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C.....	232
<b>Figure 22.</b>	Suivi cinétique à 230 nm, 300 nm et 400 nm de l'autoxydation de l'acide gallique (50 µM) en présence de CuII (0,5-2 équiv.) dans le mélange tampon phosphate/MeOH (95/5) à pH 7,4 et 37°C.....	233
<b>Figure 23.</b>	Tracé de la constante apparente d'autoxydation de l'acide gallique (suivi cinétique à 400 nm sur 1h) en fonction de la concentration totale d'ion métallique (tampon phosphate/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C).....	235
<b>Figure 24.</b>	Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de l'acide gallique (10-2 M) après 7h d'autoxydation en présence de 2 équiv. de CuII dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....	236
<b>Figure 25.</b>	Changements spectraux observés une minute après addition d'un équivalent d'ion métallique à une solution de catéchine (50 µM) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5) à 37°C et pH 7,4.....	239
<b>Figure 26.</b>	Suivi spectroscopique de la complexation de la catéchine (50 µM) par FeII (0,5-2 équiv.) dans le tampon phosphate (pH 7,4, 37°C).....	240

**Figure 27.** Tracés de A(280 nm), A(295 nm) et A(580 nm) en fonction du rapport molaire FeII/catéchine. Concentration de catéchine = 50  $\mu$ M (tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C).....241

**Figure 28.** Evolution du degré d'oxydation des ions du fer (1 equiv.) en absence et en présence de catéchine (100  $\mu$ M) dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C.....242

**Figure 29.** Dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé durant une heure d'autoxydation de la catéchine (100  $\mu$ M) en présence d' 1 equiv. d'ion métallique dans le mélange tampon phosphate 0,01 M/MeOH 95/5, pH 7,4, 37°C.....243

**Figure 30.** Tracé de A(295 nm) en fonction du temps après addition de 0,5-2 equiv. de CuI (a) ou de CuII (b) à une solution de catéchine (50  $\mu$ M) (tampon phosphate à pH 7,4, 37°C).....243

**Figure 31.** Evolution du degré d'oxydation des ions du cuivre (1 equiv.) avec ou sans catéchine (100  $\mu$ M) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....244

**Figure 32.** Autoxydation de la catéchine (50  $\mu$ M) en présence d'ion métallique (1 equiv.) dans le mélange tampon phosphate (0,01 M)/MeOH (95/5), pH 7,4, 37°C.....245

**Figure 33.** Variation de A(395 nm) et A(440 nm) sur une heure d'autoxydation de la catéchine (50  $\mu$ M) en présence d'un équivalent de CuI (a) et de CuII (b), pH 7,4, 37°C.....246

**Figure 34.** Vitesse d'autoxydation relative de la catéchine (déduite de l'analyse cinétique de A(440 nm) en fonction du temps) en présence de CuI (●) ou de CuII (■). catéchine = 50  $\mu$ M).....247

**Figure 35.** Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la catéchine (10-3 M) en présence de CuII (2 equiv) après 7h de réaction, tampon phosphate à pH 7,4, 37°C.....249

### Chapitre 3. Interactions des polyphénols avec les ions du Cuivre : Pouvoir antioxydant

**Figure 1.** Structure des hydroperoxydes formés pendant la peroxydation de l'acide linoléique.....267

**Figure 2.** Décomposition des tétraoxydes formés dans la phase de terminaison.....267

**Figure 3.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C de quercétine.....269

**Figure 4.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C de rutine.....270

**Figure 5.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C de catéchine.....270

**Figure 6.** Tracé du rapport de la vitesse de peroxydation inhibée sur la vitesse de peroxydation non inhibée en fonction de la concentration de rutine.....271

**Figure 7.** Tracé du rapport de la vitesse de peroxydation inhibée sur la vitesse de peroxydation non inhibée en fonction de la concentration de la quercétine.....272

**Figure 8.** Inhibition par la rutine (7,5  $\mu$ M) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 370 nm de la consommation de la rutine libre.....273

**Figure 9.** Inhibition par la quercétine (12,5  $\mu$ M) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C).....274

**Figure 10.** Inhibition par la catéchine (10  $\mu$ M) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 440 nm de l'accumulation des produits d'oxydation de la catéchine.....274

**Figure 11.** Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) et CuII (50  $\mu$ M) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C d'acide gallique.....275

<b>Figure 12.</b> Accumulation des hydroperoxydes lipidiques lors de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 mM) et CuI (50 µM) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Inhibition par différentes concentrations C d'acide caféique.....	276
<b>Figure 13.</b> Peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 mM) et CuI (50 µM) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 295 nm de l'accumulation des produits d'oxydation de l'acide gallique.....	276
<b>Figure 14.</b> Inhibition par l'acide caféique (10 µM) de la peroxydation de l'acide linoléique (2 mM) initiée par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 mM) et CuI (50 µM) (Tween 1,22 M dans tampon phosphate à pH 7,4, 37°C). Suivi à 310 nm de la consommation de l'acide caféique.....	277
<b>Troisième partie:</b> Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel	
<b>Chapitre 1. Matériels &amp; Méthodes</b>	
<b>Figure 2.</b> Extraction des polyphénols du thé sous chauffage micro-ondes (montage) .....	286
<b>Figure 2.</b> Courbe étalon de l'absorbance du complexe molybdène tungstène phénolate (760nm) en fonction de la masse gallique en µg.....	287
<b>Figure 2.</b> Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	288
<b>Figure 3.</b> La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	288
<b>Figure 4.</b> La courbe d'étalonnage de la rutine.....	289
<b>Chapitre 2. Etude comparée de l'extraction des polyphénols du thé vert sous chauffage micro-ondes et chauffage conventionnel</b>	
<b>Figure 1.</b> Gradient de température au sein d'un composé solide soumis a)au chauffage conventionnel par conduction; b) à l'exposition aux micro-ondes.....	294
<b>Figure 2.</b> Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes.....	295
<b>Figure 3a.</b> Variation de l'absorbance à l= 280 nm en fonction du temps des extraits de thé obtenus par chauffage conventionnel (CC) et sous micro-ondes (MO).....	297
<b>Figure 3b.</b> Variation de l'absorbance à l = 330 nm en fonction du temps des extraits de thé obtenus par chauffage conventionnel (CC) et sous micro-ondes (MO).....	298
<b>Figure 3c.</b> Variation de l'absorbance à l = 350 nm en fonction du temps des extraits de thé obtenus par chauffage conventionnel (CC) et sous micro-ondes (MO).....	298
<b>Figure 4.</b> Chromatogramme CLHP des extraits du thé vert obtenus par CC à 80°C durant 45 min (A) et MO à 100°C durant 20min (B). 1 = acide gallique, 2 = acide 5-galloylquinique, 3 = gallocatéchine (GC), 4 = epigallocatéchine (EGC), 5 = catéchine (C), 6= caféine, 7 = épicatechine (EC), 8 = epigallocatéchine gallate (EGCG), 9 = rutine (quercétine-3-rutinoside), 10 = épicatechine gallate (ECG), 11 = quercétine-3-glucoside ou galactoside, 12 = kaempferol-3-glucoside or galactoside, 13 = kaempferol-3-glucoside ou galactoside.....	300
<b>Figure 5.</b> Caféine et les composés majoritaires de polyphénols dans les infusions de (100°C, MO, 20 min), (100°C, CC, 40 min), 80°C, MO, 30 min) and (80°C, CC, 45 min). mg d'équivalent / g d'extrait thé ± SD (n=3).....	302
<b>Figure 6.</b> Inhibition de peroxydation de l'acide linoléique initiée par CuI et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans le Tween 20 à 37°C, pH=7.4. Inhibition par des extraits du thé obtenus par les 4 processus étudiés: MO, 100°C, 20 min (▲), MO, 80°C, 30 min (■), CC, 80°C, 45 min (●), CC, 100°C, 40 min (×). Control: no antioxidant, (◆).....	306

## Liste des abréviations

ABTS<sup>•-</sup> : Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique),

AG : acide gallique,

AGPI: acide gras polyinsaturé,

AH2: Acide caféique,

BDE : bond dissociation energy,

CC: chauffage conventionnel,

CH2: catéchine,

CLHP: chromatographie liquide à haute performance,

Cu: Cuivre,

DO: degrés d'oxydation,

EC: épicatechine,

ECG:épicatechine gallate,

EDTA : Acide éthylènediamine tétra-acétique,

EGC: épigallocatechine,

EGCG: épigallocatechine gallate,

EOR : espèces oxygénées réactives

Fl-OH : flavonoïde,

Fe: fer,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : hydroperoxyde d'hydrogène,

L: ligand,

LDL : low density lipoprotein,

MO: micro-ondes

OGly: O-glycosyl,

OH: Hydroxyl,

OM : orbital moléculaire,

OMe: O-methyl,

PAF: Platelet Activating Factor,

PAL : phénylalanine-ammonia-lyase,

PI: potentiel d'ionisation,

PPO: polyphénols oxydase,

Q: quinone,

QH2 : quercétine,  
PH2 : polyphénol,  
RMN: résonance magnétique nucléaire,  
RO<sup>•</sup> : radical oxyl,  
ROO<sup>•</sup> : radical peroxy,  
RPE: résonance paramagnétique électronique,  
SM: spectromètre de masse,  
SQ: semi quinone,  
TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity,  
TE: transverse électrique,  
TM: transverse magnétique,  
UV: Ultra-Violet.

## **Publications et participations aux congrès.**

### Publications

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, V. Tomao, O. Dangles, E. El Boustani et F.Chemat. Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. 2009. *J. Phytochemical Analysis, sous press.*

H. El Hajji, **E. Nkhili**, V. Tomao and O. Dangles, 2006. Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research* 40(3): 303-320.

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, V. Tomao, O. Dangles, E. El Boustani et F.Chemat, 2008. Extraction et Caractérisation des Antioxydants du Thé Vert Consommé au Maroc. *Recherches sur les plantes aromatiques et médicinales*. H. Greche & A. Ennabili (éd.) : 397-404.

### *Communications à des colloques internationaux*

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, V. Tomao, E. El Boustani, O. Dangles. Interaction of flavonols with iron and copper ions : complexation and autoxidation. *The International Conference on Polyphenols*. Salamanque 8-11 July, 2008, Espagne, communication par affiche.

H. El Hajji, **E. Nkhili**, V. Tomao and O. Dangles. Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *The International Conference on Polyphenols*. Winnipeg, 22-25 August, 2006, Canada, communication par affiche.

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, V. Tomao, O. Dangles, E. El Boustani et F.Chemat. Extraction et Caractérisation des Antioxydants du Thé Vert Consommé au Maroc. *Congrès International sur les Plantes Médicinales et Aromatiques*. Fès, 22-24 Mars, 2007, Maroc, communication orale.

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, V. Tomao, E. El Boustani et O. Dangles. Interaction of catechin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Colloque International sur la Chimie Moléculaire et Molécules Bioactives*. Meknès, 4-6 Mai 2006, Maroc, affiche.

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, V. Tomao. E. El Boustani and O. Dangles. Interactions of quercetin with iron and copper ions: autoxidation and antioxydant activity, *Transmediterranean Symposium on Organometallic Chemistry and Catalysis*. Marrakech, 5-7 Mai 2005, Maroc, affiche.

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, E. El Boustani and O. Dangles. Influence de la complexation par les ions du fer et du cuivre sur l'oxydation de la quercétine, catéchine, rutine et l'acide gallique. 1<sup>er</sup> *Congrès Maroco-Espagnol (COMECO) sur la Chimie Organique et la 4ème Rencontre Andalou-Marocaine sur la Chimie des Produits Naturels*. Marrakech, 16-18 septembre, 2004, Maroc, affiche.

*Communications à des colloques nationaux*

**Ez. Nkhili**, H. El Hajji, E. El Boustani and O. Dangles. Influence de la complexation par les ions du fer et du cuivre sur l'oxydation des flavonoïdes. *The Third Transmediterranean Colloquium on Heterocyclic Chemistry*. Marrakech, 23-27 novembre, 2004, Maroc, affiche.

# **PUBLICATIONS**

## Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation

HAKIMA EL HAJJI<sup>1</sup>, EZZOHRA NKHILI<sup>2</sup>, VALERIE TOMAO<sup>3</sup>, & OLIVIER DANGLES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculté des Sciences et Techniques-Guéliz, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco, <sup>2</sup>Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco, and <sup>3</sup>UMR A 408 INRA—Université d'Avignon, 33, rue Louis Pasteur, Avignon 84029, France

Accepted by Professor B. Halliwell

(Received 18 October 2005; in revised form 2 November 2005)

### Abstract

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), one of the most abundant dietary flavonoids, has been investigated for its ability to bind Fe<sup>II</sup>, Fe<sup>III</sup>, Cu<sup>I</sup> and Cu<sup>II</sup> in acidic to neutral solutions. In particular, analysis by UV–visible spectroscopy allows to determine the rate constants for the formation of the 1:1 complexes. In absence of added metal ion, quercetin undergoes a slow autoxidation in neutral solution with production of low hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentrations. Autoxidation is accelerated by addition of the metal ions according to: Cu<sup>I</sup> > Cu<sup>II</sup> ≫ Fe<sup>II</sup> ≈ Fe<sup>III</sup>. In fact, the iron-quercetin complexes seem less prone to autoxidation than free quercetin in agreement with the observation that EDTA addition, while totally preventing iron-quercetin binding, slightly accelerates quercetin autoxidation. By contrast, the copper-quercetin complexes appear as reactive intermediates in the copper-initiated autoxidation of quercetin. In presence of the iron ions, only low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be detected. By contrast, in the presence of the copper ions, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is rapidly accumulated. Whereas Fe<sup>II</sup> is rapidly autoxidized to Fe<sup>III</sup> in the presence or absence of quercetin, Cu<sup>I</sup> bound to quercetin or its oxidation products does not undergo significant autoxidation. In addition, Cu<sup>II</sup> is rapidly reduced by quercetin. By HPLC-MS analysis, the main autoxidation products of quercetin are shown to be the solvent adducts on the *p*-quinonemethide intermediate formed upon two-electron oxidation of quercetin. Finally, in strongly acidic conditions (pH 1–2), neither autoxidation nor metal complexation is observed but Fe<sup>III</sup> appears to be reactive enough to quickly oxidize quercetin (without dioxygen consumption). Up to *ca.* 7 Fe<sup>III</sup> ions can be reduced per quercetin molecule, which points to an extensive oxidative degradation.

**Keywords:** Quercetin, flavonoid, metal, iron, copper, complexation

### Introduction

Flavonoids (the main class of polyphenols) are abundant in all parts of plants and in plant-derived foods such as common fruits and vegetables, tea and wine. Beside their important functions in plants, (pigmentation, UV screening, iron uptake, chemical defense against predators, participation in signalling pathways leading to N<sub>2</sub> fixation etc.) they have attracted considerable interest over the last two decades because of their important role in defining the organoleptic properties of foods (colour, flavour) and, possibly, their nutritional value in

terms of preventing the development of degenerative diseases (cardiovascular diseases, cancers, age-related disorders) [1–5]. This last point is substantiated by a wealth of *in vitro* studies that point to the ability of flavonoids to act as antioxidants, enzyme inhibitors and modulators of various biochemical signals.

Interactions of flavonoids with metal ions is also a biologically significant process. For instance, iron complexation has been proposed as a possible antioxidant mechanism in plant nodules where the highly reducing conditions allowing N<sub>2</sub> reduction

Correspondence: O. Dangles, UMRA 408 INRA—Université d'Avignon, 33, rue Louis Pasteur, Avignon 84029, France. Tel: 33 490 14 44 46. Fax: 33 490 14 44 41. E-mail: olivier.dangles@univ-avignon.fr

could also lead to O<sub>2</sub> activation with subsequent production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage to biomolecules [6]. Moreover, complexation of dietary iron in the gastro-intestinal tract is known to lower iron bioavailability and may favour disorders related to iron deficiency, especially in developing countries (anti-nutritional effect) [7]. More generally, the reducing properties of flavonoids and their ability to form stable complexes with iron and copper ions can strongly modulate the redox properties of those metal ions and sustain part of the antioxidant and, eventually, pro-oxidant properties of flavonoids [6,8–16]. This pro-oxidant/antioxidant balance is highly dependent on the environment, especially the presence of other metal chelators and the targeted biomolecules. For instance, flavonoids stimulate Fe<sup>III</sup>-induced hydroxyl radical production from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of EDTA but not in the presence of citrate or ATP [8]. In the absence of chelators, production of the hydroxyl radical by the Fenton reaction (Fe<sup>II</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was also promoted by highly reducing flavonoids such as quercetin [10]. Usually, when lipid peroxidation is initiated by iron- or copper-containing systems, the antioxidant activity of flavonoids prevails [6,9–13] and likely operates by a combination of radical scavenging and metal complexation processes. On the other hand, pro-oxidant and antioxidant effects of flavonoids have been reported in the metal-induced oxidative degradation of proteins and DNA (in the absence or presence of hydroperoxides) [6,14–16]. The pro-oxidant activity of flavonoids can be related to their ability to reduce high-valence metal ions (Fe<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup>) into their low-valence counterparts (Fe<sup>II</sup>, Cu<sup>I</sup>), which can either autoxidize or promote the homolytic cleavage of hydroperoxides with subsequent ROS production. Finally, highly reducing flavonoids are air-sensitive compounds that may undergo autoxidation to yield ROS [17,18]. This poorly understood process is likely mediated by metal traces [19,20] and may participate in flavonoid cytotoxicity, not only because of the ROS produced but also because some flavonoid oxidation products (e.g. aryloxy radicals, *o*-quinones and *p*-quinonemethides) are highly oxidant and/or electrophilic [21–26]. Finally, flavonoid autoxidation is probably a major cause of flavonoid instability during the processing of flavonoid-containing foods, especially during thermal treatments [27].

In this work, interactions of quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), one of the most abundant flavonoid aglycones, with iron and copper ions are investigated in acidic to neutral aqueous solutions. The rate constants and thermodynamic constants of metal complexation are estimated. The influence of added metal ions on the kinetics of quercetin autoxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is also studied as well as the eventual changes in the redox state of the metal ions in the course of the reaction.

## Experimental

All experiments were conducted at 37°C and run in duplicate.

### Materials

Quercetin dihydrate (98%), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (99%), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (97%), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (99.9%), CuCl (99 + %), xylitol orange sodium salt, ferrozine (5,6-diphenyl-3-(2-pyridyl)-1,2,4 triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt hydrate, 97%), bathocuproinedisulfonic acid disodium salt hydrate, butylated hydroxytoluene (BHT) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) were from Sigma-Aldrich. Ethylene diamine tetraacetic acid disodium dihydrate (EDTA) was from Normapur.

The buffers used in the experiments are a 0.2 M acetate buffer (pH 4.0) and a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4). Because of the poor solubility of quercetin, experiments in slightly acidic conditions (pH 5.0) were run in a 1:1 MeOH–acetate buffer mixture.

### Analyses

*Complexation and autoxidation reactions.* The complexation and autoxidation processes were monitored using a HP 8453 diode-array spectrometer equipped with a magnetically stirred quartz cell (optical pathlength: 1 cm). The temperature in the cell was kept at 37°C by means of a thermostated bath. The 5 × 10<sup>-3</sup> M solutions of metal ion were prepared in MeOH (Fe<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup>) or MeOH–0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96:4 (Fe<sup>II</sup>) or MeCN–0.2 M HCl 96:4 (Cu<sup>I</sup>). The Fe<sup>II</sup> and Cu<sup>I</sup> solutions were prepared daily and checked for autoxidation using the proper colorimetric tests (see below).

To 2 ml of the pH 7.4 buffer solution placed in the spectrometer cell were successively added 20 μl of a freshly prepared 5 × 10<sup>-3</sup> M solution of quercetin in MeOH and 10–100 μl of a freshly prepared 5 × 10<sup>-3</sup> M solution of metal ion. Spectra were recorded every 0.5 s over 2 min (complexation) and every 30 s over 120 min (autoxidation). At pH 5, only complexation was investigated (spectra recorded every 5 s over 10 min). Eventually, the order of addition of quercetin and the metal ions into the buffer was reversed to outline the competition between quercetin and phosphate for the metal ions.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> titration [28].* The FOX2 reagent was prepared by mixing a solution of xylitol orange sodium salt (38 mg) and BHT (440 mg) in MeOH (450 ml) with a solution of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (49 mg) in 50 ml of 0.25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hence, the final composition of the FOX2 reagent was: 10<sup>-4</sup> M xylitol orange, 4 × 10<sup>-3</sup> M BHT, 25 × 10<sup>-3</sup> M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 25 × 10<sup>-5</sup> M FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in 90% (v/v) MeOH. Aliquots (0.5 ml) of

a  $10^{-4}$  M solution of quercetin (phosphate pH 7.4, 37°C) in the presence or absence of metal ion (1 equiv) were rapidly taken up, diluted into 1.5 ml of FOX2 reagent at room temperature, and stirred for 10 min. The samples were then transferred to the spectrometer cell for recording the absorbance at 592 nm ( $\lambda_{\max}$  of the  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -xylenol orange complex). In control experiments without quercetin, addition of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  or  $\text{Cu}^{\text{I}}$  to the FOX2 reagent caused a time-dependent increase in A (592 nm) (attributed to slow metal exchange on the xylenol orange ligand) whose amplitude is in the order  $\text{Fe}^{\text{III}} > \text{Cu}^{\text{II}} > \text{Cu}^{\text{I}}$ . The corresponding values at 10 min must be subtracted. Corrections using  $\text{Fe}^{\text{III}}$  apply to any experiment involving iron ions, since  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is rapidly autoxidized to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in the pH 7.4 phosphate buffer. Corrections using  $\text{Cu}^{\text{I}}$  apply to experiments using quercetin and  $\text{Cu}^{\text{I}}$  or  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , since the latter is rapidly reduced to  $\text{Cu}^{\text{I}}$  by quercetin. Since distinct values are obtained for corrections with  $\text{Cu}^{\text{I}}$  and  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , it is assumed that  $\text{Cu}^{\text{I}}$  autoxidation is negligible in the presence of the FOX2 reagent ( $\text{Cu}^{\text{I}}$  rapidly added to a FOX2 reagent-phosphate buffer (3:1) mixture). The  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration is deduced from a calibration curve constructed by mixing the FOX2 reagent (1.5 ml) with aliquots (0.5 ml) of aqueous  $\text{H}_2\text{O}_2$  solutions of known concentrations obtained by dilution of a 0.01 M solution (concentration determined from  $\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2) = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 240 nm). In those conditions, the apparent  $\varepsilon$  value of the  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -xylenol orange complex at 592 nm was  $65 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Fe<sup>II</sup> titration [29].* Aliquots (0.5 ml) of a  $10^{-4}$  M solution of quercetin (phosphate pH 7.4, 37°C) in the presence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  or  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (1 equiv) were rapidly taken up, diluted into 1.5 ml of an aqueous  $10^{-3}$  M ferrozine solution at room temperature, and stirred for 10 min. The samples were then transferred to the spectrometer cell for recording the absorbance at 564 nm ( $\lambda_{\max}$  of the  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -ferrozine complex,  $\varepsilon = 27,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

*Cu<sup>I</sup> titration [30].* Aliquots (0.5 ml) of a  $10^{-4}$  M solution of quercetin (phosphate pH 7.4, 37°C) in the presence of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  or  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (1 equiv) were rapidly taken up, diluted into 1.5 ml of an aqueous  $10^{-3}$  M solution of bathocuproin disulfonate at room temperature, and stirred for 10 min. The samples were then transferred to the spectrometer cell for recording the absorbance at 480 nm ( $\lambda_{\max}$  of the  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -bathocuproin disulfonate complex,  $\varepsilon = 13,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

*Data analysis.* The curve-fittings of the absorbance vs time plots were carried out on a Pentium PC using the scientist program (MicroMath, Salt Lake City, UT). Beer's law and sets of differential kinetic equations

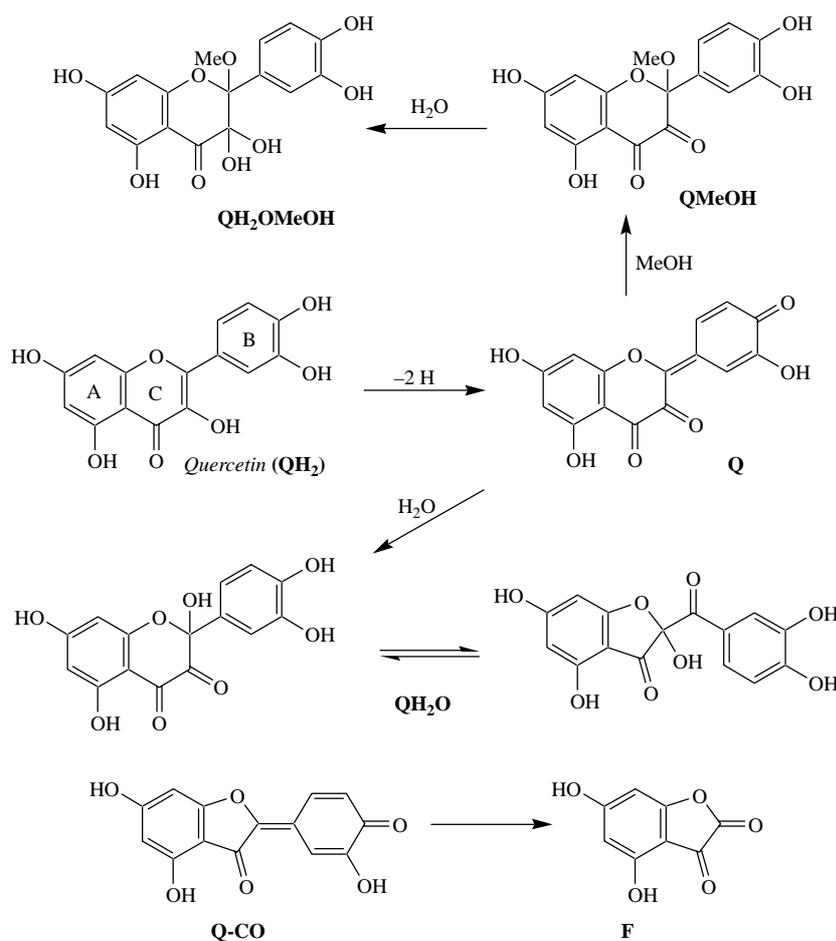
(see text for the kinetic models used) with initial conditions on concentrations were input in the model. Curve-fittings were achieved through least square regression and yielded optimized values for the parameters (kinetic rate constants, molar absorption coefficients, stoichiometries). Standard deviations are reported.

*HPLC-MS experiments.* They were performed on a HP 1050 model equipped with a diode-array detector and coupled to a Micromass LCZ 4000 mass spectrometer. A  $\text{C}_{18}$  column ( $4.6 \times 150$  mm,  $5 \mu\text{m}$  particle size) equipped with a pre-column ( $4.6 \times 7.5$  mm,  $5 \mu\text{m}$  particle size) and kept at 25°C was used. The mobile phase (flow rate:  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ) was a linear gradient of acetonitrile and 0.05% aqueous  $\text{HCO}_2\text{H}$  with 5% MeCN at time 0 and 100% MeCN at 60 min. Mass spectra were recorded in the negative electrospray mode. The Masslynx program was used for data analysis.

## Results and discussion

### *Autoxidation with no added metal ions*

Autoxidation of quercetin ( $\text{QH}_2$ ), which is barely detectable in a pH 5.0 acetate buffer, is significant in a pH 7.4 phosphate buffer (37°C). The spectral changes at 380 nm (quercetin consumption) and at 330 nm (formation of the quercetin autoxidation products QS) both obey an apparent first-order kinetics and give consistent values for the corresponding rate constant:  $k_a = 57.5 (\pm 0.3) \times 10^{-6}$  and  $56.7 (\pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Hence, the half-life of quercetin is roughly 3.4 h in these conditions. In addition, the following molar absorption coefficients can be estimated:  $\varepsilon(\text{QH}_2, 380 \text{ nm}) = 18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon(\text{QS}, 330 \text{ nm}) = 19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon(\text{QH}_2, 330 \text{ nm}) = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . From the literature and our previous works [31–35], we assume that the autoxidation products (QS) detectable at 330 nm result from solvent addition ( $\text{S} = \text{H}_2\text{O}$  or MeOH) on the *p*-quinonemethide (Q) formed by two-electron oxidation of quercetin (Scheme 1, QS stands for QMeOH,  $\text{QH}_2\text{O}$  and  $\text{QH}_2\text{OMeOH}$  taken collectively). This can be confirmed by HPLC-MS analysis (Table I). It can be noted that even the low MeOH content of the neutral buffer used in this work was sufficient for the detection of *p*-quinonemethide-MeOH adducts (QMeOH,  $\text{QH}_2\text{OMeOH}$ ). In the course of quercetin autoxidation, an apparent zero-order formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with  $R(\text{H}_2\text{O}_2) = 3 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$  (quercetin concentration =  $10^{-4}$  M) could be evidenced over 3 h. Hence, after 3 h, it can be estimated that *ca.*  $3 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  has accumulated whereas almost  $50 \mu\text{M}$  quercetin has been consumed.



Although, it may be tempting to consider the first step of quercetin autoxidation as a direct electron transfer from quercetin (mainly, a dianion at pH 7.4 [36]) to dioxygen, it must be noted that the corresponding thermodynamics is quite unfavourable since the redox potential of the  $\text{QH}/\text{QH}_2$  and  $\text{O}_2(\text{dissolved})/\text{O}_2^{\cdot-}$  couples at pH 7 are 0.33 [37] and  $-0.16$  V, respectively. In fact, the combination of unfavourable thermodynamics and spin restrictions ( $\text{O}_2$  is a spin 1 molecule) should make the direct electron transfer a very slow process [19]. Hence,

catalysis by unidentified metal traces must operate [20]. In the presence of quercetin and its oxidation products, these metal traces could efficiently decompose  $\text{H}_2\text{O}_2$  (formed during quercetin autoxidation), thereby preventing its accumulation.

#### Iron-quercetin complexation at pH 5

The spectral changes following the addition of iron ions to a pH 5 acetate buffer containing quercetin can be ascribed to pure complexation. Indeed, no increase

Table I. HPLC-MS data for the autoxidation of quercetin ( $10^{-4}$  M) with or without added  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (1–2 equiv, added last) in 0.01 M phosphate buffer–MeOH (95:5) (pH 7.4, 37°C). Analysis after 15 h (no added  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) or 1–6 h (+ $\text{Fe}^{\text{III}}$ ).

Retention time/min	$m/z^*$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	Structure <sup>†</sup>
14.0	317, 299, 261, 255, 199, 179, 163, 137	292	$\text{QH}_2\text{O}$
16.0	331, 299, 271, 261, 217, 199, 187, 137	292	QMeOH
19.1 <sup>‡</sup>	349, 331, 299, 271	292	$\text{QH}_2\text{OMeOH}$
22.8	301, 179, 151	254, 370	$\text{QH}_2$

\* Molecular mass of possible structures and fragments:  $\text{QH}_2\text{OMeOH} = 350$ ,  $\text{QMeOH} = 332$ ,  $\text{QH}_2\text{O} = 318$ ,  $\text{Q} = 300$ ,  $\text{Q-CO} = 272$ ,  $\text{QH}_2\text{O-2CO} = 262$ ,  $\text{Q-CO}_2 = 256$ ,  $\text{Q-CO} = 272$ ,  $\text{QH}_2\text{O-2CO-CO}_2 = 218$ ,  $\text{Q-2CO-CO}_2 = 200$ ,  $\text{F} = 180$ ,  $\text{F-O} = 164$ ,  $\text{F-CO} = 152$ , dihydroxybenzaldehyde = 138. <sup>†</sup> See Scheme 1 quercetin ( $\text{QH}_2$ ), *p*-quinonemethide-water adduct ( $\text{QH}_2\text{O}$ ), *p*-quinonemethide-MeOH adduct (QMeOH), *p*-quinonemethide-water-MeOH adduct ( $\text{QH}_2\text{OMeOH}$ ). <sup>‡</sup> Detected in the absence of added  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , only.

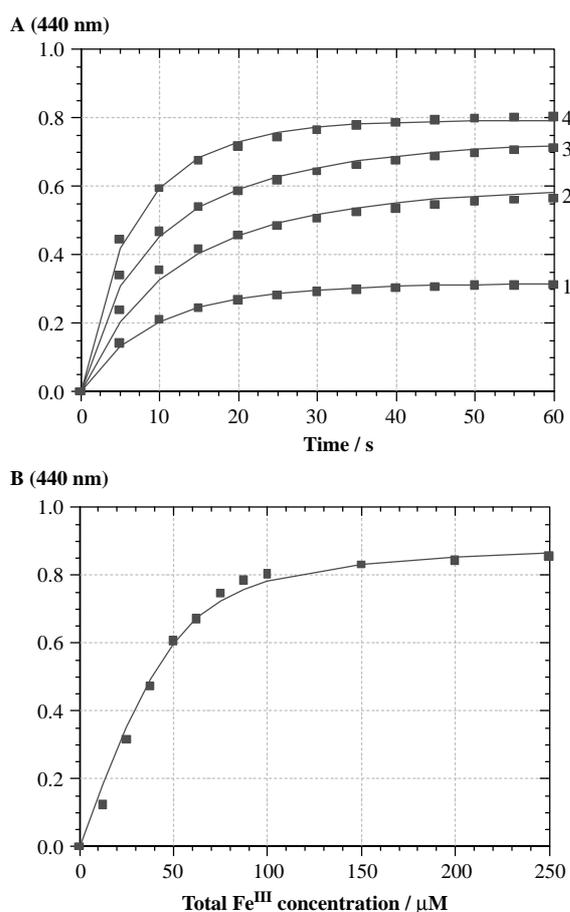


Figure 1. Complexation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) by Fe<sup>III</sup> in a 1:1 0.2 M acetate buffer–MeOH mixture (pH 5, 37°C). (Part A)  $A(440 \text{ nm})$  vs time curves: Fe<sup>III</sup>/quercetin molar ratio = 0.5(1), 1.0(2), 1.5(3), 2(4). (Part B)  $A(440 \text{ nm})$  vs total Fe<sup>III</sup> concentration plot. The solid lines are the results of the curve-fitting procedures (see text).

in the absorbance around 300 nm that would point to oxidation can be detected. The appearance of a broad absorption band around 440 nm is ascribed to metal complexes and reaches a maximal intensity over *ca.* 1 min (Figure 1). For iron/quercetin molar ratios higher than two, precipitation was observed at the end of the kinetic run, especially with Fe<sup>III</sup>. Plateau values of  $A(440 \text{ nm})$  can be used to estimate the stability

constant  $K_1$  of the complex (noted QM). Assuming 1:1 binding, the following equations can be easily derived and used in the fitting of the  $A_{\text{plateau}}(440 \text{ nm})$  vs total metal concentration ( $\varepsilon_1$ , molar absorption coefficient of QM;  $[M]$ , free metal concentration;  $M_t$ , total metal concentration;  $c$ , total quercetin concentration, no significant absorption for both  $M$  and  $\text{QH}_2$  at 440 nm) (Figure 1):

$$A_{\text{plateau}} = \varepsilon_1 \frac{K_1[M]c}{1 + K_1[M]}$$

$$[M] = \frac{M_t}{1 + \frac{K_1 c}{1 + K_1[M]}}$$

This procedure allows to ensure that the complexation equilibrium is reached while avoiding autoxidation and precipitation (which ultimately proceeds at the highest Fe<sup>III</sup> concentrations studied). Calculations with Fe<sup>III</sup> give:  $K_1 = 119 (\pm 25) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $\varepsilon_1 = 18,000 (\pm 480) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $r = 0.997$ ). In the case of Fe<sup>II</sup>, one obtains:  $K_1 = 78 (\pm 21) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $\varepsilon_1 = 18,800 (\pm 800) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $r = 0.993$ ). The increase in  $A(440 \text{ nm})$  can also be fitted against a simple kinetic model assuming reversible second-order metal complexation of quercetin ( $\text{QH}_2$ ) to form complex QM (first-order rate constant  $k_1$ ). Hence, the following rate laws are used in the curve-fitting procedure:

$$\begin{aligned} -\frac{d}{dt}[\text{QH}_2] &= -\frac{d}{dt}[M] = \frac{d}{dt}[\text{QM}] \\ &= k_1[\text{QH}_2][M] - \frac{k_1}{K_1}[\text{QM}] \end{aligned}$$

Rate constant  $k_1$  and binding constant  $K_1$  are the adjustable parameters, the molar absorption coefficients of the metal complexes being set at their values deduced from the analysis of the  $A_{\text{plateau}}$  vs  $M_t$  curve (see above). The corresponding values are collected in Table II. Both procedures give consistent  $K_1$  values. As expected, quercetin has a stronger affinity for Fe<sup>III</sup> than for Fe<sup>II</sup>. The stronger Fe<sup>III</sup>–quercetin binding is essentially reflected in a faster association. According to the literature [38], Fe<sup>III</sup> could be oxidizing enough

Table II. Complexation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) by Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>III</sup> in a 1:1 0.2 M acetate buffer–MeOH mixture (pH 5, 37°C). Spectroscopic monitoring at 440 nm (metal complexes) over 2 min. Molar absorption coefficients of the complexes set at 18,000 and  $18,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup>, respectively (see text).

Fe conc./μM	$k_1(\text{Fe}^{\text{III}})/\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^{-3}K_1(\text{Fe}^{\text{III}})/\text{M}^{-1}$	$k_1(\text{Fe}^{\text{II}})/\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^{-3}K_1(\text{Fe}^{\text{II}})/\text{M}^{-1}$
50	1222(±22)	117.2(±0.8)	1067(±41)	36.6(±0.8)
75	1203(±40)	129.0(±4.2)	–	–
100	1510(±43)	133.7(±7.3)	866(±33)	79.6(±2.4)
125	–	–	982(±26)	77.3(±2.5)
150	1448(±12)	113.3(±2.5)	918(±31)	75.5(±5.1)
200	1160(±36)	107(±11)	844(±34)	71.1(±6.4)
250	1218(±10)	96.5(±2.6)	814(±36)	57.5(±6.7)

at pH 5.0 to be reduced to  $\text{Fe}^{\text{II}}$  by quercetin (a 1:1 stoichiometry was reported for this reaction in a pH 5.5 acetate buffer). HPLC analysis actually allowed us to detect quercetin oxidation products QS. However, over the period of spectroscopic monitoring of iron-quercetin complexation (1–2 min), no significant development of absorption around 300 nm that would be typical of QS can be noted. We thus assume that quercetin oxidation is negligible under these conditions and that the data reported in Table II only refer to complexation.

#### Iron-quercetin complexation at pH 7.4

At pH 7.4, Fe-quercetin complexation is much faster than at pH 5.0 (Figure 2). This must reflect the fact that competition between protons and metal ions for the quercetin-binding site is more in favour of complexation. For Fe/quercetin molar ratios higher than 1, the fast increase in  $A(460 \text{ nm})$  is followed by a slower increase (Figure 2, curve 2A). Hence, the whole  $A(460 \text{ nm})$  vs time curves could not be kinetically analyzed within the assumption of simple 1:1 binding. On the other hand, the hypothesis of two quasi-irreversible binding processes successively yielding complex QM (rate constant  $k_1$ , molar absorption coefficient  $\varepsilon_1$ ) and complex  $\text{QM}_2$  (rate constant  $k_2$ , molar absorption coefficient  $\varepsilon_2$ ) gave quite satisfactory curve-fittings. The corresponding values of the optimized parameters are reported in Table III. For Fe/quercetin molar ratios lower than 1, reversibility in QM formation must be assumed. Good curve-fittings are obtained by using an estimate for  $\varepsilon_1$  from experiments at Fe/quercetin molar ratios higher than 1,  $k_1$  and  $K_1$  being the adjustable parameters. The corresponding binding constants can be estimated:  $K_1(\text{Fe}^{\text{II}}\text{-quercetin}) = 4 \times 10^5$ ,  $K_1(\text{Fe}^{\text{III}}\text{-quercetin}) = 16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . The formation of 1:1 and 2:1  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-quercetin}$  complexes has already been reported in the literature from potentiometric titrations in aqueous solutions [36]. Indeed, quercetin displays up to three distinct sites for metal binding: the catechol nucleus (1,2-dihydroxybenzene, B-ring), a  $\alpha$ -hydroxyketo group (C-ring) and a  $\beta$ -hydroxyketo group (A- and C-rings). However, comparison between flavones possessing only one of those metal binding sites clearly shows that the catechol nucleus by far displays the highest affinity for  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , especially in neutral conditions [39].

In the case of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , the complexation kinetics is deeply affected by the order of addition of the reagents (Figure 2). For instance, when quercetin is added to a solution of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in the phosphate buffer, the  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-quercetin}$  complexation is relatively slow because quercetin must displace tightly bound phosphate ligands for the binding to proceed. As a result, the apparent thermodynamics of complexation is less favourable ( $K_1(\text{Fe}^{\text{III}}\text{-quercetin}) = 3\text{--}4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ).

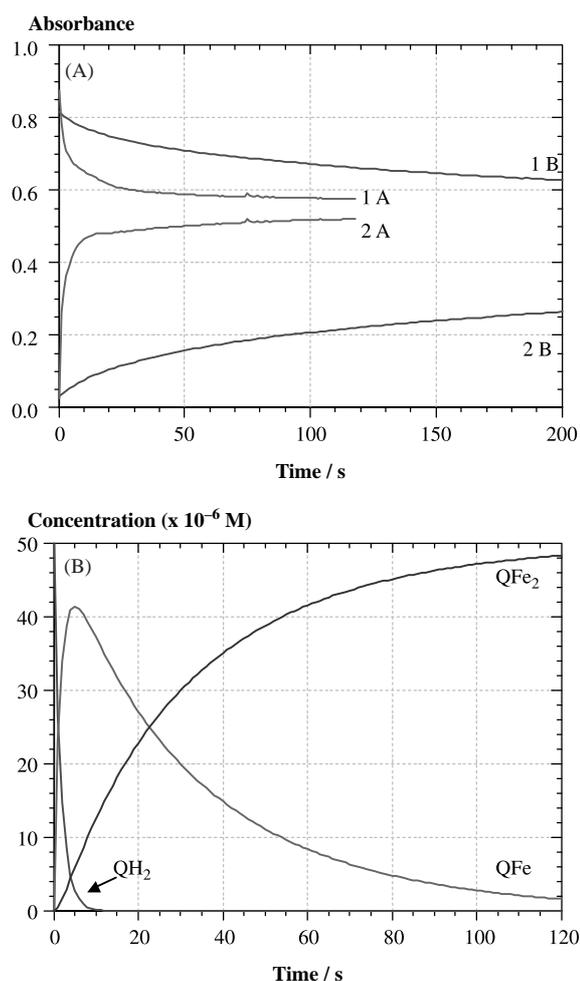


Figure 2. Complexation of quercetin ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) by  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (5 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4, 37°C). (Part A) absorbance vs time curves. (Curves 1A and B) detection at 380 nm. (Curves 2A and B) detection at 460 nm (curves 1A, 2A:  $\text{Fe}^{\text{III}}$  added last, curves 1B, 2B: quercetin added last). (Part B) concentration vs time curves ( $\text{Fe}^{\text{III}}$  added last).

By contrast, when  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (weakly bound to MeOH molecules) is added to a solution of quercetin in the phosphate buffer, the  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-quercetin}$  complexation appears faster, probably because it successfully competes with iron-phosphate complexation under these conditions. Anyway, quercetin- $\text{Fe}^{\text{III}}$  binding remains slower than quercetin- $\text{Fe}^{\text{II}}$  binding because competition between quercetin and phosphate ions is more severe in the case of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  than in the case of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . In the kinetic analysis (Table III), the kinetics of iron-phosphate complexation is not explicitly taken into account so that the corresponding rate constants must be considered as apparent (buffer-dependent) parameters. In the case of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , the influence of the order of addition of the reagents cannot be rigorously studied because autooxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is quite fast in a neutral phosphate buffer due to the stronger interaction of the phosphate ions with  $\text{Fe}^{\text{III}}$  [29]. In fact, in those conditions,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  titration in the absence or presence

Table III. Complexation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) by  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4, 37°C). Spectroscopic monitoring at 460 nm (metal complexes) over 2 min.

Fe conc./ $\mu\text{M}$	$k_1/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , $K_1/\text{M}^{-1}$	$\varepsilon_1/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$k_2/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\varepsilon_2/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\text{Fe}^{\text{II}}$ , 37.5*	8560( $\pm 210$ ) $37.2(\pm 0.6) \times 10^4$	$10^4$	–	–
50*	9130( $\pm 290$ ) $45.5(\pm 1.0) \times 10^4$	$10^4$	–	–
75	12100( $\pm 100$ )	9600( $\pm 20$ )	743( $\pm 64$ )	10600( $\pm 20$ )
100	10760( $\pm 100$ )	9400( $\pm 30$ )	1901( $\pm 82$ )	11030( $\pm 10$ )
125	7209( $\pm 51$ )	9910( $\pm 30$ )	1732( $\pm 56$ )	11020( $\pm 10$ )
150	11290( $\pm 450$ )	9120( $\pm 130$ )	1875( $\pm 117$ )	11350( $\pm 10$ )
175	4808( $\pm 66$ )	10710( $\pm 60$ )	879( $\pm 71$ )	11510( $\pm 10$ )
200	9060( $\pm 220$ )	10180( $\pm 90$ )	1505( $\pm 76$ )	11920( $\pm 10$ )
$\text{Fe}^{\text{III}}$ , 50*	1912( $\pm 26$ ) $16.1(\pm 0.1) \times 10^3$	6300	151( $\pm 4$ )	8500
75*	1577( $\pm 18$ ) $15.6(\pm 0.1) \times 10^3$	6300	88( $\pm 2$ )	8500
125	3355( $\pm 41$ )	6300( $\pm 20$ )	56( $\pm 15$ )	8800( $\pm 450$ )
150	3062( $\pm 33$ )	7130( $\pm 20$ )	158( $\pm 14$ )	8520( $\pm 50$ )
175	4160( $\pm 140$ )	6340( $\pm 60$ )	298( $\pm 18$ )	8410( $\pm 20$ )
200	3000( $\pm 70$ )	6270( $\pm 40$ )	155( $\pm 8$ )	8640( $\pm 30$ )
225	1809( $\pm 20$ )	7150( $\pm 20$ )	53( $\pm 6$ )	8760( $\pm 90$ )
250	2740( $\pm 90$ )	8330( $\pm 70$ )	176( $\pm 18$ )	9920( $\pm 30$ )
$\text{Fe}^{\text{III}}$ , 150* <sup>†</sup>	91.4( $\pm 1.1$ ) 3577( $\pm 65$ )	6300	63.7( $\pm 1.3$ )	8500
200* <sup>†</sup>	87( $\pm 1$ ) 3938( $\pm 90$ )	6300	50.7( $\pm 1.2$ )	8500
250* <sup>†</sup>	63.2( $\pm 0.5$ ) 3320( $\pm 57$ )	6300	36.5( $\pm 0.6$ )	8500

\* Reversible 1:1 binding assumed (binding constant  $K_1$ ). <sup>†</sup> Quercetin added last.

of quercetin shows that most  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is converted into  $\text{Fe}^{\text{III}}$  within the first minutes following addition of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  to the phosphate buffer (Figure 3). Quercetin- $\text{Fe}^{\text{II}}$  binding only provides marginal protection to  $\text{Fe}^{\text{II}}$  against autoxidation. Hence, experiments in which quercetin is added to a solution of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in the phosphate buffer were not considered. Despite the fast autoxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , the kinetic data obtained when iron is added last are significantly distinct for  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Hence, in the experiment with  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , we may assume that most of the iron is in the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  state during

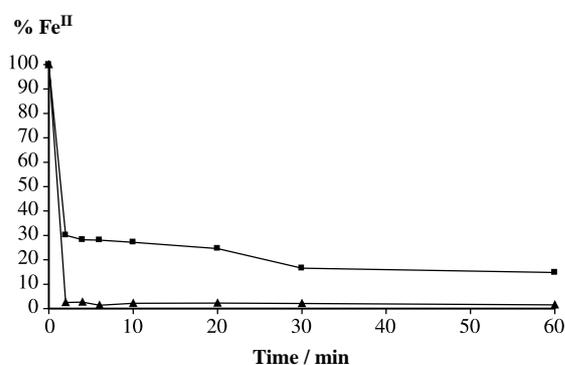


Figure 3. Time-dependence of the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  concentration ( $10^{-4}$  M) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4, 37°C) in the absence ( $\blacktriangle$ ) or presence of quercetin ( $10^{-4}$  M) ( $\blacksquare$ ).

the time period used for spectral measurements (2 min).

#### Copper-quercetin complexation at pH 7.4

When  $\text{Cu}^{\text{II}}$  is added to a solution of quercetin ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercetin molar ratio  $\leq 1$ ), a fast monotonous increase in  $A(460 \text{ nm})$  (Figure 4) which is in agreement with previous reports [38]. A plot of the  $A_{\text{max}}(460 \text{ nm})$  vs total metal complexation can be fitted assuming 1:1 binding to give:  $K_1 = 180 (\pm 34) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $\varepsilon_1 = 15,780 (\pm 380) \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  ( $r = 0.9995$ , data not shown). However, at  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercetin molar ratios lower than 1, the  $A(460 \text{ nm})$  vs time curves could not be analyzed within this simple hypothesis even when taking into account reversibility ( $\varepsilon_1$  set at  $15,780 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). We just mention that correct curve-fittings are obtained by assuming a quasi-irreversible 1:1 binding to form complex QM (second-order rate constant  $k_1$ , molar absorption coefficient  $\varepsilon_1$ ) followed by an apparent first-order conversion of QM into  $\text{QM}'$  (rate constant  $k_1'$ , molar absorption coefficient  $\varepsilon_1'$ ) (Table IV). A possible interpretation could be a rearrangement within the copper coordination sphere promoted by slow phosphate binding. However, redox processes cannot be excluded although no significant increase in  $A(330 \text{ nm})$  that would point to the formation

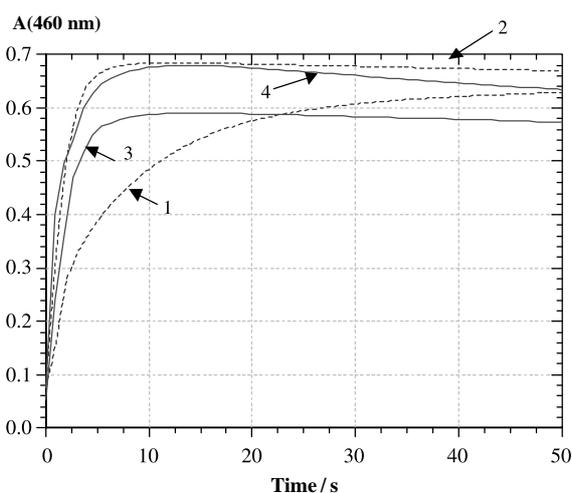


Figure 4. Complexation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) by  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (dash lines, curve 1:1 equiv, curve 2:2 equiv) and  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (solid lines, curve 3:1 equiv, curve 4:2 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ).

of quercetin oxidation products, is observed. At  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercetin molar ratios higher than 1, the first part of the  $A(460 \text{ nm})$  vs time curves (slow decay not considered) can be treated within the assumption of a simple irreversible 1:1 binding. The corresponding rate constants are in reasonable agreement with those deduced from a kinetic analysis at 380 nm (absorption maximum for quercetin) (Table IV).

In the case of the  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -quercetin complexation, the building-up of  $A(460 \text{ nm})$  is even faster than with the other metal ions investigated (Figure 4). Assuming an irreversible 1:1 binding, the kinetic analysis of the  $A(460 \text{ nm})$  vs time curves over the first 15 s allows to obtain an estimate for the corresponding rate constant:  $k_1$  ca.  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Table IV). After this fast binding step, a slow decay of  $A(460 \text{ nm})$  can be observed (Figure 4), which suggests either the rearrangement of the primary complex (kinetic product) into a more stable one (thermodynamic

product) or the onset of quercetin autoxidation (see below).

Copper-quercetin complexation probably occurs via the 4-keto group of the C-ring with additional involvement of the O3-H or O5-H group [38]. Indeed, the copper-induced bathochromic shift of the low-energy absorption band of quercetin (ca. 50 nm for a quercetin-copper ion molar ratio of 1) is larger by more than 30 nm than that induced by the iron ions (binding at the catechol site [39]).

In summary, addition of iron or copper ions to a solution of quercetin in a neutral phosphate buffer is followed by fast metal-quercetin complexation. The apparent second-order rate constants of 1:1 binding ( $k_1$ ) are in the order:  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (ca.  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )  $>$   $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $5\text{--}10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )  $>$   $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $2\text{--}4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). The binding kinetics is complicated by additional 2:1 metal-quercetin complexation (Fe ions in excess) and rearrangement of the primary complexes into more stable complexes (copper ions).

#### Autoxidation in presence of iron ions at pH 7.4

When the spectral changes following Fe addition are monitored over 2 h, a combination of chemical processes can be observed: during the first minutes, the spectral changes essentially reflect complexation since no increase in the absorbance at 330 nm typical of quercetin oxidation products (QS) is detected. Then, the continuous slow increase in  $A(330 \text{ nm})$  and decrease in  $A(380 \text{ nm})$  is indicative of quercetin autoxidation (Figures 5 and 6). However, monitoring at 460 nm (metal complexes) points to a biphasic process. Indeed, following the fast complexation step,  $A(460 \text{ nm})$  keeps increasing more slowly and either reaches a stable plateau value (iron/quercetin molar ratio  $\leq 1$ , Figure 5) or tends to decrease very slowly (iron/quercetin molar ratio  $> 1$ , Figure 6). A more detailed kinetic analysis can be proposed based on the simplification that metal complexation is fast

Table IV. Complexation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) by copper ions in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). Spectroscopic monitoring at 460 nm (metal complexes) over 2 min.

Cu conc./ $\mu\text{M}$	$k_1/\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\epsilon_1/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$10^3 k'_1 \text{ s}$	$\epsilon'_1/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
$\text{Cu}^{\text{II}}$ , 12.5	7840( $\pm 480$ )	8900( $\pm 250$ )	45( $\pm 3$ )	13450( $\pm 50$ )
25	5930( $\pm 570$ )	8540( $\pm 440$ )	40( $\pm 3$ )	13740( $\pm 60$ )
37.5	7890( $\pm 320$ )	10290( $\pm 160$ )	26( $\pm 4$ )	12210( $\pm 80$ )
50*	3810( $\pm 60$ )	12000( $\pm 30$ )	–	–
	2920( $\pm 30$ )	8050( $\pm 20$ )	–	–
100(0–15 s)*	6140( $\pm 400$ )	12410( $\pm 150$ )	–	–
	5620( $\pm 370$ )	7190 ( $\pm 160$ )	–	–
125(0–15 s)*	6650( $\pm 100$ )	14720( $\pm 30$ )	–	–
	5410 ( $\pm 320$ )	7900 ( $\pm 110$ )	–	–
$\text{Cu}^{\text{I}}$ (0–15 s)				
75	8990( $\pm 490$ )	12610( $\pm 150$ )	–	–
100	8690( $\pm 370$ )	12040( $\pm 80$ )	–	–

\* The second set of parameters is gained from monitoring at 380 nm.

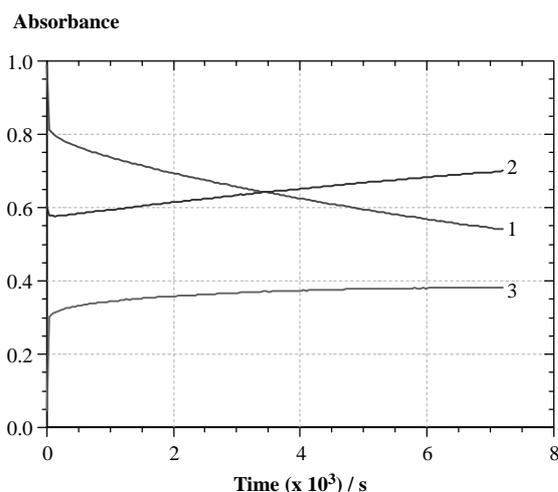


Figure 5. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) after addition of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (1 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). (Curve 1) detection at 380 nm. (Curve 2) detection at 330 nm. (Curve 3) detection at 460 nm.

and quasi-irreversible. Thus, at the end of the fast step (1–3 min), the quercetin and metal complex concentrations are, respectively approximated to  $c - M_t$  and  $M_t$  ( $M_t$ : total metal concentration,  $c$ : total quercetin concentration) when  $c > M_t$ , and 0 and  $c$  when  $M_t > c$ . Those concentrations are used as initial conditions for the curve-fitting procedures dealing with autoxidation (monitoring over 2 h following the fast complexation step). For  $\text{Fe}^{\text{III}}$ /quercetin molar ratios higher than 1, the  $A(460 \text{ nm})$  vs time curves can be interpreted by assuming the relatively fast conversion of the metal complexes (QM and  $\text{QM}_2$  taken collectively) into a first product  $\text{P}_1$  absorbing at 460 nm (apparent first-order rate constant  $k'_1$ ) which slowly decays into a final product  $\text{P}_2$  that does not absorb at 460 nm (apparent first-order rate constant  $k'_2$ ). Then, the simultaneous fitting of the  $A(380 \text{ nm})$  and  $A(330 \text{ nm})$  vs time curves with  $k'_1$  held to its value deduced from the kinetic analysis at 460 nm yields refined values for the rate constant  $k'_2$  (Figure 6, Table V). With  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in excess, the reverse procedure gave better results, i.e. simultaneous fitting of the  $A(380 \text{ nm})$  and  $A(330 \text{ nm})$  vs time curves to extract values for  $k'_1$  and  $k'_2$  followed by fitting of the  $A(460 \text{ nm})$  vs time curve with  $k'_1$  held constant to obtain a second estimate of  $k'_2$  (Table VI). Product  $\text{P}_1$  displays absorption bands at 460 and 380 nm. Its absorption at 330 nm is *ca.* twice as low as for product  $\text{P}_2$ , which on the other hand does not absorb at 460 and 380 nm. It is thus reasonable to assume that  $\text{P}_1$  is a metal complex stemming from rearrangement in the coordination sphere of complex QM ( $\text{QM}_2$ ), as already observed in the investigation of copper-quercetin complexation, and that  $\text{P}_2$  is the mixture of quercetin oxidation products (QS) evidenced by HPLC-MS and displaying a typical

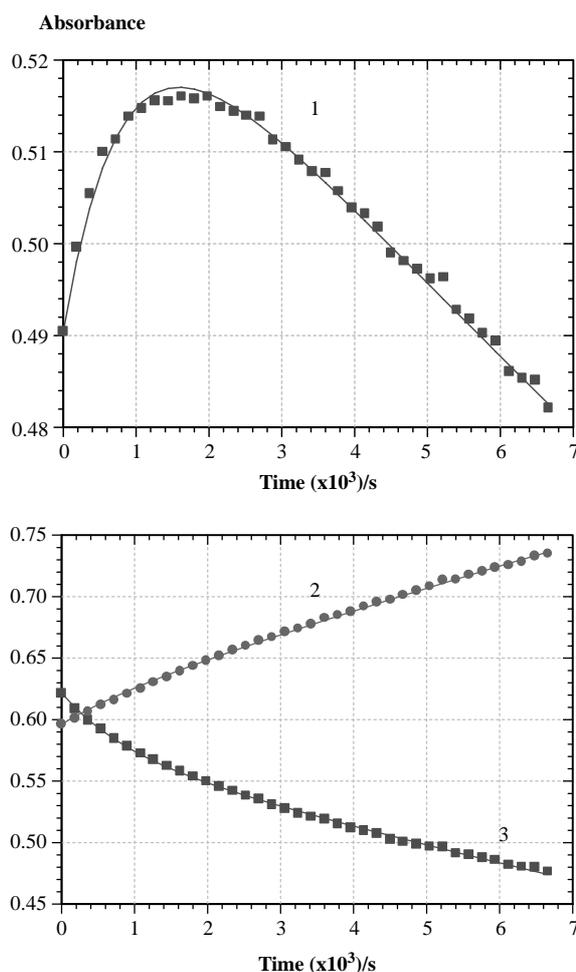


Figure 6. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) after addition of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (3 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). (Curve 1) detection at 460 nm. (Curve 2) detection at 330 nm. (Curve 3) detection at 380 nm. The solid lines are the results of the curve-fitting procedures.

absorption band at 330 nm in neutral aqueous solution. The corresponding molar absorption coefficient is *ca.*  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (as estimated in quercetin autoxidation with no metal added, see above) although larger values are obtained in the curve-fittings dealing with the most concentrated solutions of metal ions because of the weak (uncorrected) absorption of the free metal ion at 330 nm.

For Fe/quercetin molar ratios lower than 1, free quercetin is still present in the solutions so that the direct autoxidation mechanism that does not involve complex QM as an intermediate must be taken into account for a correct fitting. Satisfactorily, the corresponding rate constant is in good agreement with that deduced from the experiment with no metal added (see above) (Tables V and VI). However, it can be noted that  $A(460 \text{ nm})$  does not significant decay for Fe/quercetin molar ratios equal to 0.5 and 1 (in Tables V and VI, the corresponding  $k'_2$  values

Table V. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) in the presence of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4, 37°C). Without EDTA, the spectral changes occurring during 3 min following the addition of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (pure complexation) are not considered in the calculations. At time zero, all quercetin is assumed to be bound to  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , except for 25  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{\text{III}}$  (50% binding). Values in brackets are the wavelengths of detection (in nm).

$\text{Fe}^{\text{III}}$ conc./ $\mu\text{M}^*$	$10^5 k'_1$ s	$10^5 k'_2$ s	$\epsilon'_1, \epsilon'_2/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
25(460)	39( $\pm 1$ )	–	7950( $\pm 10$ ), 0
25(380)	39	4.90( $\pm 0.02$ )	11630, 0
(330) <sup>†</sup>		4.90 <sup>‡</sup>	12170, 16680
50(460)	54( $\pm 1$ )	–	6730( $\pm 10$ ), 0
50(380)	54	4.11( $\pm 0.02$ )	13270, 0
(330)			12400, 21090
100(460)	69( $\pm 2$ )	1.25( $\pm 0.01$ )	9360( $\pm 10$ ), 0
100(380)	69	3.05( $\pm 0.02$ )	10920, 0
(330)			11930, 24830
150(460)	119( $\pm 2$ )	1.67( $\pm 0.02$ )	10380( $\pm 10$ ), 0
150(380)	119	2.97( $\pm 0.01$ )	11270, 0
(330)			12530, 26410
200(460)	139( $\pm 3$ )	1.99( $\pm 0.01$ )	10810( $\pm 10$ ), 0
200(380)	139	2.62( $\pm 0.01$ )	11580, 0
(330)			14200, 30860
250(460)	181( $\pm 3$ )	2.11( $\pm 0.01$ )	11080( $\pm 10$ ), 0
250(380)	181	2.43( $\pm 0.01$ )	11640, 0
(330)			14990, 32380
$\text{Fe}^{\text{III}}$ conc./ $\mu\text{M}^{\ddagger}$	$k'_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^5 k'_2/\text{s}^{-1}$	$\epsilon'_1, \epsilon'_2/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
25(380)	12.7( $\pm 4.8$ )	31( $\pm 7$ )	16660, 0
(330)			17100, 24570
50(380)	5.8( $\pm 0.3$ )	22.6( $\pm 1.0$ )	13280, 0
(330)			19290, 24100
100(380)	2.4( $\pm 0.3$ )	19.5( $\pm 2.0$ )	10680, 0
(330)			25720, 28440
150(380)	1.4( $\pm 0.4$ )	17.7( $\pm 3.5$ )	9150, 0
(330)			30940, 33430

\* No EDTA. <sup>†</sup> Autoxidation of QM and free quercetin. <sup>‡</sup> Rate constant for the autoxidation of free quercetin (set equal to  $k'_2$  for fitting). <sup>§</sup> With EDTA (0.5 mM).

deduced from the kinetic analysis at 460 nm are either zero or very small) while autoxidation is well evidenced by the increase in  $A(330 \text{ nm})$  and decrease in  $A(380 \text{ nm})$  (Figure 5). These discrepancies point to the limits of our kinetic approach and suggest that iron-quercetin binding is reversible under such conditions and that the spectral changes essentially reflect autoxidation of free quercetin.

The apparent rate constant  $k'_1$  increases monotonously with the  $\text{Fe}^{\text{III}}$  concentration in the range  $4\text{--}18 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . No such clear dependence could be observed with the  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -initiated process ( $k'_1$  in the range  $3\text{--}9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). The  $k'_2$  values ( $1\text{--}4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) display no clear dependence on the Fe concentration or on the Fe redox state. These parameters are proposed to measure the sensitivity of the iron-quercetin complexes toward autoxidation in a neutral phosphate buffer. In comparison with the autoxidation of quercetin with no added metal ion ( $k_a$  ca.  $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ), it can be concluded that the iron complexes of quercetin are less reactive than free quercetin toward dioxygen. In other words, iron complexation weakly protects quercetin against autoxidation. The autoxidation kinetics of the iron-quercetin complexes is essentially independent of the

iron redox state. It can thus be proposed that the  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -quercetin complexes are rapidly converted in  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -quercetin complexes in agreement with the observation that  $\text{Fe}^{\text{II}}$  does not accumulate in the course of quercetin autoxidation (Figure 3).

When  $\text{Fe}^{\text{III}}$  or  $\text{Fe}^{\text{II}}$  is added to a solution of quercetin in the presence of EDTA (EDTA/quercetin molar ratio = 10), no absorption band above 400 nm can be detected. Clearly, EDTA-bound iron is no longer available to strongly complex quercetin. Under such non-complexing conditions, autoxidation is weakly accelerated by iron. Excellent curve-fittings of both the  $A(380 \text{ nm})$  and  $A(330 \text{ nm})$  vs time curves (Figure 7) could be achieved within the hypothesis of a two-step process involving the formation of a labile complex QM (second-order rate constant  $k'_1$ , absorption at 380 nm) that reacts with dioxygen to yield QS (first-order rate constant  $k'_2$ , no absorption at 380 nm). The  $k'_1$  and  $k'_2$  values are not significantly dependent on the Fe redox state (Tables V and VI). Parameter  $k'_1$  tends to decrease when the total metal concentration increases, probably because of unaccounted reversibility in QM formation. Parameter  $k'_2$ , which is approximately constant and independent of the total metal concentration, can be taken as a measure of the

Table VI. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) in the presence of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). Without EDTA, the spectral changes occurring during 90 s following the addition of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (pure complexation) are not considered in the calculations. At time zero, all quercetin is assumed to be bound to  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , except for  $25 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{\text{III}}$  (50% binding). Values in brackets are the wavelengths of detection (in nm).

$\text{Fe}^{\text{II}}$ conc./ $\mu\text{M}^*$	$10^5 k_1$ s	$10^5 k_2$ s	$\epsilon'_1, \epsilon'_2/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
25(460)	171( $\pm 7$ )	0.42( $\pm 0.01$ )	12800( $\pm 10$ ), 0
25,(380)	171	0.37( $\pm 0.15$ )	9070, 0
(330) <sup>†</sup>		6.3( $\pm 0.1$ ) <sup>‡</sup>	7900, 24010
50(460)	71( $\pm 1$ )	–	7140( $\pm 10$ ), 0
50(380)	71	4.00( $\pm 0.01$ )	13570, 0 11660, 21010
(330)			
100(460)	90	2.23( $\pm 0.02$ )	10380( $\pm 10$ ), 0
100(380)	90( $\pm 3$ )	2.56( $\pm 0.02$ )	12490, 0
(330)			12370, 27060
150(460)	39	2.51( $\pm 0.01$ )	10150( $\pm 10$ ), 0
150(380)	39( $\pm 1$ )	2.21( $\pm 0.02$ )	9950, 0
(330)			12900, 28040
200,(460)	44	3.10( $\pm 0.03$ )	10780( $\pm 10$ ), 0
200(380)	44( $\pm 1$ )	2.40( $\pm 0.02$ )	10090, 0
(330)			13760, 29640
250(460)	31	2.98( $\pm 0.03$ )	10740( $\pm 10$ ), 0
250(380)	31( $\pm 2$ )	1.38( $\pm 0.01$ )	10290, 0
(330)			17380, 43260
$\text{Fe}^{\text{II}}$ conc./ $\mu\text{M}^{\ddagger}$	$k'_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^5 k'_2/\text{s}^{-1}$	$\epsilon'_1, \epsilon'_2/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
25(380)	10.6( $\pm 3.0$ )	25( $\pm 4$ )	14470, 0 15650, 22120
(330)			
50(380)	5.4( $\pm 0.3$ )	19.1( $\pm 0.8$ )	13820, 0 20080, 25370
(330)			
100(380)	2.6( $\pm 0.3$ )	21.9( $\pm 2.2$ )	11340, 0 23430, 26770
(330)			
150(380)	1.8( $\pm 0.4$ )	24.6( $\pm 5.5$ )	11970, 0
(330)			28330, 28840

\* No EDTA. <sup>†</sup> Autoxidation of QM and free quercetin. <sup>‡</sup> Rate constant for the autoxidation of free quercetin. <sup>§</sup> With EDTA (0.5 mM).

sensitivity of quercetin to autoxidation initiated by EDTA-iron. From its value ( $2-3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ), it can be concluded that EDTA-iron accelerates quercetin autoxidation by a factor 3–4 only.

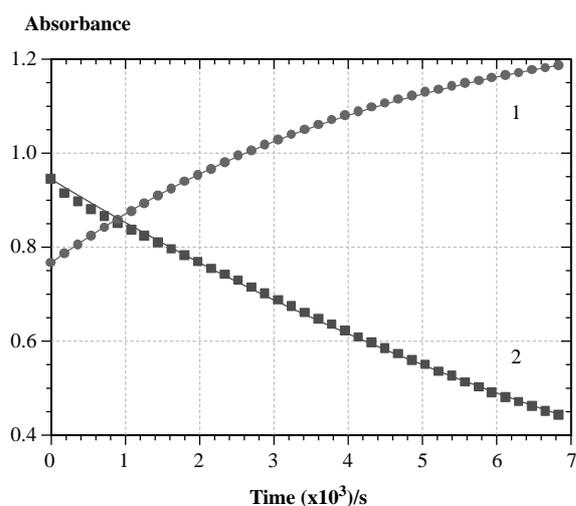


Figure 7. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) after addition of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (2 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ) containing EDTA ( $5 \times 10^{-4}$  M). (Curve 1) detection at 330 nm. (Curve 2) detection at 380 nm. The solid lines are the results of the curve-fitting procedures.

When quercetin autoxidation takes place in the presence of added  $\text{Fe}^{\text{II}}$  with or without EDTA, the ROS possibly formed during fast  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation do not seem to significantly accelerate the consumption of quercetin, which in both cases does not appear faster than the corresponding process in the presence of added  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (Tables V and VI).

Taken together, the data about quercetin autoxidation in a neutral iron-containing phosphate buffer suggest that iron ions accelerate the reaction in non-complexing conditions, only. The redox potential of the  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  couple is strongly pH-dependent because of the successive deprotonations of  $\text{Fe}^{3+}$ -bound water molecules in the pH range 2–4. Hence,  $E^0(\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}})$  drops from 0.77 V at pH 0 to 0.11 V at neutral pH [19], thus making  $\text{Fe}^{\text{III}}$  a much less potent oxidant at neutral pH. The  $E^0$  fall is expected to be even larger in the presence of phosphate ions which have a higher affinity for  $\text{Fe}^{\text{III}}$  than for  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . The same trend is observed upon iron-EDTA binding ( $\log K = 25$  with  $\text{Fe}^{\text{III}}$  and 14.3 with  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ). Indeed, the experimental  $E^0$  value for the  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  (EDTA) couple is 0.12 V. Since the redox potential of the  $\text{QH}/\text{QH}_2$  couple at pH 7 is 0.33 V [37], the direct electron transfer from quercetin to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (in the presence or absence of EDTA) can be predicted to be a thermodynamically unfavourable reversible process.

Under noncomplexing conditions (EDTA), iron-mediated quercetin autoxidation could be initiated either by a reversible direct electron transfer from quercetin to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (driven to products by the fast disproportionation of the quercetin radicals [40]) or via labile high-spin complexes, possibly monocatecholates complexes (noted  $\text{QHFe}^{\text{III}}$  in Scheme 1). Both mechanisms have been reported in the literature with other catechol ligands [41,42]. In our kinetic analysis, the detection of an intermediate species absorbing at 380 nm (Tables V and VI) is more in favour of the second mechanism. Since  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  are as effective at accelerating quercetin autoxidation in the presence of EDTA, we may also assume that  $\text{Fe}^{\text{II}}$  autoxidation is not the rate-determining step of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -induced quercetin autoxidation. Processes likely involved in quercetin autoxidation in the presence of Fe ions are summarized in Scheme 2.

In equimolar iron ion-quercetin solutions ( $10^{-4}$  M), a low slowly increasing  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration can be detected over 1 h (Figure 8) that does not exceed  $10^{-5}$  M. Hence, it is suggested that  $\text{H}_2\text{O}_2$  formed during quercetin autoxidation is decomposed by the Fe ions. The ROS thus produced (e.g. hydroperoxyl and hydroxyl radicals) could themselves take part in quercetin oxidation. This is in agreement with a previous work in which the hydroxyl radical could be evidenced by ESR after spin trapping in mildly alkaline solutions (pH 8.5 tris

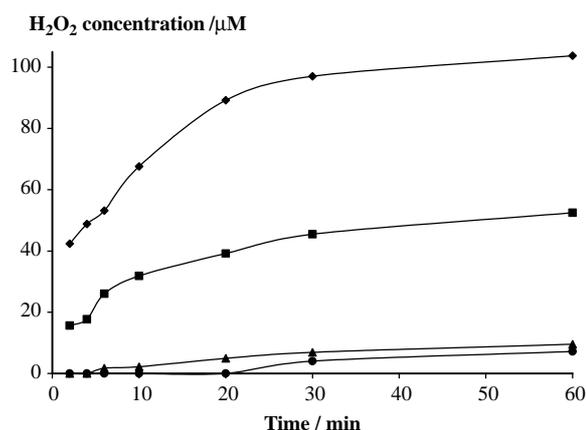
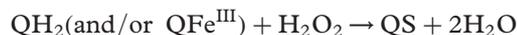
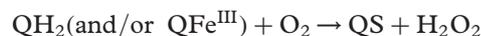


Figure 8. Production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4, 37°C) in the presence of quercetin ( $10^{-4}$  M) and metal ions ( $10^{-4}$  M): quercetin +  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ( $\blacklozenge$ ), quercetin +  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ( $\blacksquare$ ), quercetin +  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $\blacktriangle$ ), quercetin +  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $\bullet$ ).

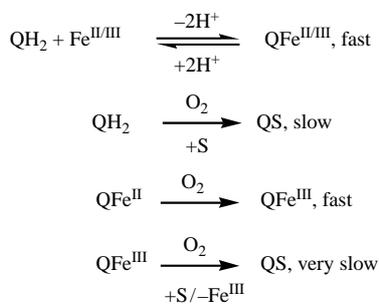
buffer, 25°C) of quercetin in the presence of  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -EDTA [17]. The ESR signal was enhanced by superoxide dismutase and abolished by catalase, thus confirming that  $\text{H}_2\text{O}_2$  was the precursor of the hydroxyl radical in such conditions. Hence, in the presence of iron ions, quercetin autoxidation may be a combination of the following processes (written for simplicity as overall two-electron oxidations although sequential one-electron transfers must take place):



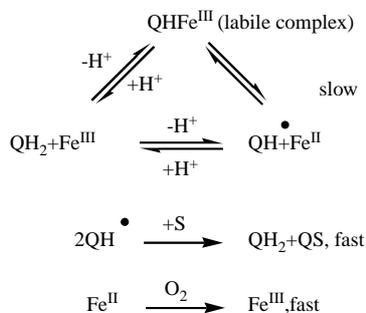
#### Autoxidation in presence of copper ions at pH 7.4

When the spectral changes following the addition of copper ions to a solution of quercetin in a neutral phosphate buffer are recorded over 1 h, it can be observed that the fast building-up of the absorption above 400 nm (metal complexes) is followed by a slower decay, which, however, appears much faster than with the iron ions (Figure 9). This decay (typically monitored at 460 or 420 nm for  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /quercetin molar ratios higher than 1) is paralleled by the increase in  $A(330\text{ nm})$  typical of the quercetin oxidation products. With  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , no evidence could be gained that these spectral changes reflect a multi-step process. Hence, the  $A(460\text{ or }420\text{ nm})$  and  $A(330\text{ nm})$  vs time curves were simultaneously fitted to a simple kinetic law assuming the first-order conversion of the metal complexes into oxidation products. The corresponding rate constants  $k_a$  lie in the range  $3-9 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$  and have no clear dependence on the total  $\text{Cu}^{\text{II}}$  concentration (Table VII). As expected, the presence of EDTA (EDTA/quercetin molar ratio = 10) inhibits copper-quercetin binding (no

#### Without EDTA



#### With EDTA



Scheme 2. Proposed mechanism for autoxidation of quercetin in the presence of iron ions (in the absence of EDTA, strong complexation is assumed to take place on the B-ring with removal of protons at  $\text{O}3'-\text{H}$  and  $\text{O}4'-\text{H}$ ).

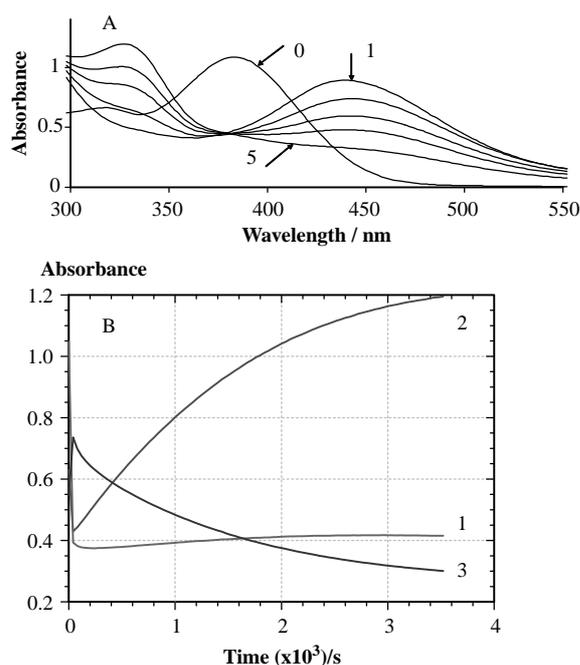


Figure 9. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) after addition of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (3 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). (Part A) UV-visible spectra at time 0 (spectrum 0), 2 min (spectrum 1), 10 min (spectrum 2), 20 min (spectrum 3), 30 min (spectrum 4) and 60 min (spectrum 5). (Part B) absorbance vs time curves. (Curve 1) detection at 380 nm. (Curve 2) detection at 330 nm. (Curve 3) detection at 420 nm.

Table VII. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) in the presence of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). In the absence of EDTA, the spectral changes occurring during 2 min following the addition of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  are not considered in the calculations (fast metal binding, marginal oxidation). Values in brackets are the wavelengths of detection (in nm).

$\text{Cu}^{\text{II}}$ conc./ $\mu\text{M}$	$10^5 k_a \text{ s}$	$\epsilon_{\text{QS}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
50(330)*	27.9( $\pm 0.4$ )	33210
(420)		2650
75(330)*	51.1( $\pm 0.6$ )	23680
(420)		3220
100(330)*	85.5( $\pm 0.3$ )	17210
(420)		3550
125(330)*	69.4( $\pm 0.4$ )	22820
(420)		4500
150(330)*	60.8( $\pm 0.5$ )	26170
(420)		4790
200(330)*	75.5( $\pm 0.5$ )	22960
(420)		5200
50(330)†	18.8( $\pm 0.9$ )	23220
(380)		7970
100(330)†	14.3( $\pm 0.7$ )	25000
(380)		6500
150(330)†	21.6( $\pm 0.9$ )	21660
(380)		7600
200(330)†	9.0( $\pm 0.1$ )	29780
(380)	0	0

\*No EDTA. †With EDTA (0.5 mM).

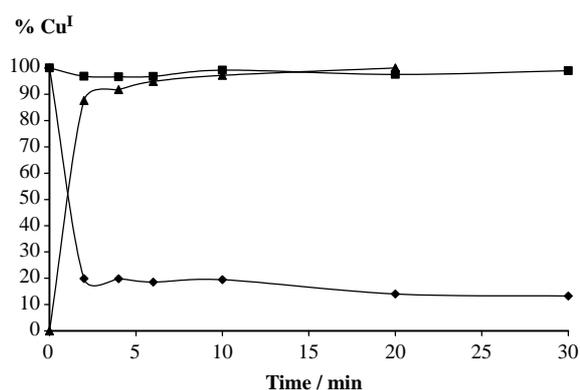


Figure 10. Time-dependence of the  $\text{Cu}^{\text{I}}$  concentration in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). Copper ion and quercetin concentrations are  $10^{-4}$  M:  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ( $\blacklozenge$ ),  $\text{Cu}^{\text{I}}$  + quercetin ( $\blacksquare$ ),  $\text{Cu}^{\text{II}}$  + quercetin ( $\blacktriangle$ ).

absorption above 400 nm). The  $A(380 \text{ nm})$  and  $A(330 \text{ nm})$  vs time curves, respectively, featuring the consumption of quercetin and formation of its oxidation products were kinetically analyzed to extract the apparent first-order rate constants of autoxidation  $k_a$ . The  $k_a$  values are essentially constant and fall in the range  $1-2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Hence, EDTA significantly inhibits the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -initiated autoxidation of quercetin, which suggests that the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -quercetin complexes are key-autoxidation intermediates in the absence of EDTA.

In the literature,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  has been reported to accelerate 1,2,4-benzenetriol autoxidation much more efficiently than  $\text{Fe}^{\text{III}}$  [43]. During  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -initiated autoxidation of quercetin,  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulates more readily (*ca.*  $5 \times 10^{-5}$  M in an equimolar  $10^{-4}$  M mixture of quercetin and  $\text{Cu}^{\text{II}}$  after 1 h) than in the presence of the iron ions (Figure 8). Moreover,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  is rapidly reduced into  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (Figure 10) in agreement with previous reports [38].

As judged by the fast decay of  $A(460 \text{ nm})$  and building-up of  $A(330 \text{ nm})$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -induced autoxidation of quercetin seems a quite efficient process (Figure 11). However, monitoring at 380 nm (absorption maximum of quercetin) clearly shows that the chemical transformations that follow the fast  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -quercetin binding (completed in less than 20 s) are actually multi-step. The  $A(380 \text{ nm})$  vs time curves could be fitted assuming the successive conversion of the metal complex into three new species ( $\text{P}_1$ ,  $\text{P}_2$  and  $\text{P}_3$ ) with apparent first-order rate constants  $k'_1$ ,  $k'_2$  and  $k'_3$ . Then, the simultaneous fitting of the  $A(460 \text{ nm})$  and  $A(330 \text{ nm})$  vs time curves with  $k'_1$  held to its value deduced from the kinetic analysis at 380 nm yields refined values for the rate constant  $k'_2$ . Rate constants  $k'_1$ ,  $k'_2$  and  $k'_3$  rate constants display values in the ranges  $1-2 \times 10^{-2}$ ,  $1-3 \times 10^{-3}$  and  $4-5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , respectively (Table VIII). As for the iron ions, product  $\text{P}_1$ ,

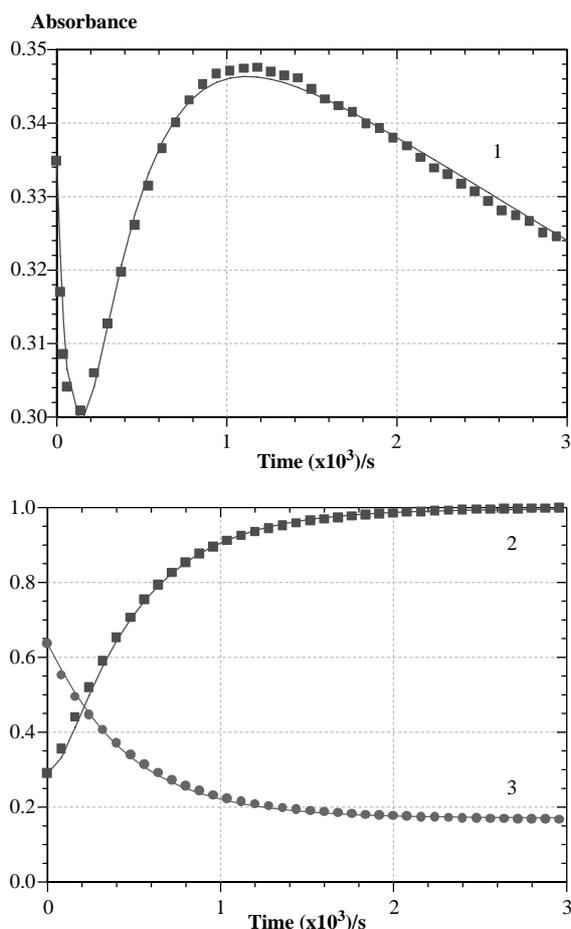


Figure 11. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) after addition of  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (2 equiv) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). (Curve 1) detection at 380 nm. (Curve 2) detection at 330 nm. (Curve 3) detection at 420 nm. The solid lines are the results of the curve-fitting procedures.

which moderately absorbs at 330 nm and displays a strong absorption above 400 nm, must be a  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -quercetin complex resulting from a rearrangement of the primary complex formed within 10–20 s after  $\text{Cu}^{\text{I}}$

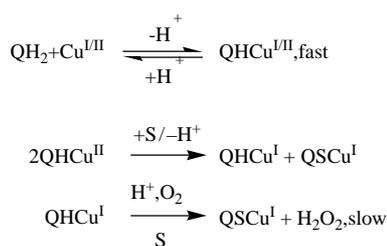
addition (Figure 4, Table IV). During this step, no large increase in  $A(330 \text{ nm})$  can be observed so that the molar absorption coefficient at 330 nm of the new species formed is set equal to that of quercetin for the curve-fittings (experiments over 1 h). It can be noticed that a similar two-step process operates in the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -quercetin binding. However, because the subsequent autoxidation of quercetin is slower in that case, the time zero of the kinetic analysis of autoxidation can be delayed so as to essentially deal with the second step (rate constant  $k_2$ ). Since  $A(330 \text{ nm})$  sharply increases during the step characterized by rate constant  $k_2'$ , we assume that this parameter can be equated to the apparent rate constant of  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -initiated quercetin autoxidation ( $k_a$ ). This is in agreement with product  $\text{P}_2$  having a strong absorption at 330 nm and only a very weak absorption above 400 nm. Hence,  $\text{P}_2$  is identified as QS, the mixture of solvent adducts on the quercetin *p*-quinonemethide displaying either a five- or six-membered heterocycle (Scheme 1). Those species in equilibrium probably bind  $\text{Cu}^{\text{I}}$  through their catechol and/or keto groups and become further autoxidized into product  $\text{P}_3$  (rate constant  $k_3'$ ).

In the pH 7.4 phosphate buffer at  $37^\circ\text{C}$ , kinetics of  $\text{Cu}^{\text{I}}$  autoxidation are too fast to be investigated by sample uptake for spectroscopic measurements (Figure 10). Simultaneously, a rather low production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be detected that tends to level off after 15 min (data not shown). Interestingly, quercetin (in equimolar  $10^{-4}$  M concentration with  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) stimulates  $\text{H}_2\text{O}_2$  production, allowing the formation of a quasi-stoichiometric concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  after 1 h (Figure 8). Moreover, in the presence of quercetin,  $\text{Cu}^{\text{I}}$  autoxidation is totally prevented (Figure 10). Since  $\text{Cu}^{\text{I}}$  is stabilized despite quercetin consumption, it can be concluded that the quercetin oxidation products themselves bind  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (in agreement with the kinetic analysis above) and inhibit its autoxidation.

Table VIII. Autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) in the presence of  $\text{Cu}^{\text{I}}$  in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ). The spectral changes occurring during 40 s following the addition of  $\text{Cu}^{\text{I}}$  are not considered in the calculations (fast metal binding, marginal oxidation). Values in brackets are the wavelengths of detection (in nm).

$\text{Cu}^{\text{I}}$ conc./ $\mu\text{M}$	$10^4 k_1$ s	$10^5 k_2$ s	$10^5 k_3$ s	$\epsilon_i/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
50(380)*	174( $\pm 5$ )	–	–	5780
50(330)	174	75( $\pm 2$ )	4.0( $\pm 0.1$ )	24090, 0 <sup>†</sup>
(460)				9200, 420, 0
100(380)	118( $\pm 5$ )	284( $\pm 8$ )	4.3( $\pm 0.1$ )	5410, 7240, 0
100(330)	118	226( $\pm 1$ )	–	19930 <sup>†</sup>
(460)				10110, 2320
125(380)	111( $\pm 5$ )	318( $\pm 11$ )	4.6( $\pm 0.1$ )	5190, 7240, 0
125(330)	111	242( $\pm 1$ )	–	19840 <sup>†</sup>
(460)				10270, 2410
150(380)	96( $\pm 5$ )	390( $\pm 18$ )	4.4( $\pm 0.1$ )	5370, 7540, 0
150(330)	96	261( $\pm 1$ )	–	20280, 0 <sup>†</sup>
(460)				10370, 2610, 0

\* Analysis of the fast step only. <sup>†</sup> At 330 nm,  $\epsilon_1$  set equal to  $\epsilon_{\text{QH}_2}$ .



Scheme 3. Proposed mechanism for copper-induced autoxidation of quercetin (binding is assumed to take place on the C-ring with removal of proton at O3-H or O5-H).

Although, a weaker oxidant than  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in acidic conditions ( $E^0(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+) = 0.34 \text{ V}$ ),  $\text{Cu}^{\text{II}}$  is no less oxidizing than  $\text{Fe}^{\text{III}}$  at neutral pH because of its weaker hydrolytic properties ( $E^0(\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}) = 0.15 \text{ V}$ ) [19]. In addition, copper ions form square planar ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) or tetrahedral ( $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) complexes whereas iron ions prefer (distorted) octahedral geometries. Interestingly, the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -initiated autoxidation of 1,2,4-benzenetriol is insensitive to superoxide dismutase whereas autoxidation with no metal added or after addition of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is [43]. This observation led the authors to suggest that free  $\text{O}_2^-$  is not involved in the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -initiated autoxidation of 1,2,4-benzenetriol which would take place via a two-electron process within a redox active  $\text{Cu}^{\text{II}}$  complex. Moreover, a detailed investigation of the oxidation of catechol by  $\text{Cu}^{\text{II}}$  has shown that the rate-limiting step is actually an intramolecular electron transfer within the catecholate- $\text{Cu}^{\text{II}}$  complex [44]. Since the stable redox state of copper during quercetin autoxidation is actually  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (Figure 10), the copper-induced quercetin autoxidation is proposed to take place from the quercetin- $\text{Cu}^{\text{I}}$  complex after eventual reduction of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  within its complex with quercetin (Scheme 3). Since  $\text{H}_2\text{O}_2$  is accumulated during copper-initiated autoxidation of quercetin (Figure 8), it may be proposed that the complexes involving  $\text{Cu}^{\text{I}}$  and the quercetin oxidation products are not able to decompose  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fenton reaction).

The rate constants for metal-quercetin complexation and quercetin autoxidation are summarized

in Table IX for all metal ions investigated in this work. It must be emphasized that the whole kinetic analysis is mainly aimed at dissociating binding from autoxidation processes to give an estimation of the apparent rate constants of quercetin autoxidation ( $k_a$ ). Most probably, multiple redox processes simultaneously operate in quercetin autoxidation: autoxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , reduction of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  by quercetin (up to 9 equiv of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  after incubation for 2 h in a pH 7.4 phosphate buffer at  $37^\circ\text{C}$  [38]), Fenton reaction (at least in the presence of the Fe ions)... However, because of the distinct spectral properties of quercetin, its metal complexes and primary oxidation products, an approximate separation between metal-quercetin binding and quercetin autoxidation is possible. As judged from the  $k_a$  values (Table IX), the rate of quercetin autoxidation in the presence or absence of added metal ions varies as follows in neutral complexing conditions (no EDTA):  $\text{Cu}^{\text{I}} > \text{Cu}^{\text{II}} \gg$  no metal added  $> \text{Fe}^{\text{II}} \approx \text{Fe}^{\text{III}}$ . The iron complexes are only weakly redox active, probably because of their low spin. The absence of discrimination between  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is in agreement with the fast autoxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  to  $\text{Fe}^{\text{III}}$  which is not inhibited by quercetin (Figure 3). By contrast, the copper complexes are strongly redox active. Since the  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -induced autoxidation of quercetin appears significantly faster than the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -induced process, it can be proposed that the reduction of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  by quercetin (although relatively fast, see Figure 10) is rate-limiting.

#### Oxidation by $\text{Fe}^{\text{III}}$ in strongly acidic conditions

When quercetin is mixed with  $\text{Fe}^{\text{III}}$  in 0.1 M HCl–MeOH (1:1), oxidation readily proceeds even under  $\text{N}_2$  (Figure 12). By contrast, no reaction takes place with  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Thus, in strongly acidic conditions where  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is essentially under its free highly oxidizing  $\text{Fe}^{3+}$  form and quercetin under its neutral unbound form, electron transfer can take place between the two species. Reduction of highly coloured  $\text{Fe}^{\text{III}}$  complexes in mildly acidic aqueous solutions is at the basis of common antioxidant tests [45]. By analogy to a kinetic model already developed for H-atom

Table IX. Rate constants for complexation and autoxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in a 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ).

	$10^{-2}k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1*}$	$10^{-2}k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1\dagger}$	$10^4 k'_1 \text{ s}^{\ddagger}$	$10^5 k_a \text{ s}^{\S}$
No metal added	–	–	–	6
$\text{Fe}^{\text{III}}$	20–40	0.5–2	4–18	2–4
$\text{Fe}^{\text{II}}$	70–120	10–20	3–17	2–4
$\text{Fe}^{\text{III}}$ –EDTA	–	–	–	20–30
$\text{Fe}^{\text{II}}$ –EDTA	–	–	–	20–30
$\text{Cu}^{\text{II}}$	40–80	–	300–400	30–90
$\text{Cu}^{\text{I}}$	130–170	–	100–200	100–400 <sup>§</sup>
$\text{Cu}^{\text{II}}$ –EDTA	–	–	–	10–20

\* 1:1 metal-quercetin binding. † 2:1 metal-quercetin binding. ‡ Slow rearrangement in the coordination sphere. § Autoxidation with formation of QS. ¶ Slow autoxidation of QS ( $k_{a2} = 4\text{--}5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ).

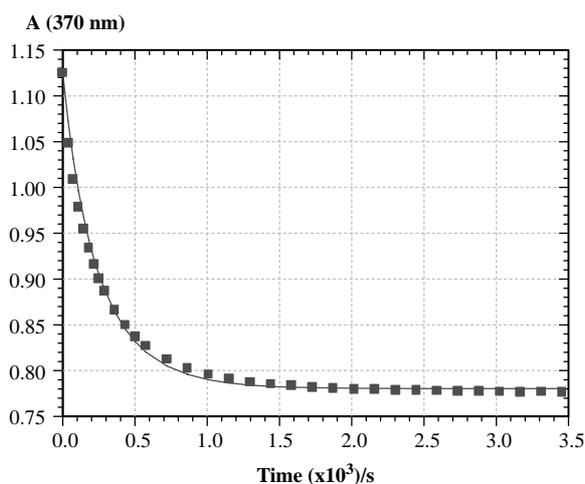


Figure 12. Oxidation of quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) by  $\text{Fe}^{3+}$  (2.5 equiv) in 0.1 M HCl–MeOH (1:1) (37°C). The solid line is the result of the curve-fitting procedure (see text).

transfer reactions from polyphenols to the DPPH radical [46], the decay of the visible absorbance of quercetin at 370 nm can be analyzed to evaluate the stoichiometry  $n$  of the reaction (number of  $\text{Fe}^{3+}$  ions reduced per quercetin molecule over 1 h of reaction) and the rate constant  $k_1$  for the first electron transfer from quercetin. To that purpose, it is simply assumed that quercetin is made of  $n$  reducing units  $R$  that all irreversibly transfer one electron to  $\text{Fe}^{3+}$  with the same bimolecular rate constant  $k$ :  $R + \text{Fe}^{3+} \rightarrow R_{\text{ox}} + \text{Fe}^{2+}$ . For the  $\text{Fe}^{\text{III}}$ /quercetin molar ratios selected (in the range 1–5), a fraction of quercetin is spared at the end of the reaction as evidenced by the residual absorbance at 370 nm (Figure 12). Once this plateau is reached, it is assumed that all  $\text{Fe}^{3+}$  has been converted into  $\text{Fe}^{2+}$ .

The following equations can thus be used in the curve-fitting procedure:

$$A = \varepsilon[\text{QH}_2] = \varepsilon[R]/n$$

$$-\frac{d}{dt}[R] = -\frac{d}{dt}[\text{Fe}^{3+}] = k[R][\text{Fe}^{3+}]$$

The initial concentrations are  $(R)_0 = nA_0/\varepsilon$ ,  $(\text{Fe}^{3+})_0 = C$ . The initial rate of quercetin consumption can also be written as:  $k(R)_0(\text{Fe}^{3+})_0 = kn(\text{QH}_2)_0(\text{Fe}^{3+})_0 = k_1(\text{QH}_2)_0(\text{Fe}^{3+})_0$ . Hence,  $k$  can be identified with  $k_1/n$ . The values for  $k_1$  and  $n$  are collected in Table X. As a validation of the simplified data treatment exposed above, these values are in reasonable agreement for the different  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations used. From the  $n$  values, it is clear that quercetin undergoes an extensive oxidative degradation in those conditions since a single quercetin molecule is able to reduce *ca.* seven  $\text{Fe}^{3+}$  ions after 1 h of reaction. This value is only a lower limit since  $A(370 \text{ nm})$  continues to slightly decay beyond 1 h.

Table X. Reduction of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  by quercetin ( $5 \times 10^{-5}$  M) in 0.1 M HCl–MeOH (1:1) (37°C) Molar absorption coefficient of quercetin at 370 nm =  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

$\text{Fe}^{\text{III}}/\mu\text{M}$	$k_1/\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ *	$n^\dagger$
50	$55(\pm 1)$	$7.34(\pm 0.02)$
75	$49(\pm 1)$	$7.12(\pm 0.04)$
125	$82(\pm 1)$	$7.26(\pm 0.01)$
250	$89.0(\pm 0.3)$	$6.67(\pm 0.01)$

\*Rate constant for the first electron transfer from quercetin.

†Stoichiometry (number of  $\text{Fe}^{\text{III}}$  reduced per molecule of quercetin over 1 h).

Such high  $n$  values are in agreement with those measured in DPPH scavenging experiments [46] ( $n \approx 5$ ) and in the reduction of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  by quercetin ( $n \approx 9$ ) [38].

## Conclusion

Quercetin, one of the most abundant flavonoids in plants and food, displays contrasted behaviours with iron and copper ions. In strongly acidic conditions where  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is a potent oxidant, quercetin rapidly reduces up to 7 equiv of  $\text{Fe}^{3+}$  without participation of dioxygen. In mildly acidic conditions (pH 5), quercetin quickly binds iron ions with no simultaneous autoxidation. In neutral conditions, quercetin even more quickly binds iron and copper ions (although competition with the phosphate ions from the buffer is very significant). Following complexation, quercetin is oxidized by dioxygen (autoxidation) via distinct mechanisms. In the case of iron ions, the complexes are relatively inert and react with dioxygen even more slowly than free quercetin. Addition of EDTA inhibits iron-quercetin binding and promotes quercetin autoxidation. In the case of the copper ions, the thermodynamically stable complexes are rapidly autoxidized, the reduction of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  by quercetin being the likely rate-determining step. Addition of EDTA inhibits copper-quercetin binding and quercetin autoxidation. Those processes may be of importance in the field of food chemistry since polyphenols and metal ions may come into contact during food processing, conservation and cooking and also in the field of nutrition. Indeed, after food ingestion, significant concentrations of labile iron and copper complexes can be produced in the gastro-intestinal tract because of the catabolism of endogenous ligands [47,48]. Their role in accelerating the autoxidation of dietary antioxidants, thereby altering their bioavailability, certainly deserves more attention.

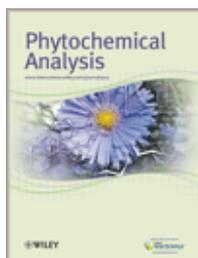
## Acknowledgements

The authors wish to thank the comité mixte inter-universitaire franco-marocain (CMIFM) for financial support (PAI MA/03/85).

## References

- [1] Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55:481–504.
- [2] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:67–202.
- [3] Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content and profile. *J Sci Food Agric* 2000;80:985–1012.
- [4] Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod* 1996;59:205–215.
- [5] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035–1042.
- [6] Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 1997;22:861–870.
- [7] Hurrell RF, Reddy M, Cook JD. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr* 1999;81:289–295.
- [8] Puppo A. Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry* 1992;31:85–88.
- [9] Loughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JRS. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 1989;38:2859–2865.
- [10] Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994;16:845–850.
- [11] Yoshino M, Murakami K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 1998;257:40–44.
- [12] van Acker SABE, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJF. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998;56:935–943.
- [13] Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with  $\alpha$ -linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1313–1323.
- [14] Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997;22:749–760.
- [15] Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, Cantoni O. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: Free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic Biol Med* 1998;25:196–200.
- [16] Yamashita N, Tanemura H, Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutat Res* 1999;425:107–115.
- [17] Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med* 1990;9:441–449.
- [18] Long LH, Clement MV, Halliwell B. Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:50–53.
- [19] Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8:95–108.
- [20] Wee LM, Long LH, Whiteman M, Halliwell B. Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's modified Eagles medium. *Free Radic Res* 2003;37:1123–1130.
- [21] Galati G, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: Glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med* 2001;30:370–382.
- [22] Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002;177:91–104.
- [23] Galati G, O'Brien PJ. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): Absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med* 2004;37:287–303.
- [24] Boersma MG, Vervoort J, Szymusiak H, Lemanska K, Tyrakowska B, Cenas N, Segura-Aguilar J, Rietjens IMCM. Regioselective and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem Res Toxicol* 2000;13:185–191.
- [25] Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. Structure-activity study of the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 2001;14:398–408.
- [26] Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinonoid product. *Free Radic Biol Med* 1999;26:107–116.
- [27] Makris DP, Rossiter JT. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J Agric Food Chem* 2000;48:3830–3838.
- [28] Sodergren E, Nourooz-Zadeh J, Berglund L, Vessby B. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J Biochem Biophys Methods* 1998;37:137–146.
- [29] Welch KD, Davis TZ, Aust SD. Iron autoxidation and free radical generation: Effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:360–369.
- [30] Midorikawa K, Uchida T, Okamoto Y, Toda C, Sakai Y, Ueda K, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S, Kojima N. Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage. *Chem Biol Int* 2004;150:271–281.
- [31] Jungbluth G, Ruhling I, Ternes W. Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous medium. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 2000;1946–1952.
- [32] Utaka M, Takeda A. Copper(II)-catalysed oxidation of quercetin and 3-hydroxyflavone. *J Chem Soc Chem Commun* 1985;1824–1826.
- [33] 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* 1999;1387–1395.
- [34] Jorgensen LV, Cornett C, Justesen U, Skibsted LH, Dragsted LO. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Radic Res* 1998;29:339–350.
- [35] Krishnamachari V, Levine LH, Pare PW. Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: A unified mechanism for quercetin radical scavenging. *J Agric Food Chem* 2002;50:4357–4363.
- [36] Escandar GM, Sala LF. Complexing behavior of rutin and quercetin. *Can J Chem* 1991;69:1994–2001.
- [37] Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for the antioxidant activity? *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1996;2497–2504.
- [38] Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002;36:1199–1208.
- [39] Engelmann MD, Hutcheson R, Cheng IF. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxy-

- flavone (chrysin), and 3',4'-dihydroxyflavone. *J Agric Food Chem* 2005;53:2953–2960.
- [40] Bors W, Michel C, Schikora S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 1995;19:45–52.
- [41] Hynes MJ, Coinceanainn MO. The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *J Inorg Chem* 2001;85:131–142.
- [42] Jameson GNL, Linert W. The oxidation of 6-hydroxydopamine in aqueous solution. Part 3. Kinetics and mechanism of the oxidation with iron(III). *J Chem Soc Perkin Trans 2* 2001;569–575.
- [43] Zhang L, Bandy B, Davison AJ. Effects of metals, ligands and antioxidants on the reaction of oxygen with 1,2,4-benzenetriol. *Free Radic Biol Med* 1996;20:495–505.
- [44] Kamau P, Jordan RB. Kinetic study of the oxidation of catechol by aqueous copper(II). *Inorg Chem* 2002;41:3076–3083.
- [45] Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 2000;48:3396–3402.
- [46] Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem* 2003;51:615–622.
- [47] Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000;33:819–830.
- [48] Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005;81:268S–276S.



**Microwave-assisted Water Extraction of Green Tea Polyphenols**

Journal:	<i>Phytochemical Analysis</i>
Manuscript ID:	PCA-08-12-15.R2
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Nkhili, Ezzohra Tomao, Valerie El Hajji, Hakima Chemat, Farid Dangles, Olivier El Boustani, Es-Seddik
Keywords:	Green tea, Polyphenol, Microwave, Extraction, Antioxidant



1  
2  
3  
4  
5 1  
6 2  
7  
8 3 **Microwave-assisted Water Extraction of Green Tea Polyphenols**  
9  
10 4  
11 5

12  
13 6 **EZZOHRA NKHILI,<sup>1,2</sup> VALERIE TOMAO,<sup>2</sup> HAKIMA EL HAJJI,<sup>3</sup> ES-SEDDIK**  
14 **EL BOUSTANI,<sup>1</sup> FARID CEMAT,<sup>2</sup> and OLIVIER DANGLES<sup>2\*</sup>**  
15  
16  
17 8  
18  
19 9

20  
21 10 <sup>1</sup> Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc

22 11 <sup>2</sup> Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, INRA, UMR408 Sécurité et Qualité  
23 des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France  
24 12

25  
26 13 <sup>3</sup> Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques-Guéliz, Marrakech, Maroc  
27  
28 14  
29 15  
30 16  
31 17  
32 18  
33 19  
34 20  
35 21  
36 22  
37 23  
38 24  
39 25  
40 26  
41 27  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

---

\* Correspondence to: O. Dangles, E-mail: [olivier.dangles@univ-avignon.fr](mailto:olivier.dangles@univ-avignon.fr)

1  
2  
3  
4  
5 1  
6 2 **Abstract:** Microwave-assisted water extraction (MWE) of green tea polyphenols has  
7  
8 3 been investigated as an alternative to solid-liquid extraction under conventional heating.  
9  
10 4 The experimental conditions were selected after consideration of both temperature and  
11  
12 5 extraction time. The efficiency and selectivity of the process were determined in terms  
13  
14 6 of extraction time, total phenolic content, chemical composition and antioxidant activity  
15  
16 7 of the extracts. MWE appears more efficient than conventional water extraction (CWE)  
17  
18 8 at both 80 and 100°C, particularly for the extraction of flavanols and hydroxycinnamic  
19  
20 9 acids. Although MWE at 100°C typically affords higher yields in total phenols, MWE at  
21  
22 10 80°C appears more convenient for the extraction of the green tea-specific and  
23  
24 11 chemically sensitive flavanols.  
25  
26 12  
27  
28 13  
29  
30 14 **Keywords:** Green tea; Polyphenol; Microwave; Extraction; Antioxidant.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## STRUCTURED ABSTRACT

**Introduction** - Green tea, a popular drink with beneficial health properties, is a rich source of specific flavanols (polyphenols). There is a special interest in the water extraction of green tea polyphenols since the composition of the corresponding extracts is expected to reflect the one of green tea infusions consumed worldwide.

**Objective** - To develop a microwave-assisted water extraction (MWE) of green tea polyphenols.

**Methodology** - MWE of green tea polyphenols has been investigated as an alternative to water extraction under conventional heating (CWE). The experimental conditions were selected after consideration of both temperature and extraction time. The efficiency and selectivity of the process were determined in terms of extraction time, total phenolic content, chemical composition (HPLC-MS analysis) and antioxidant activity of the extracts.

**Results** - By MWE (80°C, 30 min), the flavanol content of the extract reaches 97.46 ( $\pm$  0.08) mg of catechin equivalent / g of green tea extract, *vs.* only 83.06 ( $\pm$  0.08) by CWE (80°C, 45 min). In particular, the concentration of the most bioactive flavanol EGCG is 77.14 ( $\pm$  0.26) mg of catechin equivalent / g of green tea extract obtained by MWE, *vs.* 64.18 ( $\pm$  0.26) mg / g by CWE.

**Conclusion** - MWE appears more efficient than CWE at both 80 and 100°C, particularly for the extraction of flavanols and hydroxycinnamic acids. Although MWE at 100°C typically affords higher yields in total phenols, MWE at 80°C appears more convenient for the extraction of the green tea-specific and chemically sensitive flavanols.

## 1 INTRODUCTION

2  
3 Green tea, a water extract of the nonfermented leaves of *Camellia sinensis* L., is a very  
4 popular drink in East Asian countries and is becoming increasingly popular worldwide  
5 partly because of more documented evidence about its beneficial health properties. The  
6 chemical composition of green tea is close to that of the fresh tea leaves (Chen *et al.*,  
7 2003). Green tea is a rich source of caffeine (3-6%) and polyphenols (25-40%)  
8 including flavanols, flavonols, flavanones and phenolic acids (Pelillo *et al.*, 2002; Zuo  
9 *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2003; Del Rio *et al.*, 2004; Atoui *et al.*, 2005). Recently,  
10 the role of green tea consumption in the prevention of chronic diseases has received  
11 great attention (Zaveri, 2006). In particular, several recent studies have suggested a role  
12 for the tea flavanols in the protection against cancer (Lambert and Yang, 2003; Hou *et*  
13 *al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2006), coronary diseases (Chen, 2006) and neurodegeneration  
14 (Weinreb *et al.*, 2004). The most abundant green tea polyphenols (GTPs) are the  
15 flavanols catechin (C), epicatechin (EC), galliccatechin (GC), epigallocatechin (EGC),  
16 catechin 3-*O*-gallate (CG), galliccatechin 3-*O*-gallate (GCG), epicatechin 3-*O*-gallate  
17 (ECG) and epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCG).

18 The current interest in the health effects of green tea has stimulated the  
19 development of new processes for the extraction of the polyphenolic fraction (Gulati *et*  
20 *al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003; Sultana *et al.*, 2008). Indeed, the quality of polyphenol  
21 extracts and their antioxidant activity depend not only on the quality of the starting  
22 material (geographic origin, climatic conditions, harvesting date, storage conditions),  
23 but also on the technological processes involved in its manufacture. In particular,  
24 extraction must take place under mild and efficient conditions that minimize the  
25 possible alteration of tea flavanols, which are especially prone to epimerization and  
26 oxidative oligomerization (Wang and Helliwell, 2000; Roginsky and Alegria, 2005;  
27 Wang *et al.*, 2006). In general, the conventional techniques for GTP extraction are  
28 heating, boiling, Soxhlet extraction and cold extraction, which are all limited by long  
29 extraction periods and low extraction efficiency. On the other hand, microwave  
30 dielectric heating has been successfully applied to the extraction of natural products that  
31 typically needed hours to reach completion with conventional methods (Wang and  
32 Weller, 2006). Using microwaves, fully reproducible extractions could be completed in

1 minutes, thereby leading to reduced solvent and energy consumption, simplified  
2 manipulation and work-up, higher purity of the final product and eliminating the post-  
3 treatment of waste water. Several classes of natural products such as essential oils  
4 (Lucchesi *et al.*, 2004), bioactive compounds from herbs (Hao *et al.*, 2002), GTPs and  
5 caffeine (Gulati *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003; Sultana *et al.*, 2008) as well as  
6 environmental contaminants (Vidal *et al.*, 2007) have been efficiently extracted from a  
7 variety of matrices.

8 Previous works have shown that extraction of GTPs and caffeine in water-  
9 ethanol (1:1) at boiling point (*ca.* 85°C) is as efficient under microwave irradiation (700  
10 W) for 4 min as under conventional heating for 45 min (Pan *et al.*, 2003). However, the  
11 influence of the heating mode on the concentrations of specific GTPs in the extracts was  
12 not addressed. Very recently, a study also highlighted the potential of microwave-  
13 assisted extraction for the extraction of green tea flavanols (Sultana *et al.*, 2008).  
14 However, the influence of the extraction parameters (time, temperature) was not  
15 reported.

16 There is a special interest in the water extraction of green tea polyphenols since  
17 the composition of the corresponding extracts is expected to reflect the one of green tea  
18 infusions consumed worldwide. Of course, green tea water extracts must also contain  
19 polysaccharides and proteins, which based on their reported composition (Wang *et al.*,  
20 2008) are not expected to strongly interfere in the chemical tests for total phenol  
21 determination and antioxidant activity. The aim of the present study is to investigate in  
22 details the microwave-assisted water extraction (MWE) of the different subclasses of  
23 green tea polyphenols (flavanols, flavonols, phenolic acids) in comparison with the  
24 conventional water extraction (CWE) in term of extraction period, yields, chemical  
25 composition of the extracts, antioxidant activity and energetic cost.

## 27 **EXPERIMENTAL**

29 **Materials.** Green tea was from the Moroccan society of green tea and sugar (SMS tea,  
30 Casablanca, Morocco). Catechin, epicatechin, epicatechin 3-*O*-gallate, epigallocatechin  
31 3-*O*-gallate, gallic acid and caffeine were from Extrasynthese (Genay, France). Rutin  
32 (99.9%), linoleic acid (99.5%), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (99.9%), tween 20 and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% aqueous

1 solution) were all from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The Folin-  
2 Ciocalteu reagent was from Fluka (Buchs, Switzerland). HPLC-grade acetonitrile and  
3 formic acid were from Prolabo (Paris, France). Water was previously purified on a  
4 Milli-Q System (Bedford, MA, USA).

5  
6 **Standard solutions.** Millimolar stock solution of epicatechin, catechin,  
7 epigallocatechin, epigallocatechin 3-*O*-gallate, epicatechin 3-*O*-gallate, caffeine and  
8 gallic acid were prepared in Milli-Q water.

9  
10 **Microwave reactor.** MWE was performed in a “DryDist” microwave laboratory oven  
11 (Milestone, Bergamo, Italy). The multimode microwave reactor (2450 MHz) delivers a  
12 maximal power of 1000 W in 10 W increments. The dimensions of the PTFE coated  
13 cavity are 35 cm × 35 cm × 35 cm. Experimental parameters (time, temperature,  
14 pressure, power) can be controlled with the “easy-WAVE” software package.  
15 Temperature was monitored by a shielded thermocouple (ATC-300) inserted directly  
16 into the sample container and by an external infrared sensor. Temperature was  
17 controlled by a feedback to the microwave power regulator.

18  
19 **UV-visible spectroscopy.** UV-visible spectra of green tea extracts were recorded using  
20 a Hewlett-Packard 8452 diode-array spectrometer (Palo Alto, CA, USA) equipped with  
21 a magnetically stirred quartz cell (optical pathlength: 1 cm) thermostated by a water  
22 bath. Absorbance values were measured at 280 nm (total phenols), 330 nm  
23 (hydroxycinnamic acids) and 350 nm (flavonols).

24  
25 **HPLC analyses.** HPLC analyses were carried out at 35°C on a Waters (Mildford, MA,  
26 USA) apparatus equipped with a Model 600 pump and a Model 600 gradient controller,  
27 to which were connected a Model 717 autosampler and a Model 996 photodiode-array  
28 detector. Separation was achieved on a 5 µm Purospher Star C<sub>18</sub> 250x4.6 mm column  
29 with a 5 µm Purospher Star C<sub>18</sub> guard column (Merck, Darmstadt, Germany). The  
30 binary solvent system used was composed of solvent A (13.3x10<sup>-3</sup> mol/L formic acid in  
31 water) and solvent B (acetonitrile). The best separation was obtained with the following  
32 gradient : at 0 min, 99% A/1% B, at 12 min, 80% A/20% B, at 18 min, 0% A/100% B,

1 at 24 min, 0% A/100% B. The solvent flow rate was 1 mL/min. The volume injected  
2 was 20  $\mu$ L. The spectroscopic detection was performed in the range 200-800 nm with a  
3 resolution of 1.2 nm. All runs were acquired and processed using the Millennium  
4 software (Waters, Milford, MA, USA). HPLC-MS analyses were performed with a  
5 Hewlett-Packard 1050 photodiode-array detector (Palo Alto, CA, USA) switched on  
6 line with a LCZ 4000 platform (Micromass, Manchester, UK) equipped with an  
7 electrospray ion source. The best mass spectra were obtained in the negative ion mode.  
8 Ion spray and orifice voltages were set at 25 kV and 50 kV. The column was connected  
9 to the electrospray (ES) interface via a capillary and a split to regulate the flow into the  
10 ES source. UV-Vis detection was performed from 200 to 800 nm. Acquisition of the  
11 mass data was performed between  $m/z$  100 and 1000. The program used for data  
12 analyses was Masslynx (version 3.4).

## 14 **Methods.**

16 **Conventional water extraction.** 6.0 g of green tea were infused in 120 mL of Milli-Q  
17 water at 80°C or 100°C by stirring under conventional heating for 60 min. Sampling  
18 took place at intervals from 5 min to 60 min. For analysis, 1.0 mL of the supernatant  
19 solution was taken up and filtered through a 0.45  $\mu$ m cellulose regenerated filter  
20 (Alltech Associates, Deerfield, IL, USA). 20  $\mu$ L of the filtered sample was added to 2  
21 mL of Milli-Q water and placed in the spectrophotometer cell for recording the  
22 absorbance at 280 nm (total phenolic content), 330 nm (hydroxycinnamic acids) and  
23 350 nm (flavonols). Extractions were performed in triplicate.

25 **Microwave-assisted water extraction.** 6.0 g of green tea were infused in 120 mL of  
26 Milli-Q water at 80°C or 100°C in the microwave oven for 60 min. The irradiation  
27 power was set at 600 W. Sampling and analysis conditions are as described above.

29 **Total phenolic content.** The total phenolic content of the green tea extracts was  
30 determined using the Folin-Ciocalteu assay (George *et al.*, 2005). The results were  
31 expressed in mg of gallic acid equivalent / g of green tea. For each extract, the analyses  
32 were performed in triplicate.

1  
2  
3  
4  
5 1  
6 2 **Quantification of GTPs by HPLC.** The concentrations of flavanols, phenolic acid and  
7  
8 3 flavanols in the green tea extracts were estimated from calibration curves (peak area vs.  
9  
10 4 concentration) respectively constructed with solutions of catechin ( $0 - 2 \times 10^{-3}$  mol/L,  
11  
12 5 detection at 280 nm,  $R^2 = 0.9995$ ), gallic acid ( $0 - 3 \times 10^{-4}$  mol/L, detection at 280 nm,  $R^2$   
13  
14 6 = 0.9992) and rutin ( $0 - 5 \times 10^{-4}$  mol/L, detection at 370 nm,  $R^2 = 0.9994$ ) in Milli-Q  
15  
16 7 water.

17 8  
18  
19 9 **Inhibition of linoleic acid peroxidation by the green tea extracts.** A freshly prepared  
20  
21 10  $2 \times 10^{-3}$  mol/L linoleic acid solution (2 mL) in a pH 7.4 phosphate buffer (0.01 mol/L)  
22  
23 11 containing tween 20 ( $1.22 \times 10^{-3}$  mol/L) was placed at 37°C in the spectrometer cell.  
24  
25 12 Then, 20  $\mu$ L of a  $5 \times 10^{-3}$  mol/L solution of  $H_2O_2$  in Milli-Q water was added, followed 2  
26  
27 13 min later by 20  $\mu$ L of a  $5 \times 10^{-3}$  mol/L solution of  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  in MeOH. The absorbance  
28  
29 14 of the conjugated dienes formed during the peroxidation process was monitored at 234  
30  
31 15 nm (molar absorption coefficient = 26100 L/mol/cm). Once a constant peroxidation rate  
32  
33 16 was achieved, a given volume (20  $\mu$ L) of the green tea extract solution was added. From  
34  
35 17 the slope of the linear absorbance vs. time plots before addition (evaluated in the range  
36  
37 18 25-35 min), the uninhibited peroxidation rate ( $R_p^0$ ) was estimated. Similarly, the  
38  
39 19 inhibited peroxidation rate ( $R_p$ ) was calculated in the time interval 45-66 min, i.e. 10  
40  
41 20 min after addition of the green tea extract solution.

## 42 **RESULTS AND DISCUSSION**

43  
44 23  
45  
46 24 Green tea has been receiving considerable attention for its possible role in the  
47  
48 25 prevention of cardiovascular diseases and cancers, which could be ascribed to the  
49  
50 26 presence in green tea of specific polyphenols (flavanols). The present study is aimed at  
51  
52 27 developing an efficient MWE method for the extraction of green tea polyphenols. For  
53  
54 28 this purpose, microwave-assisted and conventional water extractions were compared in  
55  
56 29 terms of extraction kinetics, phenolic composition and concentration, and antioxidant  
57  
58 30 activity of the corresponding extracts.

### 59 31 60 32 **Kinetics of GTP extraction**

1  
2  
3  
4  
5 1  
6 2 In order to compare MWE and CWE in terms of the time required for maximal  
7 3 extraction of GTPs, a kinetic study was carried out at 80°C and 100°C with UV-visible  
8 4 monitoring (Fig. 1). Clearly, MWE at 100°C was the best procedure both in terms of  
9 5 yield and duration, thus leading to a quantitative extraction of the three polyphenol  
10 6 subclasses after 20 min. MWE at 80°C was roughly equivalent to CWE at 100°C. After  
11 7 20 min at 100°C, the yield of total polyphenols was increased by more than 50% by  
12 8 shifting from CWE to MWE. The gain is most pronounced for hydroxycinnamic acids  
13 9 (*ca.* a factor 2). It can also be noted that flavonols are more prone to degradation at  
14 10 100°C during CWE than during MWE.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

## 24 12 **Phenolic contents**

25  
26 13  
27 14 The Folin-Ciocalteu assay for the estimation of the total phenolic content did not allow  
28 15 a clear discrimination between MWE and CWE at 80°C. However, at 100°C, MWE  
29 16 during 20 min afforded a significantly higher phenolic concentration in the extracts than  
30 17 CWE during 40 min (Table 1). The total concentrations of flavanols, phenolic acids and  
31 18 flavonols in green tea extracts (Table 2) were measured from calibration curves  
32 19 expressing the peak area *vs.* concentration of the appropriate internal standard (catechin  
33 20 for flavanols, gallic acid for phenolic acids, rutin for flavonols). All plots were linear  
34 21 across the concentration range studied. MWE of 20 min at 100°C yielded higher  
35 22 concentrations of all polyphenol subclasses than CWE of 40 min at the same  
36 23 temperature. In fact, MWE offers a rapid delivery of energy to a total volume of solvent  
37 24 and plant with subsequent efficient and homogenous heating of the solvent and solid  
38 25 plant matrix (Wang and Weller, 2006). The higher efficiency of MWE *vs.* CWE reflects  
39 26 the combined effect of more efficient release of polyphenols from the plant matrix  
40 27 induced by the microwave-assisted breakdown of cell components (Gulati *et al.*, 2003)  
41 28 and less thermal degradation of the compounds due to the shorter heating period. MWE  
42 29 of phenolic acids was more efficient at 100°C, whereas the thermally sensitive flavanols  
43 30 and flavonols were better extracted at 80°C.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 32 31 **Phenolic profiles**

1  
2  
3  
4  
5 1  
6 2 GTPs in extracts obtained by MWE and CWE were identified by HPLC-DAD-MS  
7  
8 3 analysis (Fig. 2). Identification of flavanols and caffeine was carried out by comparing  
9  
10 4 the UV-visible spectra, retention times and  $m/z$  values (molecular ions and fragments)  
11  
12 5 with those of authentic standards. The major flavanols identified were C, EC, EGC, GC,  
13  
14 6 ECG, and EGCG (Table 3). In addition, flavonol glycosides were identified from their  
15  
16 7  $m/z$  values (molecular ions and aglycone fragments), from their typical UV-visible  
17  
18 8 spectrum with two maxima in the range 240-285 nm (Band II, A-ring) and 300-350 nm  
19  
20 9 (Band I, B-ring), and by comparison with the literature (Sakakibara *et al.*, 2003; Del Rio  
21  
22 10 *et al.*, 2004; Atoui *et al.*, 2005).

22 11 The contents of phenolic acids, flavonols and flavanols in the green tea extracts  
23  
24 12 were estimated from calibration curves constructed with gallic acid, rutin and catechin  
25  
26 13 respectively (Table 2). As expected, EGCG is the most abundant flavanol in the  
27  
28 14 extracts, its concentration being highest using MWE at 80°C. Our extracts are especially  
29  
30 15 rich in EGCG, the most potent antioxidant among green tea flavanols (Gramza and  
31  
32 16 Korczak 2005). The EGCG concentration actually lies in the range 75-80% (w/w) of the  
33  
34 17 total catechin content *vs.* 53-60% in Asian green tea extracts also produced by MWE  
35  
36 18 (Sultana *et al.*, 2008). By contrast, the other flavanols of the *epi* series (EGC, ECG, EC)  
37  
38 19 are in lower concentrations. For a given extraction process (MWE or CWE), EGCG,  
39  
40 20 ECG and EGC appear less abundant in the extracts obtained at higher temperature (100  
41  
42 21 *vs.* 80°C) as a possible consequence of accelerated autoxidation processes. Indeed, the  
43  
44 22 pyrogallol moiety (1,2,3-trihydroxybenzene) displayed by all these polyphenols is  
45  
46 23 especially electron-rich and thus prone to autoxidation (initiated by transition metal  
47  
48 24 traces) (Roginsky and Alegria, 2005). Surprisingly, GC, which also displays a  
49  
50 25 pyrogallol moiety, is detected at 100°C only. Hence, part of the decay of the EGC  
51  
52 26 concentration when the temperature is increased from 80 to 100°C could arise from  
53  
54 27 epimerization of EGC (2,3-*cis*) into the more stable GC (2,3-*trans*) (Wang and  
55  
56 28 Helliwell, 2000). Similarly, EC, which is only detected using MWE at 100°C, could be  
57  
58 29 released from ECG by hydrolysis of the ester bond. Despite the abundance of EGCG in  
59  
60 30 the green tea extracts, its epimerization product GCG is only present in low  
31  
32 31 concentrations. For instance, GCG is *ca.* 30 times less abundant than EGCG in the  
32  
33 32 extract obtained by MWE at 80°C (Table 2). The catechin content in the extracts is in

1 the range 5-8% (w/w) of the total catechin content vs. 0-2% in Asian green tea extracts  
2 also produced by MWE (Sultana *et al.*, 2008). Part of the catechin concentration could  
3 arise from EC in agreement with EC being the green tea flavanol that is most prone to  
4 epimerization in boiling water (Wang and Helliwell, 2000). Overall, MWE at 80°C  
5 seems the best process for extraction of the chemically sensitive green tea flavanols. In  
6 particular, it provides significantly higher concentrations of EGCG, EGC and C than  
7 CWE at the same temperature.

8 Quercetin glycosides are also better extracted at 80°C than at 100°C by both  
9 CWE and MWE. With their oxidizable catechol ring (B-ring), they appear more prone  
10 to thermal degradation than the corresponding kaempferol glycosides (monophenolic B-  
11 ring).

### 12 13 **Antioxidant activity**

14  
15 Many investigations have outlined the potent antioxidant proprieties of tea and GTPs  
16 (Valcic *et al.*, 2000; Gramza and Korczak, 2005; Koutelidakis *et al.*, 2009). As expected  
17 from the variability in polyphenol concentrations, the antioxidant capacity of green tea  
18 extracts strongly depends on the extraction processes used. In this study, the antioxidant  
19 capacity was evaluated by the inhibition of the Cu<sup>2+</sup>-induced peroxidation of linoleic  
20 acid (LH) in SDS micelles. The accumulation of the lipid hydroperoxides (LOOH,  
21 conjugated dienes) was monitored at 234 nm to estimate the peroxidation rate in the  
22 absence or presence of GTPs (resp., R<sub>p</sub><sup>0</sup> and R<sub>p</sub>) (Fig. 3). For a given volume of extract,  
23 the lower the R<sub>p</sub>/R<sub>p</sub><sup>0</sup> ratio the higher the antioxidant capacity. The extract obtained by  
24 MWE at 80°C provided a better protection against lipid peroxidation than the other  
25 extracts in agreement with its higher flavanol content (Table 2). Tea flavanols are  
26 probably the major contributors to the overall antioxidant activity of green tea extracts  
27 because of their high concentrations and because of they are efficient electron and H-  
28 atom donors through their catechol and pyrogallol groups. In addition, the radical-  
29 scavenging capacities of tea flavanols have been ranked as follows: EGCG > ECG >  
30 EGC > C (Gramza and Korczak 2005). It is thus no surprise that the extract obtained by  
31 MWE at 80°C, which has the highest total flavanol and EGCG concentrations, also  
32 displays the highest antioxidant capacity.

## Environmental aspects and possible scale-up

For green tea polyphenols, CWE required an extraction period of 45 min *vs.* 15 min only for MWE. The energy required by the extraction process (determined with a wattmeter at the entrance of the microwave generator and from the electrical heater power supply) is thus 0.75 kWh for CWE and 0.25 kWh for MWE. At the same time, the calculated quantity of CO<sub>2</sub> released in the atmosphere is 600 g for CWE and only 200 g for MWE (based on the general assumption that 800 g of CO<sub>2</sub> are released in the atmosphere for the production of 1 kWh from fossil fuel combustion). This simple calculation (only based on energy consumption) suggests that MWE could reduce CO<sub>2</sub> emission by a factor 3, which is significant if MWE is amenable to scale-up for industrial applications. In fact, MWE could probably be used to produce large quantities of tea extracts by using available large-scale microwave extraction reactors, which are suitable for 10 to 100 kg of tea per batch (Pare and Belanger 1997).

In conclusion, this study shows that microwave-assisted water extraction is especially suitable for the production of green tea extracts rich in polyphenols. Although MWE at 100°C appears more efficient for the extraction of hydroxycinnamic acids, MWE at 80°C better preserves the thermally sensitive and tea-specific flavanols and leads to the highest concentration of EGCG and antioxidant activity in the extract. Moreover, MWE offers important advantages over conventional methods, such as shorter extraction times, substantial savings of energy and a reduced environmental burden (less CO<sub>2</sub> rejected in the atmosphere). Hence, MWE comes up as an appropriate method for the extraction of antioxidants from tea leaves.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the “Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain” (CMIFM) for financial support (PAI MA/03/85).

## REFERENCES

- 1  
2  
3  
4 1 Atoui AK., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: their  
5 2 antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* **89**: 27-36.  
6  
7  
8 3 Chen CN., Liang CM., Lai JR., Tsai YJ., Tsay JS., Lin JK. 2003. Capillary  
9 4 electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves  
10 5 and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration. *J Agric*  
11 6 *Food Chem* **51**: 7495-7503.  
12  
13  
14  
15 7 Chen TO. 2006. All teas are not created equal: The Chinese green tea and  
16 8 cardiovascular health. *Int J Cardiol* **108**: 301-308.  
17  
18  
19 9 Del Rio D., Stewart AJ., Mullen W., Burns J., Lean MEJ., Brighenti F., Crozier A.  
20 10 2004. HPLC-MS<sup>n</sup> analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and  
21 11 black tea. *J Agric Food Chem* **52**: 2807-2815.  
22  
23  
24 12 George S., Brat P., Alter P., Amiot MJ. 2005. Rapid determination of polyphenols and  
25 13 vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* **53**: 1370-1373.  
26  
27  
28 14 Gramza A., Korczak J. 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in  
29 15 lipid systems. *Trends Food Sci Technol* **16**: 351-358.  
30  
31 16 Gulati A., Rawat R., Singh B., Ravindranath SD. 2003. Application of microwave  
32 17 energy in the manufacture of enhanced-quality green tea. *J Agric Food Chem* **51**:  
33 18 4764-4768.  
34  
35  
36 19 Hao JY., Han W., Huang SD, Xue BY., Deng X. 2002. Microwave-assisted extraction  
37 20 of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Sep Purif Technol* **28**: 191-196.  
38  
39  
40 21 Hou Z., Lambert JD., Chin KV., Yang CS. 2004. Effects of tea polyphenols on signal  
41 22 transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutation Res* **555**: 3-19.  
42  
43  
44 23 Koutelidakis AE., Argiri K., Serafini M., Proestos C., Komaitis M., Pecorari M.  
45 24 Kapsokefalou M. 2009. Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase  
46 25 the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* **25**: 453-458.  
47  
48  
49 26 Lambert JD. Yang CS. 2003. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea  
50 27 and tea polyphenols. *Mutation Res* **523-524**: 201-208.  
51  
52  
53 28 Lucchesi ME., Chemat F., Smadja J. 2004. Solvent free microwave extraction of  
54 29 essential oils from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation.  
55 30 *J Chromatogr A* **1043**: 323-327.  
56  
57  
58 31 Pan X., Niu G., Liu H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea  
59 32 caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Proc* **42**: 129-133.  
60

- 1 Pare JRJ., Belanger JMR. 1997. *Instrumental Methods in Food Analysis*, Elsevier,  
2 Amsterdam.
- 3 Pelillo M., Biguzzi B., Bendini A., Gallina Toschi T., Vanzini M., Lercker G. 2002.  
4 Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray  
5 detection for the analysis of tea catechins. *Food Chem* **78**: 369-374.
- 6 Roginsky V., Alegria AE. 2005. Oxidation of tea extracts and tea catechins by  
7 molecular oxygen. *J Agric Food Chem* **53**: 4529-4535.
- 8 Sakakibara H., Yoshinori H., Satoshi N., Hitoshi A., Kazuki K. 2003. Simultaneous  
9 determination of all polyphenols in vegetables, fruit, and teas. *J Agric Food Chem*  
10 **51**: 571-581.
- 11 Stuart EC., Scandlyn MJ, Rosengren RJ. 2006. Role of epigallocatechin gallate (EGCG)  
12 in the treatment of breast and prostate cancer. *Life Sci* **79**: 2329-2336.
- 13 Sultana T., Stecher G., Mayer R., Trojer L., Qureshi MN., Abel G., Popp M., Bonn GK.  
14 2008. Quality assessment and quantitative analysis of flavonoids from tea samples  
15 of different origins by HPLC-DAD-ESI-MS. *J Agric Food Chem* **56**: 3444-3453.
- 16 Valcic S., Burr JA., Timmermann BN., Leibler DC. 2000. Antioxidant chemistry of  
17 green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-  
18 epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chem Res Toxicol* **13**:  
19 801-810.
- 20 Vidal L., Domini CE., Grane N., Psillakis E., Canals A. 2007. Microwave-assisted  
21 headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes from water samples. *Anal*  
22 *Chim Acta* **592**: 9-15.
- 23 Wang H., Helliwell K. 2000. Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food*  
24 *Chem* **70**: 337-344.
- 25 Wang L., Weller CL. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.  
26 *Trends Food Sci Technol* **17**: 300-312.
- 27 Wang R., Zhou W., Huiyi Wen RA. 2006. Kinetic study of the thermal stability of tea  
28 catechins in aqueous systems using a microwave reactor. *J Agric Food Chem* **54**:  
29 5924-5932.
- 30 Wang D., Zhou X., Li L., Hou Y., Sun J., Wang J. 2008. A rapid quantitative method  
31 for polysaccharides in green tea and oolong tea. *Eur Food Res Technol* **226**: 691-  
32 696.

- 1  
2  
3  
4  
5 1 Weinreb O., Mandel S., Amit T., Youdim Moussa BH. 2004. Neurological mechanisms  
6 of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Nutr Biochem*  
7 **15**: 506-516.  
8  
9  
10 4 Zaveri NT. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer  
11 and noncancer applications. *Life Sci* **78**: 2073-2080.  
12  
13 6 Zuo Y., Chen H., Deng Y. 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and  
14 gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode  
15 array detector. *Talanta* **57**: 307-316.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

**Table 1** Influence of the extraction conditions on the phenolic content of green tea extracts

Method	T (°C)	Duration (min)	Total phenolic content <sup>a</sup>
MWE	100	20	111.28 (± 0.05)
MWE	80	30	84.10 (± 0.05)
CWE	100	40	102.20 (± 0.15)
CWE	80	45	87.09 (± 0.02)

<sup>a</sup> mg of gallic acid equivalent / g of green tea extract

**Table 2** Chemical composition of green tea extracts obtained by MWE and CWE.

GTPs <sup>a</sup>	MWE	CWE	MWE	CWE
	(100°C, 20 min)	(100°C, 40 min)	(80°C, 30 min)	(80°C, 45 min)
Phenolic acids	0.83 (± 0.01) <sup>b</sup>	0.71 (± 0.01)	0.65 (± 0.01)	0.59 (± 0.02)
Flavanols	77.93 (± 0.07)	65.38 (± 0.13)	97.46 (± 0.08)	83.06 (± 0.08)
Flavonols	1.42 (± 0.02)	1.23 (± 0.03)	1.56 (± 0.01)	1.55 (± 0.02)
Peak, t <sub>R</sub> (min), compound				
1, 6.83, gallic acid	0.49 (± 0.01)	0.36 (± 0.01)	0.31 (± 0.01)	0.27 (± 0.02)
2, 7.86	0.34 (± 0.01)	0.35 (± 0.01)	0.34 (± 0.01)	0.32 (± 0.01)
5-galloylquinic acid				
3, 10.62, GC	2.90 (± 0.02)	3.38 (± 0.01)	-	-
4, 12.72, EGC	5.48 (± 0.03)	5.99 (± 0.05)	8.67 (± 0.03)	7.33 (± 0.02)
5, 13.35, C	5.77 (± 0.02)	4.06 (± 0.03)	5.49 (± 0.02)	4.43 (± 0.02)
6, 13.78, caffeine	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
7, 14.94, EC	2.17 (± 0.02)	-	-	-
8, 15.03, EGCG	58.38 (± 0.34)	49.47 (± 0.53)	77.14 (± 0.26)	64.18 (± 0.26)
9, 15.53, GCG	2.82 (± 0.13)	3.79 (± 0.38)	2.40 (± 0.09)	ND <sup>c</sup>
10, 17.04, rutin <sup>d</sup>	3.23 (± 0.01)	2.48 (± 0.01)	6.16 (± 0.01)	7.12 (± 0.02)
11, 17.67, ECG	0.81 (± 0.04)	0.56 (± 0.05)	1.06 (± 0.02)	1.23 (± 0.03)
12, 18.67, quercetin 3- <i>O</i> - glucose or galactose	0.11 (± 0.01)	0.09 (± 0.01)	0.22 (± 0.01)	0.11 (± 0.01)
13, 19.07, kaempferol 3- <i>O</i> -glucose or galactose	0.24 (± 0.02)	0.26 (± 0.03)	-	-
14, 19.73, kaempferol 3- <i>O</i> -glucose or galactose	0.26 (± 0.01)	0.32 (± 0.02)	0.28 (± 0.01)	0.21 (± 0.01)

<sup>a</sup> Concentrations in mg of standard equivalent / g of green tea extract ± SD (n = 3). Standard compounds for phenolic acids, flavanols and flavonols are gallic acid, catechin and rutin, respectively. <sup>b</sup> Concentrations are the sums of the concentrations of the major compounds identified in each class (see Table 3). <sup>c</sup> ND: not determined. <sup>d</sup> Quercetin 3-*O*-rutinoside

**Table 3** HPLC-DAD-MS analysis of GTPs obtained by MWE and CWE

peak	t <sub>R</sub> (min)	Extraction process	m/z [M- H] <sup>-</sup>	m/z fragment ions	λ <sub>max</sub> (nm)	Proposed structure
1	6.83	All 4 processes	169		272	Gallic acid
2	7.86	All 4 processes	343	191, 169	274	5-Galloylquinic acid
		MWE and CW				
3	10.62	at 100°C	305	261, 221, 179	274	GC
4	12.72	All 4 processes	305	261, 221, 179	274	EGC
5	13.35	All 4 processes	289	245, 205	276	C
6	13.78	All 4 processes	193		274	Caffeine
7	14.94	MWE at 100°C	289	245, 205	280	EC
8	15.03	All 4 processes	457	331, 305, 169	276	EGCG
		All processes except				
9	15.53	CWE at 80°C	457	331, 305, 169	276	GCG
				301, 271, 151,	256,	
10	17.04	All 4 processes	609	108	352	Rutin <sup>a</sup>
11	17.67	All 4 processes	441	331, 289, 169	278	ECG
					266,	Quercetin 3- <i>O</i> -
12	18.67	All 4 processes	463	301	350	glucose or galactose
		MWE and CWE			266,	Kaempferol 3- <i>O</i> -
13	19.07	at 100°C	447	285	346	glucose or galactose
					266,	Kaempferol 3- <i>O</i> -
14	19.73	All 4 processes	447	285	346	glucose or galactose

<sup>a</sup> Quercetin 3-*O*-rutinoside

**Figure legends**

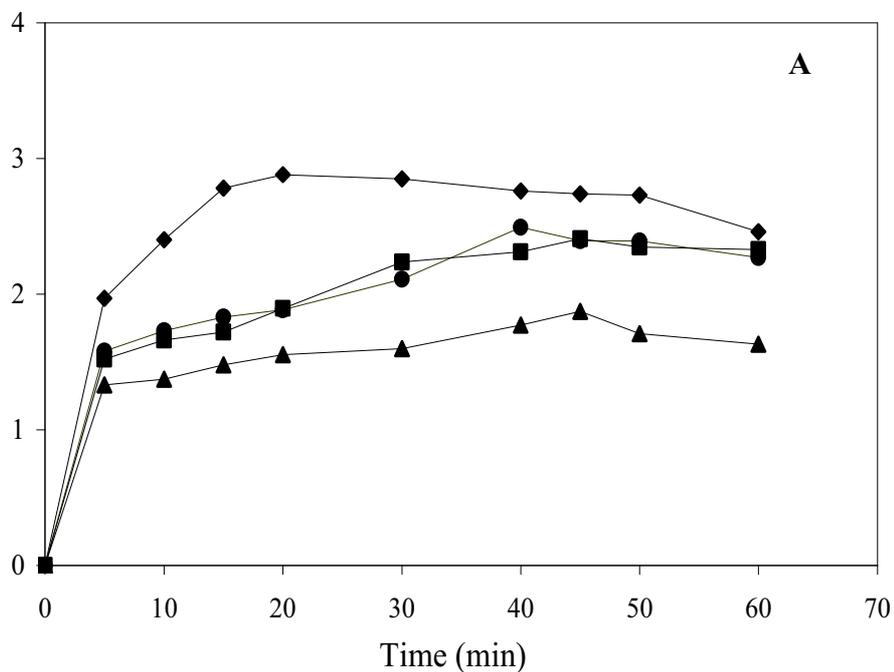
**Figure 1** Extraction of green tea with water (1 g / 20 mL): absorbance of total phenols (**A**, 280 nm), hydroxycinnamic acids (**B**, 330 nm) and flavonols (**C**, 350 nm) in solution of green tea extracts as a function of the extraction time. MWE, 100°C (◆); MWE, 80°C (■); CWE, 100°C (●) and CWE, 80°C (▲).

**Figure 2** HPLC chromatograms of green tea infusions obtained by CWE at 80°C after 45 min (**A**) or by MWE at 100°C after 20 min (**B**). 1 = gallic acid, 2 = 5-galloylquinic acid, 3 = GC, 4 = EGC, 5 = C, 6 = caffeine, 7 = EC, 8 = EGCG, 9 = GCG, 10 = rutin (quercetin-3-rutinoside), 11 = ECG, 12 = quercetin-3-glucoside or galactoside, 13 = kaempferol-3-glucoside or galactoside, 14 = kaempferol-3-glucoside or galactoside.

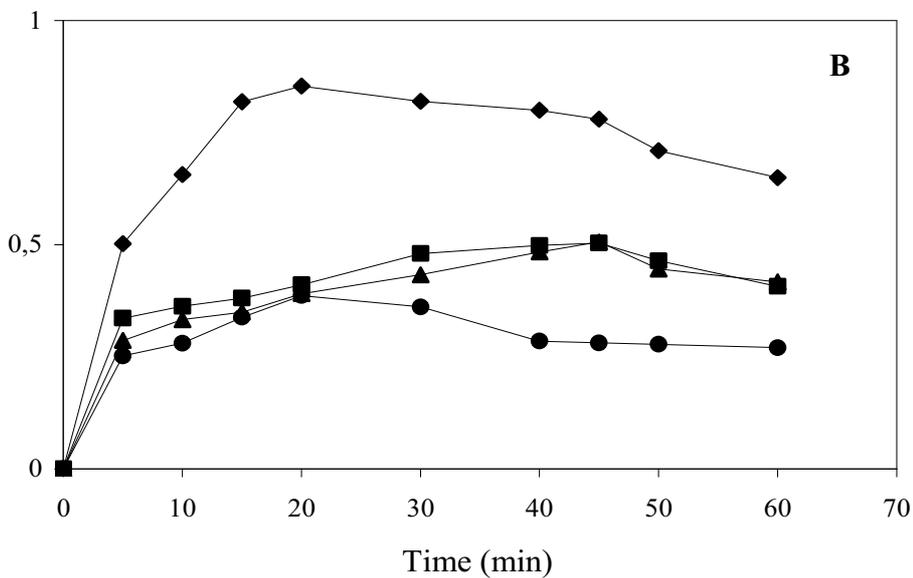
**Figure 3** Inhibition of the peroxidation of linoleic acid initiated by  $\text{Cu}^{\text{II}}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Tween 20 at 37°C, pH 7.4. Inhibition by GTPs extracted according to the different processes: MWE, 100°C, 20 min (◆); MWE, 80°C, 30 min (■); CWE, 80°C, 45 min (●) and CWE, 100°C, 40 min (▲).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

A(280 nm)



A(330 nm)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

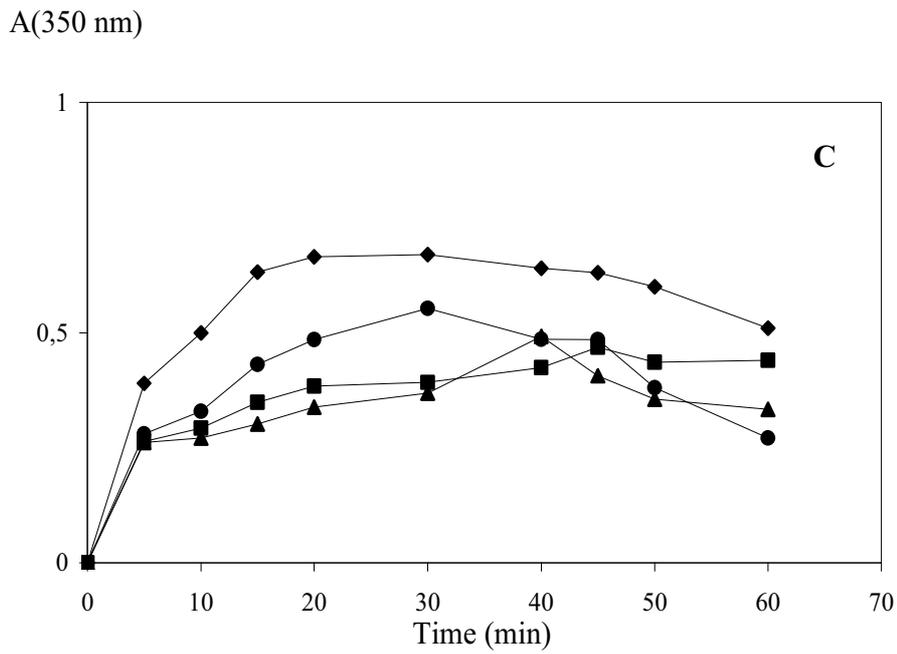


Figure 1

Peer Review

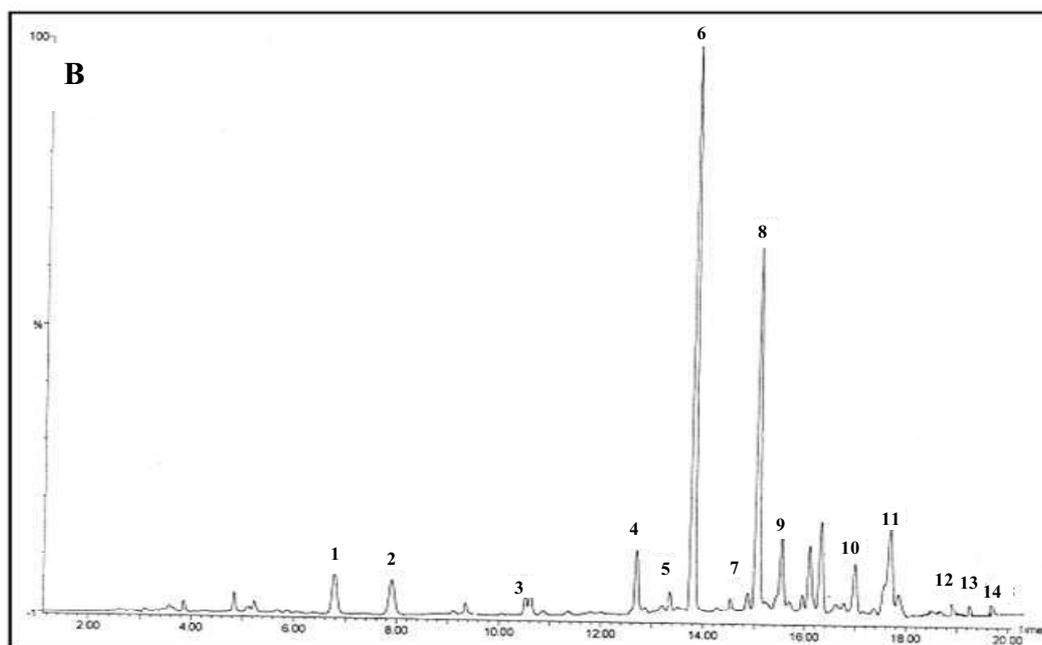
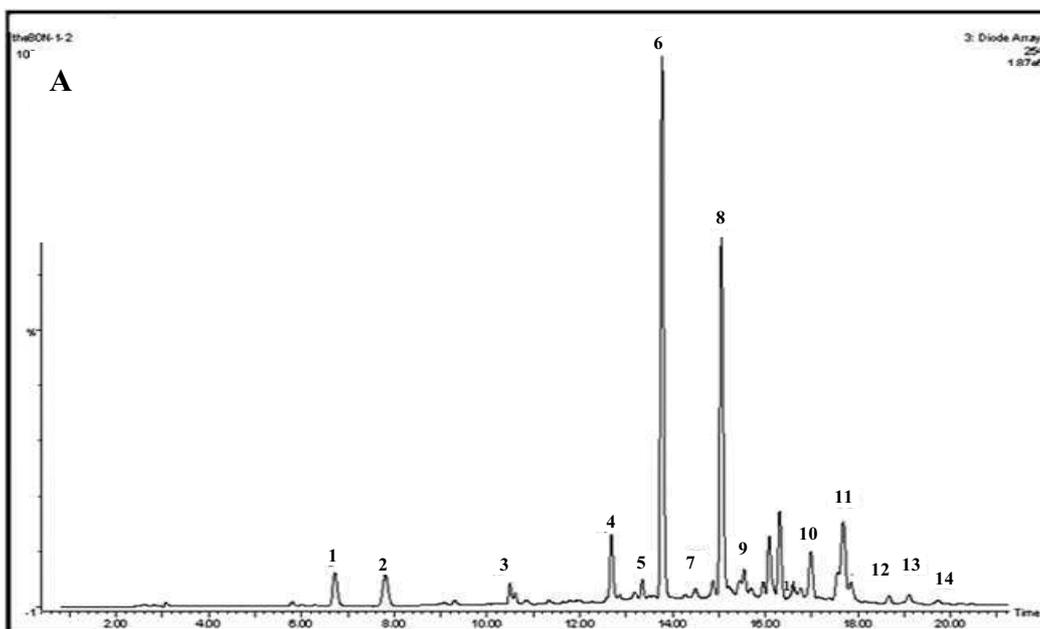


Figure 2

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

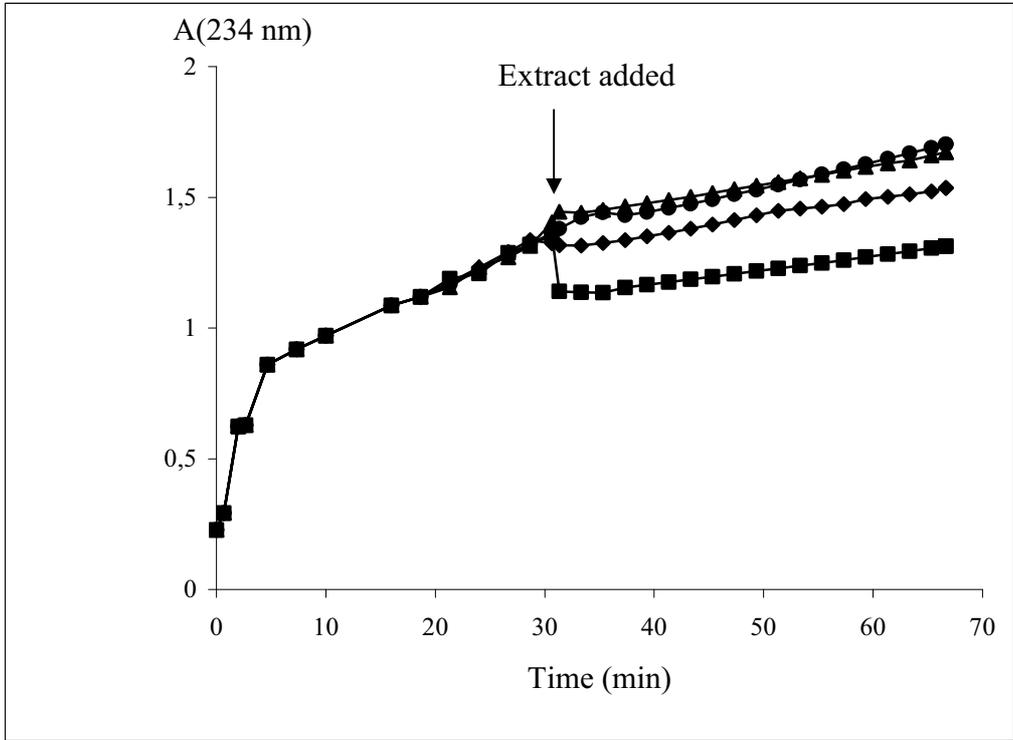
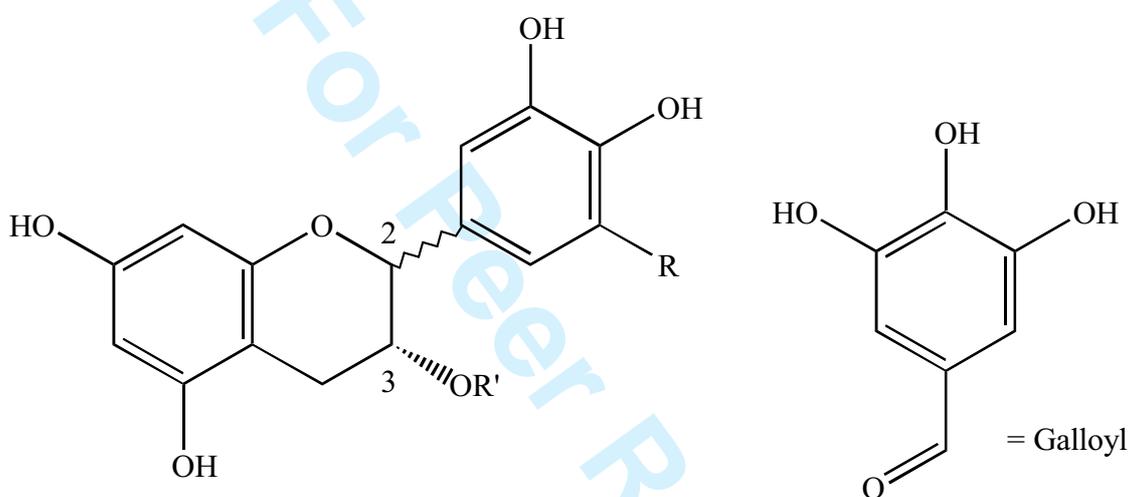
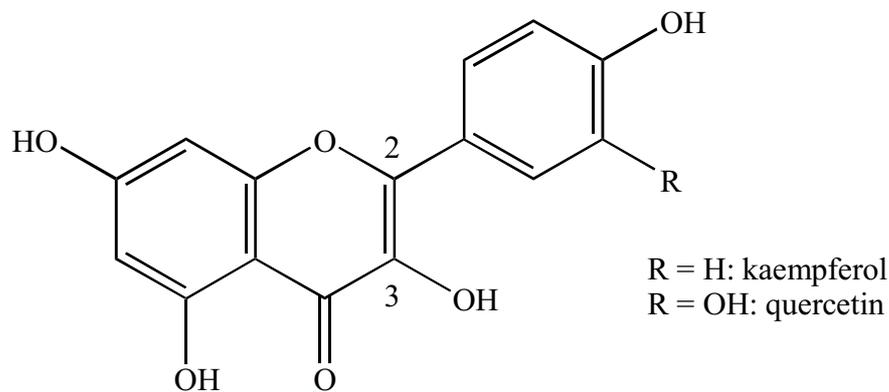


Figure 3



37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

R	R'	C-2 configuration	GTPs
H	H	<i>S</i> (2,3- <i>trans</i> )	C
H	H	<i>R</i> (2,3- <i>cis</i> )	EC
OH	H	<i>S</i>	GC
OH	H	<i>R</i>	EGC
H	Galloyl	<i>S</i>	CG
H	Galloyl	<i>R</i>	ECG
OH	Galloyl	<i>S</i>	GCG
OH	Galloyl	<i>R</i>	EGCG

55  
56  
57  
58  
59  
60

### Structures

**Résumé.** Les polyphénols sont des métabolites secondaires de plantes abondants dans l'alimentation. Les extraire des végétaux dans des conditions douces et efficaces et mieux comprendre leurs mécanismes d'oxydation et d'activité antioxydante constituent des enjeux scientifiques importants qui sont à la base de ce travail. Dans une première partie, la réactivité de polyphénols communs et représentatifs des principales classes (quercétine, rutine, acide caféique, acide gallique, catéchine) avec les ions de métaux de transition d'intérêt biologique ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) a été étudiée par spectroscopie UV-visible (études cinétiques), par CLHP-SM (analyse de produits d'oxydation) et au moyen de divers tests colorimétriques permettant de préciser l'état redox des ions métalliques et la production éventuelle de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En milieu neutre (tampon phosphate), la complexation est généralement rapide et conduit à des complexes relativement stables avec les ions du fer (malgré l'autoxydation rapide de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  en  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ). En revanche, les complexes des ions du cuivre (en particulier  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) sont capables d'activer rapidement  $\text{O}_2$  avec formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxydation du polyphénol et maintien du cuivre au degré d'oxydation I. En milieu acide, la complexation n'a pas lieu mais  $\text{Fe}^{\text{III}}$  est assez réactif pour oxyder les polyphénols sans consommation de  $\text{O}_2$ . L'activité antioxydante des polyphénols a également été étudiée par leur capacité à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique initiée par  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$ .

La seconde partie porte sur l'extraction à l'eau des polyphénols du thé vert sous irradiation micro-ondes en comparaison avec un chauffage conventionnel. Après optimisation de la température et de la durée d'extraction, le procédé sous micro-ondes s'est révélé plus efficace que le procédé conventionnel, en particulier pour l'extraction des flavanols et des acides hydroxycinnamiques.

**Mots-clés:** polyphénols, fer, cuivre, complexation, oxydation, activité antioxydante, thé vert, extraction, micro-onde.

**Abstract.** Polyphenols are plant secondary metabolites which are abundant in the diet. Their extraction from plants using mild and efficient processes and a better understanding of the mechanisms of their oxidation and antioxidant activity are important scientific goals, which underline this work. In a first part, the reactivity of some polyphenols, both common and representative of the main classes (quercetin, rutin, caffeic acid, gallic acid, catechin), with transition metal ions of biological interest ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) was studied by UV-visible spectroscopy (kinetic studies), HPLC-MS (analysis of oxidation products) and via colorimetric tests for the determination of the redox state of the metal ions and the possible production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In neutral medium (phosphate buffer), the binding is generally fast and leads to relatively stable complexes with iron ions (despite the fast autoxidation of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  into  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ). By contrast, copper complexes (in particular  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -complexes) are able to rapidly activate  $\text{O}_2$  with  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation and oxidation of the polyphenol ligand, the copper ions being maintained at the redox state I. In acidic conditions, metal-polyphenol binding does not take place but  $\text{Fe}^{\text{III}}$  is reactive enough to oxidize the polyphenols without  $\text{O}_2$  consumption. The antioxidant activity of the selected polyphenols was also studied by their capacity to inhibit the peroxidation of linoleic acid induced by  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$ .

The second part deals with the water extraction of green tea polyphenols under microwave irradiation in comparison with conventional heating. After optimization of temperature and extraction time, the microwave-assisted process came up as more efficient than the conventional process, particularly for the extraction of flavanols and hydroxycinnamic acids.

**Keywords:** polyphenols, iron, copper, complexation, oxidation, antioxidant activity, green tea, extraction, microwave.