

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Thèse de Doctorat

Présentée à l'Université de Guelma

Faculté des mathématiques et de l'informatique et des sciences de la matière

Département des Sciences de la matière

Spécialité: Chimie

Par: Benayahoum Ali

Analyse quantitative par Chromatographie Liquide à Haute Performance de molécules à intérêt thérapeutique dans les aliments et étude de leur relation structure/activité antioxydante

Devant la commission d'examen:

M. Abdaoui	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Président
H. Amira-Guebailia	MCA. Université 8 mai 1945, Guelma	Rapporteur
R. Oumeddour	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Examineur
S. Akkal	Prof. Université de Constantine	Examineur
N. Gherraf	Prof. Université de Oum Elbouaghi	Examineur
M. Benahmed	MCA. Université de Tébessa	Examineur

Année universitaire 2013 - 2014

Dédicaces

Cette thèse est dédiée à:

Mes parents

Ma grand-mère

Ma femme et mes enfants

Mes frères et sœurs

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience pour accomplir ce travail et qui m'a entouré de personnes formidables qui ont, chacune à sa façon, et ce, à différentes étapes de mon parcours, contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de cette thèse de doctorat.

Même si dans mon cas, cette liste peut sembler plus longue que de coutume, c'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, Docteur **Mme Amira-Guebailia Habiba**, Maitre de conférences à l'Université de Guelma, qui malgré ses nombreuses occupations, a accepté de prendre la direction de ma thèse en cours de route, transformant ainsi les difficultés rencontrées en une expérience enrichissante. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de ces années, tout en me donnant la possibilité de trouver par moi-même mon cheminement personnel. J'aimerais lui témoigner de ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité, ses qualités pédagogiques et scientifiques. J'ai particulièrement apprécié sa très grande compréhension face à mes circonstances familiales et les sacrifices d'un père de famille pour s'investir le mieux dans ses recherches et sa thèse de doctorat. Je la remercie aussi pour la confiance qu'elle a su garder en mes capacités à mener ce projet à terme. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement le directeur du laboratoire de Chimie Appliquée (LCA) dont je suis membre, le professeur **Abdaoui Mohamed** qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury de thèse. Je le remercie également pour ses encouragements, ses conseils judicieux et pour les facilités accordées pour la réalisation de ce travail.

Je voudrais réserver de grands mercis aux rapporteurs de cette thèse: Mr **Rabah Oumeddour**, professeur à l'université de Guelma, Mr **Salah Akkal**, professeur à l'université Mentouri de Constantine, Mr **Noureddine Gherraf**, professeur à l'université d'Oum el bouaghi, et Mr **Merzoug Benahmed**, Maitre de conférences à l'université de Tébessa, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier Mr **Houache Omar**, pour son aide dans la finalisation des articles.

Un grand remerciement au département de biologie pour nous avoir fourni le cholestérol pur utilisé dans cette thèse.

Je tiens à remercier **Dr. Rouaiguia-Bouakaz Samia** membre de l'équipe 'substances naturelles et applications' du laboratoire LCA pour ces vifs encouragements, pour ces conseils ainsi que pour l'aide à la correction du manuscrit.

Chère Hadja, ce sont des milliers de remerciements que je vous envoie à travers cette feuille. J'ai été très touché par votre attention et encouragement, cela m'a fait chaud au cœur.

Un merci spécial est adressé à mes parents pour leur encouragement tout au long de ces années.

Tente Leila, je n'oublierai jamais votre soutien au cours de ces années chargées de travail et de responsabilités, sans toi je ne sais pas comment les choses se seraient passées.

C'est également le moment opportun pour exprimer ma gratitude à ma sœur Meriem. Ma sœur, merci pour tous ce que tu as fait pour moi.

Ma femme, je ne trouve pas les mots suffisants pour te remercier, je n'oublierai jamais tes sacrifices et les responsabilités que tu as prises à cause de mon affairement entre l'usine et l'université. Je n'oublierai jamais que vous m'avez aidé à préparer tous les échantillons de raisin.

Finalement mes remerciements vont à toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées mais à qui je témoigne toute mon affection.

نظرا لما تمثله المركبات الفينولية وخاصة الستيلبينات منها من وظائف بيولوجية ووقائية, قمنا بإنجاز تحليل كمي لمركبات ستيلبينية في أنواع مختلفة من عنب الطاولة المحلية الجزائرية بواسطة تقنية الكرماتوغرافيا في الوسط السائل الأشعة فوق البنفسجية. طريقة الإستخلاص ونوعية المحاليل المستعملة هذا الحرارة, زمن الإستخلاص ونوعية المحاليل المستعملة هذا .

ترانس رازفيراترول و ترانس بيسيدي هما , الترانس ايبسيلون فينابيرين, قشرة العنب في هذا .

الترانس رازفيراترول المركب الأكثر أهمية و , الذي مازال يعد بالكثير الجانب الصيدلاني كان حاضرا في جميع أنواع العنب المدروسة. نتائج البحث أظهرت أن أنواع العنب السوداء تحتوي علي كميات ستيلبينية أكثر من النوعية البيضاء. هذه النتيجة تم تفسيرها و لأول مرة لكيماة الكمية التي عن علاقة جديدة بين التركيبة الفينولية (ستيلبينات- انتوسيان) و الوظيفة البيولوجية ضد التأكسدية.

كمية ستيلبينات أكبر منها في 4 تحتوي أيضا على كميات كبيرة من الانثوسيانين ه ه الأخيرة يتم استهلاكها من قبل في عملية رية. وبالتالي يتم حفظ الستيلبينات في الأصناف السوداء.

أجريت دراسة كمية الكوليسترول في البيض حليب البقر. الكوليسترول في البيض يختلف الفصيلة، والعمر، ونوعية إ طعام صفار البيض لم يلاحظ أي بين البيض النئى يعتقد معظم الجزائريين بيض الدجاج الأصلي يحتوي على كمية كولسترول أقل من بيض هذه الدراسة تبين من ناحية أخرى المادة الدهنية في حليب البقر. وأظهرت النتائج أن عملية التخمير التقليدية الكوليسترول بنسبة 20 .

إن تزايد الاهتمام الآثار البيولوجية للستيلبينات ا بين الصيغة الكيميائية الوظيفة المضادة للأكسدة لهذه المركبات ونظيراتها طريقة DFT. الآليات SET-PT, HAT, SPLET درست في الحالة الغازية, المائية وفي البنزين من أجل دراسة الوظيفة ضد التأكسدية للترانس رازفيراترول نظائره الفينونترينية.

أظهرت النتائج أن الوضعية 4' هي المفضلة لتنشيط نشاط الحرة في جميع المجالات التي شملتها الدراسة. وجدنا أيضا أن 2 هيدروكسي ستيلبين يمثل خاصية دوائية جديدة في عائلة الستيلبينات.

إن إدخال رابطة تساندية بسيطة بين الحلقتين A B للرسفيراترول تنتج لنا خاصية دوائية جديدة في الوضعية 4 مما يدل أهمية فينانثرين.

أستطالة الرابطة الثنائية C=7C8 يمثل استراتيجية هامة لتحسين للرسفيراترول و نظرائه.

التجريبية تم تفسيرها بطريقة مرضية المحصل عليها. الآلية HAT هي الآلية هيمنة الترموديناميكيا في المذيبات القطبية أما TES-PT البنزين. آلية SPLET هو المسار فيعتبر الآلية الغير مفضلة في جميع الأوساط المدروسة.

الكلمات الرئيسية:

الإيثيلين الستيليني,

فينانثرين

ستيلينات, الكولسترول، البيض، الحليب، النشاط

DFT, HPLC-UV-VIS.

Résumé

Vu l'importance thérapeutique et préventive des polyphénols notamment les stilbènes, une analyse quantitative de ces molécules a été effectuée dans diverses variétés de raisin de table algérien au moyen d'une technique HPLC couplée à un détecteur UV visible. La méthode d'extraction a été optimisée en étudiant l'effet de la température, la composition du solvant et le temps de contact. Le *trans* resvératrol et le *trans* picéide ont été dosés pour la première fois dans le raisin algérien, la *trans* -viniférine a été détectée et quantifiée pour la première fois dans la pellicule du raisin. Le RSV était présent dans toutes les variétés. En revanche, les variétés noires ont montré un taux stilbénique plus élevé que les variétés blanches. Ceci a été expliqué pour la première fois par la chimie computationnelle qui nous a permis de trouver une corrélation entre la composition polyphénolique (stilbènes/anthocyanes) et l'activité antioxydante. En effet, nous stipulons que si le taux de stilbènes est plus élevé dans les variétés noires, qui contiennent également des quantités importantes d'anthocyanes, c'est parce que ces derniers sont consommés par les radicaux libres dans le processus de piégeage des radicaux, donc les stilbènes sont économisés.

Une étude quantitative a été menée pour étudier la teneur du cholestérol dans les œufs et le lait de vache. Le taux du cholestérol dans les œufs varie selon l'espèce, la race, l'âge, l'alimentation de la poule et le poids du jaune d'œuf. Aucune différence significative n'a été observée entre les œufs crus et bouillies. La plupart des Algériens croient que les œufs des poules autochtones contiennent un taux plus faible en cholestérol que celle des poules de cages ; cette étude montre le contraire. D'autre part, la teneur du cholestérol dans le lait de vache a été étudiée. Les résultats ont montré que la fermentation traditionnelle a un effet réducteur sur le cholestérol (jusqu'à 20%).

L'intérêt grandissant des effets biologiques des stilbènes, nous a conduits à explorer divers aspects de la relation structure-activité antioxydante de ces molécules et de leurs analogues, en utilisant la méthode DFT.

Les mécanismes HAT, SET-PT et SPLET ont été étudiés en phase gazeuse, aqueuse et dans le benzène pour l'évaluation de l'activité antioxydante du RSV et ces analogues phénanthréniques. Les résultats ont montré que la position 4'-OH dans le RSV est le site favorisé pour les coupures homolytiques et hétérolytiques dans tous les milieux étudiés.

Nous avons aussi trouvé que le 2-Hydroxy stilbène est un nouveau pharmacophore dans la famille des stilbènes.

L'introduction de la liaison simple entre les deux noyaux A et B du RSV, crée un nouveau pharmacophore sur la position 4-OH (3-OH du RSV), suggérant l'importance de la construction d'un anneau phénanthrène. En outre, l'élongation de la liaison oléfinique (C7=C8) est une stratégie importante pour améliorer l'activité antioxydante du RSV et ces analogues.

Les observations expérimentales sont expliquées d'une manière satisfaisante par les résultats obtenus. Nous avons aussi montré que le mécanisme HAT est le processus dominant en phase gazeuse et dans le benzène à la fois. En revanche, le mécanisme SPLET représente la voie réactionnelle la plus probable thermodynamiquement dans les solvants polaires. Le mécanisme SET-PT n'est pas le mécanisme préféré dans tous les milieux étudiés.

Mots clés: stilbènes, raisin, cholestérol, œufs, lait, activité antioxydante, phénanthrène, élongation du pont éthylène, DFT, HPLC-UV-VIS

Abstract

Given the importance of preventive and therapeutic role of polyphenols including stilbenes, a quantitative analysis of these molecules was performed in different varieties of grapes using an HPLC method with a UV- visible detection. The extraction method was optimized by taking into account the effect of temperature, solvent composition and contact time. The *trans* resveratrol and *trans* piceid were assayed here, for the first time in algerian grape, however, *trans* - viniferin was detected and quantified for the first time, in grapes skin. RSV was present in all varieties. Black grapes varieties showed a higher level of stilbenes than white varieties. This was explained for the first time by computational chemistry which allowed us to find a correlation between polyphenolic composition (stilbene / anthocyanins) and antioxidant activity. Indeed, we stipulate that if the stilbenes' levels are higher in black varieties, known also to contain substantial amounts of anthocyanins, it is because the later are consumed by scavenging free radicals in the radical scavenging process, and hence stilbenes are economized.

A quantitative study was conducted to investigate the content of cholesterol in the eggs and cow's milk. The cholesterol level in eggs varies according to species, breed, age, feeding of chickens and the weight of the egg yolk. No significant difference was observed between raw and boiled eggs. Most Algerians believe that autochthonous chicken eggs contain lower cholesterol than cages chicken; this study shows the opposite. On the other hand, the content of cholesterol in cow milk was studied. The results showed that the traditional fermentation has a lowering effect on cholesterol up to 20%.

The growing interest in the biological effects of stilbenes, has led us to explore various aspects of the structure- antioxidant activity of these molecules and their analogs, using the DFT method.

HAT , SET -PT and SPLET mechanisms have been studied in the gas, aqueous and benzene phases for the evaluation of the antioxidant activity of RSV and its phenanthrene-like analogs. The results showed that the 4'- OH position in the RSV is the most favored site for homolytic and heterolytic cleavage in all media studied.

We also found that the 2-Hydroxy stilbene is a new pharmacophore in the stilbenes' family.

The introduction of a single bond between the two rings A and B of RSV, creates a new pharmacophore on the 4-OH position (3 -OH RSV), suggesting the importance of building a

phenanthrene ring. In addition, the elongation of the olefinic bond (C7 = C8) is an important strategy to improve the antioxidant activity of RSV and its analogs. The experimental observations are satisfactorily explained by computational results obtained. We have also shown that the HAT mechanism is dominant in the gas phase and in benzene. However, the SPLET is the most thermodynamically probable reaction mechanism in polar solvents. SET- PT mechanism is not preferred in all environments studied.

Keywords: stilbenes, grapes, cholesterol, eggs, milk, antioxidant activity, phenanthrene, elongation of the ethylene bridge, DFT, HPLC -UV -VIS

Liste des figures

Figure (I. 1): Structure générale des stilbènes.....	09
Figure (I. 2): Quelques plantes contenant le resvératrol.....	10
Figure (I. 3): -viniférine (trimère du resvératrol).....	12
Figure (I. 4): Vaticanol C, tétramère du resvératrol (<i>Vatica indica</i>).....	13
Figure (I. 5): Heyneanol A, tétramère de resvératrol (<i>Vitis heyneana</i>).....	14
Figure (I. 6): Quelques variétés de raisin.....	16
Figure (I. 7): Le <i>trans</i> et le <i>cis</i> resvératrol.....	19
Figure (I. 8): Structure et numérotation des atomes du cholestérol.....	23
Figure (I. 9): Schéma simplifié de la circulation du cholestérol dans l'organisme.....	24
Figure (I. 10): Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR.....	26
Figure (I. 11): Les trois étapes de la peroxydation lipidique.....	28
Figure (I. 12): Régulation de la production des EOR	30
Figure (II. 1): Schéma de principe d'une chaîne HPLC.....	37
Figure (II. 2): Extraction par solvants des pellicules de raisin.....	40
Figure (II. 3): Extraction avec variation de la température.....	41
Figure (II. 4): Extraction à différents intervalles de temps.....	42
Figure (II. 5): protocole d'extraction du cholestérol du jaune d'œuf.....	44
Figure (IV. 1): Courbe étalon du RSV	61
Figure (IV. 2): Chromatogramme HPLC du RSV	61
Figure (IV. 3): Courbe étalon du picéide.....	62
Figure (IV. 4): Chromatogramme HPLC du <i>trans</i> picéide.....	63
Figure (IV. 5): Courbe étalon de la <i>trans</i> -viniférine.....	64
Figure (IV. 6): Chromatogramme HPLC de la <i>trans</i> -viniférine.....	64
Figure (IV. 7): Chromatogramme HPLC du Cardinal.....	65
Figure (IV. 8): Chromatogramme HPLC du Sabel.....	66

Figure (IV. 9): Chromatogramme HPLC du Dattier.....	66
Figure (IV. 10): Chromatogramme HPLC du Gros.	67
Figure (IV. 11): Chromatogramme HPLC du Muscat.....	67
Figure (IV. 12): L'effet de la durée de la saponification sur le rendement de l'extraction...	73
Figure (IV. 13): Chromatogramme du cholestérol pure	74
Figure (IV. 14): Chromatogramme du jaune d'œuf	75
Figure (IV. 15): Chromatogramme du lait de vache.....	79
Figure (IV. 16): Chromatogramme du lait de vache fermenté.....	79
Figure (IV. 17): Structures moléculaires du <i>trans</i> -resvératrol et ces analogues.....	82
Figure (IV. 18): Structures chimiques du resvératrol et ses analogues optimisées	83
Figure (IV. 19): Distributions des orbitales HOMO et LUMO des composés étudiés	87
Figure (IV. 20): Structures optimisées des formes semi-quinone des radicaux étudiés avec la méthode B3LYP/6-31**.....	90
Figure (IV. 21): Mécanisme d'inhibition de la peroxydation par l'antioxydant 3,4-DHS.....	92
Figure (IV. 22): Mécanisme d'inhibition de la peroxydation avec l'antioxydant 4,4'-DHS.....	92
Figure (IV. 23): Les structures 3,4 ortho-quinone et 4,4'para-quinone des composés 3,4-DHS et 4,4'-DHS.....	93
Figure (IV. 24): Mécanisme de formation des formes semi-quinone et quinone du composé 3, 4 DHS.....	94
Figure(IV. 25): La densité de Spin des radicaux formés	96
Figure (IV. 26): La distribution de la densité de spin dans les radicaux formés.....	98
Figure (IV. 27): Les structures de résonance du composé 2,4-DHS après le départ d'un atome d'hydrogène.....	99
Figure (IV.28): Structures moléculaires du RSV et ces analogues phénanthréniques.....	101
Figure (IV. 29): Structures chimiques optimisées avec la méthode B3LYP/6-311G (d, p) du RSV et ses analogues phénanthréniques.....	102

Figure (IV. 30): Distributions des orbitales HOMO et LUMO des composés étudiés.....	104
Figure (IV. 31): Les formes quinone des composés C et D.....	107
Figure (IV. 32): Distribution de la densité de spin dans les antioxydants étudiés.....	109
Figure (IV. 33): Structures moléculaires du RSV et ces analogues.....	115
Figure (IV. 34): Structures chimiques optimisées avec la méthode B3LYP/6-31G** du RSV et ses analogues.....	116
Figure (IV.35): Distributions des orbitales HOMO des composés étudiés.....	118
Figure (IV.36): Formation de la forme quinone après l'arrachement de deux atomes d'hydrogènes.....	121
Figure (IV. 37): La distribution de la densité de spin dans les radicaux formés	123

Liste des tableaux

Tableau (I.1): Teneur moyenne en polyphénols des différentes parties du raisin (en mg/kg).....	18
Tableau (I.2): Les principales affections liées à la production des EOR.....	29
Tableau (II.1): Gradient HPLC analytique.....	43
Tableau (IV.1): Données HPLC analytique pour le trans resvératrol.....	60
Tableau (IV.2): Données HPLC analytique pour le trans picéide.....	62
Tableau (IV.3): Données HPLC analytique de la trans - viniférine.....	63
Tableau (IV.4): Concentration des stilbènes par variété étudiée.....	68
Tableau (IV.5): Les valeurs BDE du RSV, picéide et les anthocyanes.....	70
Tableau (IV.6): Les valeurs BDE de la -Viniferin.....	71
Tableau (IV.7): La teneur en cholestérol du jaune d'œuf du poulet, dinde, oie et caille.....	76
Tableau (IV.8): Comparaison des teneurs en cholestérol (mg / g).....	77
Tableau (IV.9): La teneur en cholestérol dans les œufs bouillis et crus.....	78
Tableau (IV.10): La concentration en cholestérol dans le lait.....	80
Tableau (IV.11): La concentration en cholestérol dans le lait de vache fermenté.....	81
Tableau (IV.12): Valeurs optimisées par la B3LYP/6-31G ** des angles de dièdre [°] et [°] et des longueurs des liaisons hydroxyles (Å) des antioxydants étudiés.....	84
Tableau (IV.13): Valeurs optimisées par la B3LYP/6-31G ** des liaisons [Å] C-O, C-C et C=C dans le 3, 4 DHS en phase gazeuse.....	85
Tableau (IV.14): Propriétés théoriques du <i>trans</i> -resvératrol et ses dérivées.....	88
Tableau (IV.15): Densité de spin sur l'atome d'oxygène dans le radicaux phénoxyles du <i>trans</i> resvératrol et ces analogues.....	97
Tableau (IV.16): Les valeurs des BDEs [kcal/ mol] obtenues	106
Tableau (IV.17): La densité de spin sur l'atome d'oxygène atomes dans les radicaux du RSV et ces analogues phénanthrènes.....	108

Tableau (IV.19): Les valeurs des PDE et AIP [kcal/ mol] obtenues par le niveau B3LYP/6-311G (d,p).....	110
Tableau (IV.20): Les valeurs des PDE du phénol obtenues en phase gazeuse et en eau.....	111
Tableau (IV.21): Les valeurs des PA et ETE [kcal/ mol] obtenues par le niveau B3LYP/6-311G (d, p).....	113
Tableau (IV.22): Les valeurs des BDE [kcal/ mol] obtenus par le niveau the B3LYP/6-31**.....	120
Tableau (IV.23): Les valeurs de la densité de spin sur l'atome d'oxygène dans les radicaux phénoxy du RSV et ces analogues.....	122
Tableau (IV.24): Les valeurs des PDE et AIP [kcal/ mol] obtenues par le niveau B3LYP/6-31G**.....	125
Tableau (IV.25): Les valeurs des PA et ETE [kcal/ mol] obtenues par le niveau B3LYP/6-31G**.....	127

Abréviation

2,4-DHS : 2,4-dihydroxy-stilbéne

2,4,4'-THS : 2,4,4'-trihydroxy-stilbéne

3,3'-DM4,4'-DHS : 3,3'-diméthoxy 4,4-dihydroxy-stilbéne

3,4-DHS : 3,4-dihydroxy-stilbéne

3,5-DHS : 3,5-dihydroxy-stilbéne

4-HS : 4-hydroxy-stilbéne

4,4'-DHS : 4,4'-dihydroxy-stilbéne

λ_{max} : Maximum d'absorption dans l'UV/Vis

AGPI : acide gras polyinsaturé

AIP : Potentiel d'ionisation adiabatique

ArO[•] : radical phénolique

ArOH: composés phénoliques

ArOH^{•+}: radical cationique

B3LYP : Becke style 3 Paramètre de Densité de Théorie de la Fonctionnelle au 2^{ème} dérivés (en utilisant Lee-Yang-Parr corrélation fonctionnelle)

BDE-OH : enthalpie de dissociation homolytique de la liaison O-H

DPPH : 1-1 Diphényl 2- Picril Hydrazine

EOR : Espèces oxygénées réactives

Et al : Et autre auteurs

ETE : enthalpie de transfert d'électron

HAT : transfert d'atome d'hydrogène

HDL : lipoprotéines de haute densité qui ont pour nom les high density lipoprotein

HF : Hartree-Fock

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital

in vitro : tests en dehors de l'organisme vivant ou de la cellule.

in vivo : des examens pratiqués sur un organisme vivant

LDL : lipoprotéines de petite densité qui ont pour nom les low density lipoprotein

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MDA : malondialdehyde

MeOH : Méthanol

Min : Minute

ORAC : capacité d'absorption des radicaux oxygénés

PA : affinité du proton

PDE : Enthalpie de dissociation du proton

PPM : partie par million

r_{A-B} : Distance entre atome A et atome B

RSV : le *trans* resvératrol

STL-O[•]: radical stilbénique

STL-OH: stilbène

Tr : Temps de rétention

UV : Ultraviolet

Table de matière

Introduction générale	01
Chapitre I : Métabolite secondaire, stress oxydant et activité antioxydante	
I. Métabolite secondaire.....	06
I.1.1. Les stilbènes, occurrence, sources et effets biologiques.....	07
I.1.1.1. Définition.....	07
I.1.1.2 Occurrence.....	08
I.1.2. Le resvératrol.....	08
I.1.3. Activités biologiques du resvératrol.....	09
I.1.3.1. Activités anti-oxydantes.....	09
I.1.3.2. Le domaine cardiovasculaire.....	10
I.1.3.3. L'activité anticancéreuse.....	10
I.1.3.4. L'activité anti-inflammatoire.....	10
I.1.3.5. L'activité neuroprotectrice	10
I.1.4. Activités biologiques des oligomères du resvératrol.....	11
I.1.5. Effets potentiels de la consommation de raisins	13
I.1.6. Le raisin	14
I.1.7. Composition et valeur nutritive	16
I.1.8. Diverses variétés de raisin.....	16
I.1.9. Les polyphénols et le raisin	16
I.1.10. Teneurs de raisins en polyphénols.....	17
I.1.11. Etude physico-chimique sur le resveratrol.....	17
I.1.12. Analyses chimiques du resveratrol.....	19
I.1.13. Dosage des stilbènes dans le raisin et les jus.....	19
I.1.14. Dosage des stilbènes dans d'autres plantes et nutriments.....	20
I.2. Le cholestérol.....	21
I.2.1. Structure.....	22
I.2.2. Sources de cholestérol.....	22
I.2.3. Hypercholestérolémie et athérosclérose.....	23
I.3. Stress oxydant et activité antioxydante.....	24
I.3.1. Stress oxydant et radicaux libres	24
I.3.2. Action sur les lipides.....	25
a) L'initiation.....	26

b) La propagation.....	26
c) La termination.....	26
I.1.3.3. Les protéines.....	27
I.1.3.4. Les acides nucléiques.....	28
I.1.3.5. Implications pathologiques des EOR.....	28
I.1.3.6. Systèmes de défenses antioxydants.....	29
I.3.7. Activité antioxydante.....	30
I.3.8. Mécanismes de piégeage des radicaux libres.....	30
a) Mécanisme HAT.....	30
b) Mécanisme (SET-PA).....	31
Potentiel d'ionisation adiabatique (AIP).....	31
Enthalpie de dissociation de proton (PDE).....	32
c) Mécanisme SPLET.....	32
Affinité du proton (PA).....	32
Mécanisme (ETE).....	32
I.3.9. Stilbènes et activité antioxydante.....	32

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Première partie : Analyse quantitative de stilbènes dans les raisins.....	35
II.1 Solvants.....	35
II.2 Appareillage.....	35
II.3 Broyage et macération.....	37
II.3.1 Optimisation de l'extraction des stilbènes.....	37
a) L'effet du solvant.....	37
b) L'effet de la température.....	38
c) L'effet du temps de macération.....	40
II.4 Analyse par RP-HPLC des stilbènes.....	41
a) Solvants utilisés.....	41
b) Injection.....	41
c) Gradient.....	41
Deuxième partie : Analyse quantitative du cholestérol dans les aliments.....	42
II.5 Collection des œufs.....	42
II.6. Préparation des échantillons.....	43
II.7. Collection de lait de vache.....	43
II.8. Préparation des échantillons.....	43

II.9 Analyse par NP-HPLC du cholestérol.....	43
Chapitre III : Méthodes de calculs	
III.1. Formulation générale.....	44
III.1.1. L'approximation de Born-Oppenheimer.....	44
III.1.2. Approximation orbitalaire.....	46
III.1.3. Méthode Hartree-Fock.....	48
III.1.4. Equation de Hartree-Fock.....	50
III.1.5. L'approximation CLOA.....	51
III.1.6. La théorie de la fonctionnelle de la densité.....	52
III.1.7. Premier théorème de Hohenberg et Kohn.....	52
III.1.8. Second théorème de Hohenberg et Kohn.....	52
III.2. Les fonctionnelles utilisées.....	54
III.3. Choix d'une fonctionnelle.....	54
Chapitre IV : Résultats et discussion	
IV.1 Dosage des stilbènes dans la pellicule du raisin.....	59
IV.1.1. Stilbènes dosés dans les pellicules de raisin.....	59
a) <i>Trans</i> resvératrol.....	59
b) <i>Trans</i> picéide (polydatin).....	59
c) <i>Trans</i> –viniférine.....	59
IV.1.4. Données chromatographiques des standards.....	60
IV.1.4.1. Courbes étalons, temps de rétention et maximum d'absorption.....	60
a) <i>Trans</i> resvératrol.....	60
b) <i>Trans</i> picéide.....	62
c) <i>Trans</i> –viniférine.....	63
IV.1.5 Concentration des stilbènes dans les diverses variétés du raisin Algérien.....	65
IV.1.6 Discussion.....	68
IV.1.4.1 Teneurs des stilbènes.....	68
IV.1.4.2 Effet de l'ajout du TFA sur la rétention des composés.....	69
IV.1.4.3 Cause de la différence dans les teneurs des stilbènes entre les variétés noires et blanches.....	69
IV.2 Dosage du cholestérol dans le jaune d'œuf et le lait de vache.....	72
IV.2.1. Saponification et extraction.....	72
IV.2.2. L'effet du temps sur la saponification.....	72
IV.2.3. Validation de la méthode.....	75

IV.2.4. La teneur en cholestérol.....	75
IV.2.5. Dosage du cholestérol dans le lait de vache.....	78
IV.3. Etude par DFT de la relation quantitative structure activité antioxydante.....	82
IV.3.1. Effet du nombre et de la position des groupes hydroxyles du resvératrol et ses analogues sur l'activité antioxydante.....	82
IV.3.1.1. Propriétés structurales et énergétiques.....	83
a) HOMO et LUMO.....	85
b) Potentiel d'Ionisation Adiabatique (AIP).....	89
c) Enthalpie de dissociation de liaison (BDE).....	89
d) La densité de spin.....	95
IV.3.2. l'effet du blocage de la rotation du pont éthylène du resvératrol sur L'activité antioxydante.....	100
IV.3.2.1 Propriétés structurales et énergétiques.....	101
a) HOMO et LUMO.....	103
b) Enthalpie de dissociation de liaison (BDE).....	105
c) La densité de spin.....	107
IV.3.2.2 Le mécanisme SET-PT.....	109
a) Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP).....	109
b) Enthalpies de dissociation du Proton (PDE).....	111
IV.3.2.3 Le mécanisme SPLET.....	112
a) L'affinité du proton.....	112
b) L'enthalpie de transfert d'électron (ETE).....	114
❖ Le mécanisme thermodynamiquement favorisé.....	114
IV.3.3. l'effet de l'élongation du pont oléfinique des dérivés du resvératrol sur l'activité antioxydante.....	115
IV.3.3.1 Propriétés structurales et énergétiques.....	116
a) HOMO et LUMO.....	117
b) Enthalpie de dissociation de liaison (BDE).....	119
c) La densité de spin.....	122
IV.3.3.2. Le mécanisme SET-PT.....	124
a) Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP).....	124
b) Enthalpies de dissociation du Proton (PDE).....	126
IV.3.3.3 Le mécanisme SPLET.....	126
a) L'affinité du proton.....	126

b) L'enthalpie de transfert d'électron (ETE).....	128
❖ Le mécanisme thermodynamiquement favorisé.....	128
V. Conclusions et perspectives.....	129
VI. Références.....	133
Annexes.....	147

Introduction générale

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 et le thé.

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 qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter la protection contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers. Cette protection serait due aux microconstituants des fruits et légumes dont les polyphénols sont les principaux représentants.

Pour échapper aux graves séquelles du stress oxydant, il y a nécessité de maintenir l'équilibre entre oxydants et antioxydants, afin de préserver les performances physiologiques optimales de l'organisme. Une consommation suffisante d'antioxydants s'impose. Les antioxydants alimentaires comprennent des vitamines (A, C et E), certains oligoéléments (sélénium, zinc), mais également des éléments bioactifs qui se trouvent naturellement dans les aliments issus du règne végétal appelés phytonutriments ou métabolites secondaires qui sont fortement impliqués en prophylaxie de plusieurs cancers et pathologies chroniques (Liu *et al.*, 2003 ; Prior *et al.*, 2003).

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.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un premier temps dans le cadre de l'étude de diverses variétés locales de raisin, pour leur teneur en stilbènes biologiquement actifs. En plus une étude cinétique de méthodes d'extraction est envisagée dans le but de choisir les conditions

optimales d'extraction de ces composés (solvants, température et temps de macération). Cinq variétés de raisin de table algériennes ont été sélectionnées en vue de déterminer leur taux en stilbènes au moyen d'une technique HPLC à polarité de phase inversée, couplée à un détecteur UV-visible.

D'un autre côté et dans le cadre d'élargir le spectre de comparaison entre les différentes teneurs en stilbènes, on a essayé dans un premier temps d'interpréter la différence en taux stilbénique entre les variétés noirs et les variétés blanches par la chimie quantique.

Par ailleurs, l'analyse quantitative du cholestérol dans les aliments est un enjeu très important qui a attiré l'attention de plusieurs chercheurs, laboratoires et organisations. Cette importance revient dans un premier temps au rôle du cholestérol plasmatique dans les maladies cardiovasculaires (Kannel *et al.*, 1971; Brown, 1990). La deuxième raison porte sur l'étiquetage confronté aux fraudes des produits alimentaires, qui est devenu obligatoire en raison des dispositions légales dans de nombreux pays. Notre recherche bibliographique nous a montré l'absence de données sur la teneur en cholestérol dans les aliments, en Algérie. L'investigation dans cet axe de recherche s'est avérée donc, nécessaire. Vu l'importance nutritive, la grande consommation et la teneur importante du cholestérol dans le jaune d'œuf et le lait de vache, une analyse quantitative a été menée afin de déterminer le taux du cholestérol dans le jaune d'œuf crus et bouillis de deux variétés de poules, de dinde, de canard et de caille ainsi que le lait de vache. Dans ce travail, l'effet de la fermentation traditionnelle du lait de vache sur la teneur en cholestérol a été étudié. L'influence de la durée de saponification sur l'efficacité d'extraction du cholestérol ainsi que l'optimisation de la méthode d'analyse ont aussi été pris en considération.

Des investigations théoriques et expérimentales ont stipulé que l'activité antioxydante du resvératrol est liée à la capacité des groupements hydroxyles à piéger les radicaux libres produits *in vivo* (Wang *et al.*, 1998, Fang *et al.*, 2002). Le caractère antioxydant de ce composé et ces dérivés hydroxylés a été étudié par Murias *et al.* (2004). Cette investigation repose sur l'étude du mécanisme réactionnel entre le *trans* resvératrol et les radicaux peroxydes.

En revanche, Wright *et al.* (2001) ont étudié l'activité antioxydante du resvératrol et d'autres dérivés stilbéniques avec la méthode LDBS (acronyme de locally dense basis sets) en phase gazeuse en investiguant les paramètres BDE (acronyme de bond dissociation enthalpy) et AIP. Les résultats ont montré que le mécanisme HAT (acronyme de hydrogen

atom transfer) est plus dominant dans le piégeage des radicaux libres que le mécanisme SET-PA (acronyme de single electron transfer followed by proton transfer)

Bien que ces calculs aient été effectués en phase gazeuse, ils apportent de précieuses informations sur l'activité antioxydante du *trans*-resvératrol. L'effet du solvant sur ces paramètres n'a pas été pris en considération bien que, dans la nature, la majorité de ces réactions se passent en phase aqueuse.

Récemment Mikulski *et al.* (2010) ont calculé les PDEs (acronyme de proton dissociation enthalpy) du RSV, les valeurs étaient de 322,582 et 281,161kcal/mol en phase gazeuse et dans l'eau, respectivement. D'autre part, Lu *et al.* (2013) ont trouvé 233,58 et 266,12 kcal/mol pour le même paramètre. Bien que ces auteurs aient utilisé la même méthode de calcul B3LYP/6-311G (d,p), les résultats obtenus montrent une grande variabilité et une contradiction très apparente. En plus, l'effet de l'hydratation sur l'enthalpie de déprotonation n'a pas été étudié.

Notre recherche bibliographique a montré en outre mis en évidence l'absence de travaux qui traitent les paramètres PA (acronyme de proton affinity), ETE (acronyme de electron transfer enthalpy) et le PDE pour le resvératrol ainsi que ses dérivés malgré leur implication dans la compréhension du processus antioxydant. C'est la raison pour laquelle, on s'est donné comme objectif dans la troisième partie de cette thèse, l'investigation de l'activité antioxydante de divers dérivés du resvératrol en utilisant une méthode qui a prouvé sa fiabilité dans ce domaine qui est la Théorie de la fonctionnelle de la Densité (DFT). Nous cherchons à déterminer les propriétés électroniques, énergétiques et structurales qui influent le potentiel antioxydant des stilbènes et de leurs dérivés et ceci en tenant compte de la solvation et de tous les mécanismes impliqués dans l'activité antioxydante, connus jusqu'à maintenant.

Dans un premier temps l'étude repose sur la recherche de nouveaux pharmacophores au sein du squelette stilbénique. Plus tard, les effets du nombre et de la position des groupements hydroxyles ainsi que la contribution des formes ortho et para-quinone sur l'activité antioxydante ont été étudiés. Par ailleurs, l'effet du blocage de la rotation ainsi que l'élongation du pont éthylénique du *trans*-resvératrol et de ses dérivés sur l'activité antioxydante ont été investigués.

Il faut noter aussi que dans la nature, l'eau est l'environnement physiologique où la plupart des réactions chimiques ont lieu. C'est pour cela qu'en plus des calculs en phase gazeuse, nous avons effectué les calculs en tenant compte de la solvation dans l'eau. En outre, il faut souligner que les membranes lipidiques de nature apolaire constituent un

environnement approprié aux antioxydants pour piéger les radicaux libres. C'est pour cette raison que nous avons également réalisé les calculs dans le benzène, en tant que milieu apolaire.

Nous avons aussi pris en considération les différents mécanismes de l'activité antioxydante et nous avons essayé d'évaluer lequel est le plus préférable dans les différents milieux investigués.

Cette thèse est présentée en quatre chapitres:

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui concerne la structure, l'occurrence et les propriétés chimiques et biologiques des stilbènes et du cholestérol, ainsi que les études botanique et phytochimique du raisin. Dans ce chapitre, nous présentons les molécules responsables de l'oxydation et celles qui permettent de la combattre.

Les techniques et matériels utilisés pour l'extraction et la quantification des métabolites étudiés sont présentés dans le deuxième chapitre. Alors que les méthodes de calculs utilisées pour la prédiction de l'activité antioxydante des molécules étudiées font l'objet du chapitre trois.

Le quatrième chapitre est consacré aux interprétations des résultats des analyses quantitatives, ainsi que les divers résultats de la modélisation de l'activité antioxydante du trans resvératrol et ses dérivés phénanthréniques et ceux obtenus par élongation du pont éthylène.

Finalement, nous clôturons cette thèse par une conclusion générale qui résumera les principaux résultats obtenus et les perspectives futures.

**Chapitre I : Métabolites
secondaires, stress oxydant
et activité antioxydante**

I.1. Métabolites secondaires

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Hartmann, 2007).

➤ Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes: les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

➤ Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (Li et al., 2007).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires (Epifano *et al.*, 2007).

On trouve les métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes, on distingue:

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins.

- Les alcaloïdes qui renferment un atome d'azote dans leur structure. Parmi ces derniers, certains relarguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées.

Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.

- Les mucilages: Ce sont des polymères complexes de fructose, d'acide glucorinique et d'acide manuronique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar agar).

- Les gommes et les résines: Ce sont des substances produites par la plante à la suite d'une blessure.

- Les huiles essentielles: Ce sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.

- Les latex: Ce sont des substances sécrétées ou fabriquées par des cellules laticifères (vraies ou anastomosées) et qui ont la particularité de se solidifier au contact de l'air.

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux composés phénoliques et aux stérols, dont nous présentons ci-dessous, quelques exemples.

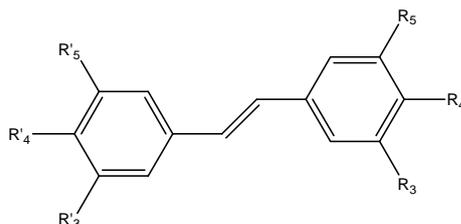
I.1.1 Les stilbènes, occurrence, sources et effets biologiques

I.1.1.1 Définition

Les stilbènes ou 1,2-diphényléthène (figure (I.1)), appartiennent à la classe des non- flavonoïdes de la famille des polyphénols, leur occurrence dans les plantes est associée à la résistance aux maladies fongiques comme le *Botrytis cinerea*, et aussi au stress abiotique comme l'irradiation UV. Généralement, les stilbènes sont considérés comme des phytoalexines, et leur formation dans les feuilles de la vigne a été reliée à la résistance contre les maladies (Langcake, 1981).

Les phytoalexines stilbéniques ont été extensivement étudiées dans la famille des vitacées par Langcake et Pryce (Langcake *et al.*, 1977). Ces auteurs ont décrit le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène), le ptérostilbène (3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbène) et leur forme dimérique, la viniférine.

Ce type de molécules se retrouve aussi bien dans la classe des spermatophytes que dans celles des bryophytes ou des ptéridophytes (Langcake *et al.*, 1977).



Nom	Source	R3	R4	R5	R'3	R'4	R'5
Pinosylvine	<i>Pinus strobus</i>	H	H	H	OH	OH	H
Picéatannol	<i>Picea abies</i>	OH	H	OH	OH	OH	H
<i>Trans</i> resvératrol	<i>Raisin, cacahuètes, Polygonum, Picea</i>	OH	H	OH	H	OH	H
<i>Trans</i> ptérostilbène	<i>Ptérocarpus, raisin</i>	OCH3	H	OCH3	H	OH	H
Rhapontine ou Ponticine	<i>Rhubarbe, Picea abies</i>	Gluc	H	OH	OH	OCH3	H
<i>Trans</i> picéide	<i>Raisin, rhubarbe, Picea, Polygonum</i>	Gluc	H	OH	H	OH	H
Astringine	<i>Picea abies</i>	Gluc	H	OH	OH	OH	H

Figure (I.1): Structure générale des stilbènes
(<http://fr.wikipedia.org/wiki/Stilb%C3%A8ne>) (2014).

I.1.1.2 Occurrence

Les stilbènes sont des phytoalexines trouvées dans au moins 72 espèces de plantes distribuées dans 31 genres et 12 familles (Jang *et al.*, 1997). Toutes les familles qui les contiennent appartiennent à la division des spermatophytes: Vitacées, Myrtacées, Dipterocarpacees, Cypéracées, Gnetacées, Légumineuses, Pinacées, Moracées, Fagacées et Liliacées (Yoshiaki *et al.*, 2002).

I.1.2 Le resvératrol

Le resvératrol, *trans*-3, 5,4'-trihydroxystilbène, a été isolé pour la première fois en 1940 à partir des racines de *Veratrum grandiflorum* O., puis des racines de *Polygonum cuspidatum*, (appelé Ko-jo-kon en Japonais), qui étaient utilisées en médecine traditionnelle par les japonais et les chinois, pour traiter les dermatites suppuratives (Takaoka, 1940 ; Cichewicz, 2002). En 1976, le resvératrol a été détecté

dans l'épiderme des feuilles et dans la pellicule du raisin mais pas dans la pulpe (Langcake *et al.*, 1976 ; Creasy, 1988). Le resvératrol a par la suite, été trouvé dans plusieurs plantes: baies, arachides, mûres, rhubarbe...

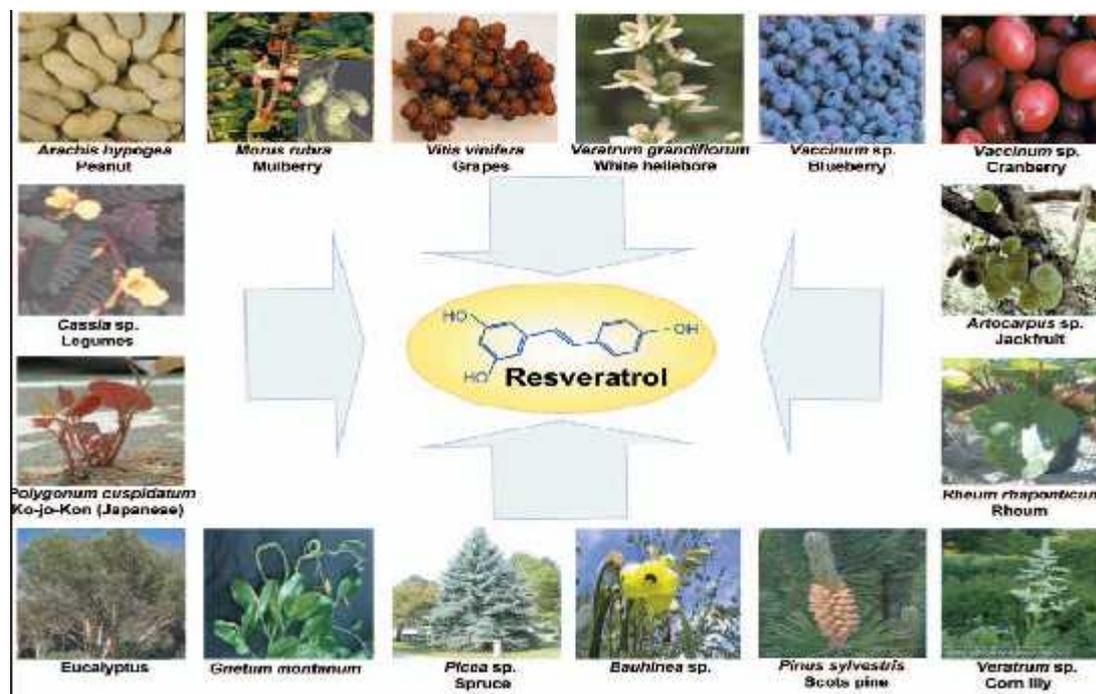


Figure (I.2): Quelques plantes contenant le resvératrol (ref : <http://www.china-resveratrol.org/En-Post/Sources-of-resveratrol.html>) (2013).

I.1.3. Activités biologiques du resvératrol

A ce jour, les principales activités biologiques du resvératrol répertoriées sont :

I.1.3.1. Activité antioxydante

De nombreuses pathologies, à savoir les maladies cardiovasculaires, les cancers, les processus inflammatoires ou encore les maladies neurologiques, sont associées au stress oxydant (Zhang, 1999). Les principales activités biologiques attribuées au resvératrol sont essentiellement dues à son activité antioxydante (Orallo, 2006). Cette capacité antioxydante peut être évaluée *in vitro* aussi bien par piégeage des radicaux libres que par chélation des métaux largement connus pour être impliqués dans les réactions radicalaires. Le resvératrol permet de piéger l'anion superoxyde qui est une espèce souvent à l'origine des dégâts oxydatifs. Aussi, il permet, à des concentrations micro-molaires, d'inhiber l'oxydation des vésicules lipidiques ou des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Holvoet, 2004).

I.1.3.2. Le domaine cardiovasculaire

Le resvératrol inhibe l'agrégation plaquettaire en inhibant la production de médiateur conduisant à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes lors de la formation d'un caillot dans les événements thrombotiques. De même, en inhibant l'oxydation lipidique, il réduit les dépôts de cholestérol dans les artères et diminue ainsi les accidents cardio-vasculaires (Holvoet, 2004).

I.1.3.3. L'activité anticancéreuse

C'est dans ce domaine que les travaux effectués ont été les plus nombreux. Ces études ont montré des effets antiprolifératifs du resvératrol sur des cellules tumorales en culture ainsi qu'une réduction de la taille et du nombre de tumeurs. L'action du resvératrol semble aller au-delà de son activité antioxydante. En effet, des études récentes ont révélé que l'effet du resvératrol pourrait s'expliquer par des actions au niveau de l'expression de différentes protéines médiatrices (facteurs de transcription, oxygénases, ...) (Jang, 1997). Le resvératrol présente donc, des propriétés anticancéreuses, grâce à sa capacité de supprimer la prolifération d'une grande variété de cellules tumorales, y compris les cancers lymphoïdes et myéloïdes; myélome multiple; cancers du sein, prostate, estomac, côlon, pancréas, et thyroïde; mélanome ; carcinome de cellules de tête et de cou; carcinome ovarien et carcinome cervical.

I.1.3.4. L'activité anti-inflammatoire

In vivo, le resvératrol est un inhibiteur efficace de la cyclooxygénase 2 (COX2) (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2005). Les cyclooxygénases sont des enzymes essentielles à la production de médiateurs pro-inflammatoires. Les inhibiteurs de ces enzymes sont donc des anti-inflammatoires potentiels. Tout phénomène inflammatoire se traduit par la production d'une multitude de composés, le monoxyde d'azote, des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF-alfa, l'interleukine-1(IL-1) ou encore des espèces oxygénées actives, aux effets dangereux pour l'organisme. Des études ont montré que le resvératrol permet de réduire, voire d'inhiber la production d'un certain nombre de ces molécules (Marier, 2005).

I.1.3.5. L'activité neuroprotectrice

Des études *in vivo* menées chez le rat ont montré que le resvératrol possède un effet neuroprotecteur.

Des rats prétraités au resvératrol, après induction d'une attaque cérébrale, présentaient des dommages neuronaux deux fois plus faibles que chez des rats non traités (Lu, 2006). Des travaux réalisés par Marambaud *et al.* (2005) ont révélé que le resvératrol permettait d'induire la dégradation du peptide beta amyloïde, constituant majeur de plaques séniles formées au cours de la maladie d'Alzheimer par un mécanisme impliquant le protéasome (système impliqué dans la dégradation des protéines dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson).

I.1.4. Activités biologiques des oligomères du resvératrol

Le *trans* resvératrol n'est pas le seul stilbène qui possède des activités biologiques importantes, mais ses analogues tels que le picéatannol, le ptérostilbène et le picéide ont aussi prouvé des effets thérapeutiques prononcés. Les oligomères du resvératrol tels que les dimères, comme l' α -viniférine (Privat *et al.*, 2002 ; Piver *et al.*, 2003) et les tétramères (Hopéaphénol, Heyneanol, vaticanol) (Feng *et al.*, 2013) ont aussi montré diverses activités biologiques parmi lesquelles, la cytotoxicité des cellules cancéreuses. Chung *et al.* (2003) ont examiné l'activité anti-inflammatoire de l' α -viniférine (trimère du resvératrol) et ont montré qu'elle possède des effets inhibiteurs de la COX -2 (IC50, 4.9 μ M) mais inhibe faiblement la COX-1 (figure (I. 3)).

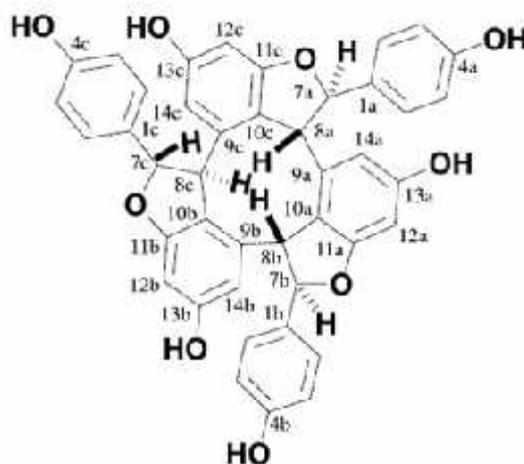


Figure (I.3): α -viniférine (trimère du resvératrol).

Huang *et al.* (2001) ont examiné l'activité anti-inflammatoire des tétramères du resvératrol. Parmi ceux-ci, le (+)-hopéaphénol, l'isohopéaphénol, la vitisin A, le (+)-vitisifuran A, et le heyneanol A ont causé l'inhibition de la biosynthèse du leukotriène B4, alors que les amurensins (tétramères du resvératrol de *Vitis Amurensis*) I et L ont fortement provoqué l'histamine accepteur.

Mishima *et al.* (2003) ont montré que le vaticanol C (figure (I.4)), un tétramère du resvératrol (isolé de *Vatica Indica*) possède une activité cytotoxique potentielle contre des lignées cellulaires diverses. Ces auteurs ont examiné l'activité anti-tumorale de l'extrait éthanolique des écorces de sarments de *Vateria indica*, plante médicinale utilisée par les indiens. Des analyses par HPLC ont montré que cet extrait contenait entre autres, l'hopéaphénol, le vaticanol C, et l' α -viniférine. Un essai *in vitro* de cet extrait éthanolique a montré une activité anticancéreuse contre les cellules tumorales (sarcome 180) de la souris (IC50, 29.5 μ M).

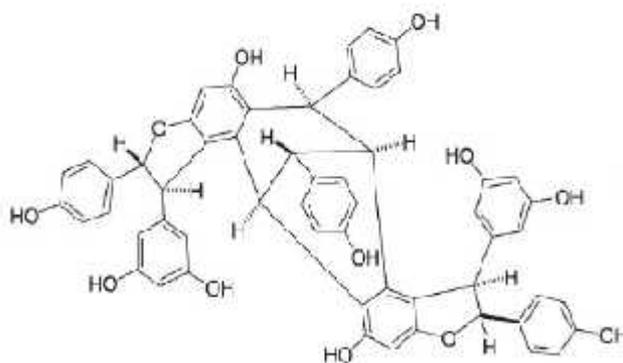


Figure (I.4): Vaticanol C, tétramère du resvératrol (*Vatica indica*).

Le heyneanol A a été isolé pour la première fois des racines de *Vitis Heyneana* en 1996 (Li *et al.*, 1996) et à partir des racines de *Vitis Amurensis* en 2001 (Huang, 2001), dans cette dernière référence, on a reporté l'activité anti-inflammatoire du heyneanol par inhibition potentielle de la biosynthèse de leukotriène B4.

Le heyneanol A (Figure (I.5)) a également montré une induction de l'apoptose des cellules leucémiques humaines (IC50 = 6.6 μ M, après 24 h) 15 fois plus efficacement que le resvératrol (IC50 = 100 μ M, après 24 h) (Lee *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2006), ces auteurs ont également étudié l'inhibition de la croissance tumorale d'un cancer de poumon par le heyneanol A.

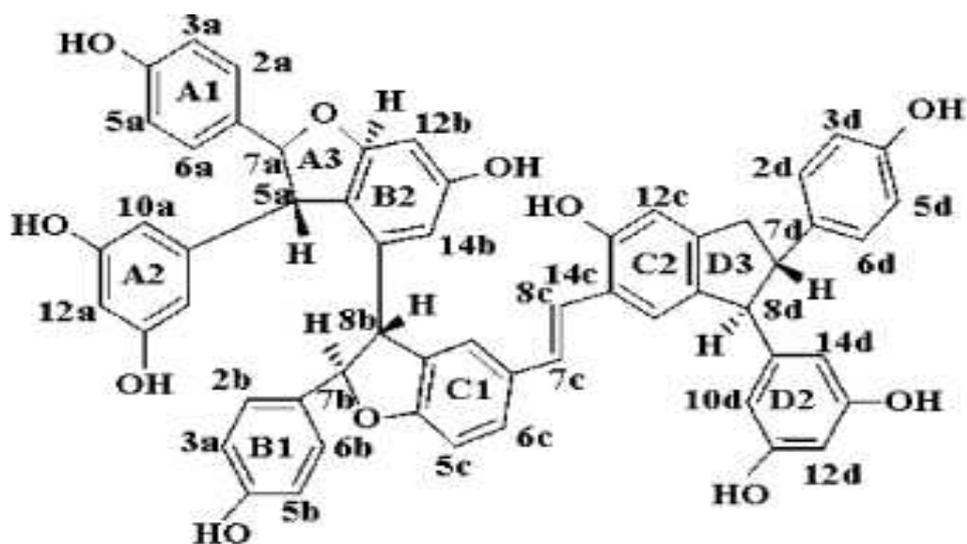


Figure (I.5): Heyneanol A, tétramère de resvératrol (*Vitis heyneana*).

Les travaux sur les activités biologiques des stilbenes continuent toujours et récemment, vingt dérivés stilbéniques extraits de produits naturels ont été testés contre l'agrégation du peptide A-beta (amyloïde B) par Rivière *et al.* (2009), les résultats ont montré que le *trans* resvératrol et le *trans* picéide inhibent l'agrégation du peptide -amyloïde de 63 % et 62% respectivement. La *trans* scirpusine A réduit l'agrégation de 80 %, la *trans* -viniférine glucoside de 93%, alors que la *trans* -viniférine n'a montré que 27% d'inhibition.

I.1.5. Effets potentiels de la consommation de raisins ou de produits dérivés sur la santé

Dans les travaux de Keevil *et al.* (2000), l'activité plaquettaire *ex vivo* a été comparée chez des volontaires humains avant et après avoir bu du jus de raisin noir, du jus d'orange ou du jus de pamplemousse pendant 7 à 10 jours pour chaque produit. Boire du jus de raisin rouge pendant une semaine a réduit de 77% l'agrégation plaquettaire sanguine tandis que la consommation de jus d'orange ou de jus de pamplemousse n'a eu aucun effet sur ce paramètre. Le jus de raisin rouge contenait approximativement 3 fois plus de polyphénols totaux que les jus d'agrumes et était un inhibiteur plaquettaire potentiel chez les sujets humains sains. L'effet inhibiteur plaquettaire du jus de raisin grâce aux polyphénols qu'il contient pourrait diminuer le risque de thrombose coronaire et d'infarctus du myocarde.

Parker *et al.* (2007) ont observé les effets de la consommation des raisins (frais, secs ou golden) de la variété Thompson sans pépins sur 15 sujets humains sains pendant 4 semaines. La capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC) a été significativement positive après 2 semaines de consommation de raisins (250g/jour) et 3 semaines pour les raisins secs ou golden (50 g/jour), de même l'oxydation du sérum (temps de latence) a été considérablement améliorée pour la consommation des raisins golden après 4 semaines.

Décorde *et al.* (2008) ont montré que les composés phénoliques du raisin rouge préviendraient le développement de l'athérosclérose précoce induite par une alimentation athérogène (qui produit l'athérome, plaques constituées de lipides se fixant sur la paroi interne des artères^a) chez le hamster syrien doré. Dans ces travaux, la consommation de raisins (variété muscat de Hambourg à une dose équivalente à 600 gr/jour, pour un homme de 70kg) ou de leur jus (dose équivalente à 500mL/jour, pour un homme de 70 kg) a permis de faire diminuer la surface des dépôts lipidiques de la crosse aortique de 78% et 93% respectivement par rapport aux animaux de contrôles. De même, la consommation de raisin et du jus de raisin diminuent le cholestérol total de 30,4% et 34,6%, respectivement. Cette activité hypolipidémiant est en parfait accord avec les travaux de Vinson *et al.* (2001).

Dans les travaux de Jayaprakasha *et al.* (2003), des extraits de pépins de raisins ont été testés sur l'activité antibactérienne de diverses souches. Les extraits phénoliques de pépins ont inhibé les bactéries Gram+, à des concentrations de 850–1000 ppm et les bactéries Gram-, à des concentrations de 1250-1500 ppm.

I.1.6. Le raisin

Le raisin est le fruit de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*). C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde. En effet, selon un rapport de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) concernant le marché mondial du fruit (Rapport FAO 2000, Fruit production and consumption, data from world fruit program), le raisin représente 14,6 % de la production mondiale de fruits, juste après l'orange, ce qui représente près de 68 millions de tonnes de raisins produits. Il se présente sous la forme de grappes composées de baies, de petite taille et de couleur claire, le raisin blanc (vert jaune, ou jaune doré), ou plus foncée : le raisin rouge (rose, noir-violet) (figure (I.6)).

^a: <http://dictionnaire.doctissimo.fr/definition-atherogene.htm>

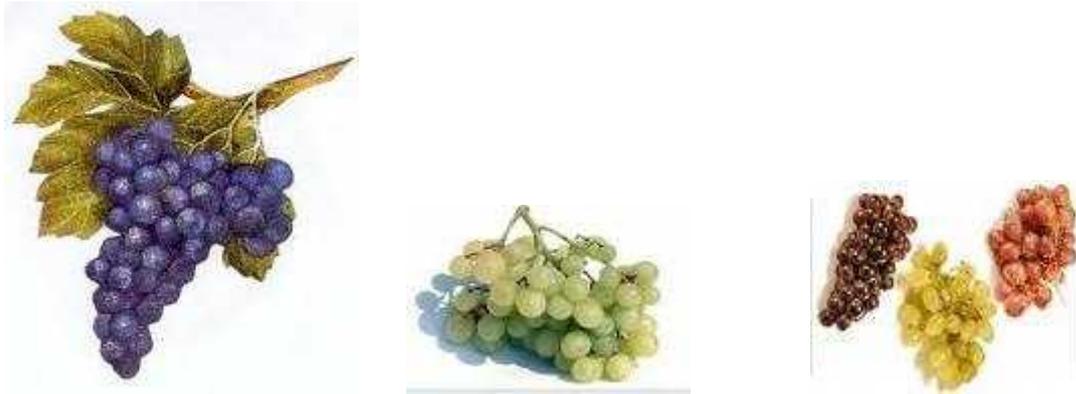


Figure (I.6): Quelques variétés de raisin.

Le raisin peut également être consommé comme fruit, soit frais, le raisin de table (chasselas, cardinal, Lavallée, muscat de Hambourg, danlas, prima, italia...), soit sec, utilisé surtout en pâtisserie ou en cuisine.

Le raisin est une source majeure de polyphénols, qui constituent une famille de molécules organiques caractérisées, comme leur nom l'indique par la présence de plusieurs groupements phénols associés en structures plus ou moins complexes.

Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé (Stanley *et al.*, 2003). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Chen *et al.*, 2004), des maladies inflammatoires (Laughton *et al.*, 1991), cardiovasculaires, (Frankel *et al.*, 1993), et neurodégénératives (Orgogozo *et al.*, 1997). Ils sont également utilisés comme additifs dans les industries agroalimentaires, pharmaceutique et cosmétique ^b.

^b: Third international Conference on Polyphenols Applications, 2006, Malta.
<http://old.isanh.com/polyphenols/2006/>

I.1.7. Composition et valeur nutritive

Le raisin possède une forte teneur en sucre, il est aussi riche en vitamines A, B et C, et en oligo-éléments. Le raisin a un effet sur la mémoire et est aussi énergétique, reminéralisant, détoxiquant, rafraîchissant, et laxatif. Il a un effet sur le renouvellement des cellules ou encore la protection des vaisseaux sanguins. La consommation de raisin est notamment conseillée dans les cas de problèmes hépatiques, nerveux ou digestifs, d'hypertension, de constipation ou d'insomnies et d'infections à répétition.

I.1.8. Variétés de raisin

Il existe des milliers de variétés de vigne, ce sont les cépages. Plus de 5 000 cépages sont répertoriés, dont environ 250 sont cultivés avec des surfaces importantes à des fins viticoles. Chaque cépage se distingue par une feuille, des baies, des formes et des couleurs de grappes différentes. Chaque cépage donne également un parfum et un goût différent.

Les deux plus importantes variétés de cépages sont : *Vitis vinifera* (originaire d'Europe, à partir de laquelle découlent tous les grands cépages pour le vin et le raisin de table) et *Vitis labrusca* (originaire de l'Amérique du Nord, en anglais *fox grape*, dont les raisins ont un goût « foxé » peu apprécié en Europe).

I.1.9. Les polyphénols et le raisin

Le raisin et ses produits dérivés pourraient donc jouer un rôle de nutrition préventive lorsqu'ils sont consommés régulièrement, avec modération, et intégrés à l'alimentation. Les composés phénoliques du raisin possèdent indéniablement des propriétés thérapeutiques (Al-Awwadi *et al.*, 2005), en particulier pour certaines pathologies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension et certains cancers.

Parmi les mécanismes d'action des composés phénoliques impliqués dans la prévention de pathologies chroniques, nous devons retenir les possibilités suivantes :

- un effet de piégeage direct des radicaux libres.
- un effet d'économie d'antioxydants endogènes (vitamine E, vitamine C, β -carotène...);

- un effet d'économie d'enzymes antioxydantes (SOD : superoxyde dismutase, catalase, SeGSHPx : glutathion peroxydase) ;
- un effet de diminution de la cholestérolémie et de « rééquilibrage » des lipides sanguins (HDL/LDL) ;
- un effet de chélation sur des cofacteurs d'oxydation des acides gras comme certains métaux (Fe^{2+} , Cu^{2+}) ;
- un effet d'inhibition sur des enzymes oxydatives comme les cyclooxygénases et les lipooxygénases;
- un effet sur la synthèse de NO endothélial: au niveau cellulaire de la paroi artérielle entraînant une vasorelaxation et une hyperpolarisation de la membrane par relargage de potassium extracellulaire;

Ces composés phénoliques antioxydants donnent une véritable spécificité au raisin et les recherches sur les effets et mécanismes d'actions des composés du raisin et ses produits dérivés sur les pathologies chroniques doivent se poursuivre (Chira *et al.*, 2008).

I.1.10. Teneurs de raisins en polyphénols

Les teneurs en catéchines et procyanidines (oligomères de catéchines) sont variables selon le type de raisin considéré. Ainsi, dans les raisins de tables, les teneurs en ces composés sont comprises entre 243 et 1108 mg/kg, dont plus de 89% sont généralement localisées dans les pépins (Revilla *et al.*, 1997). Le tableau (I.1) donne la répartition des familles de polyphénols en fonction des différentes parties de la baie de raisin rouge.

Tableau (I.1): Teneur moyenne en composés phénoliques des différentes parties du raisin (en mg/kg) (Bourzeix *et al.*, 1986).

	Pulpe	Pellicules	pépins
Tanins	Traces	100-500	1000-6000
Anthocyanes	-	500-3000	-
Acides phénols	20-170	50-200	-

I.1.11. Etude physico-chimique du resvératrol

Le resvératrol est une poudre blanche avec un point de fusion de 253 à 255 °C, sa formule moléculaire est $C_{14}H_{12}O_3$, et son poids moléculaire est de 228,25 g/mol. Sa structure essentielle comporte deux cycles aromatiques reliés par un pont éthylène.

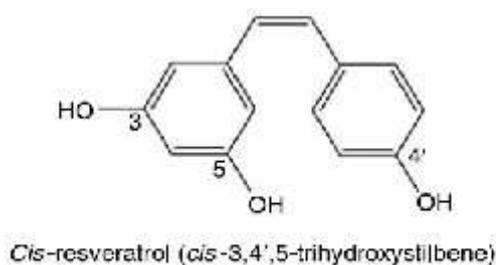
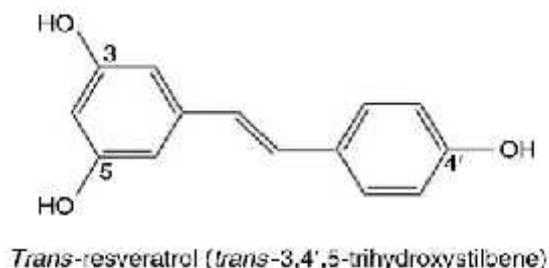


Figure (I.7): Le *trans* et le *cis* resvératrol.

Il existe deux formes isomères du resvératrol, qui correspondent aux diastéréoisomères E et Z, respectivement (figure (I.7)). Toutefois, puisque le *trans* resvératrol est la forme stériquement préférée et relativement stable si elle est abritée du pH élevé et de la lumière, il est donc la forme rapportée par la plupart des études portant sur le resvératrol (Yankner, 1996).

L'absorption maximale dans l'ultraviolet (UV) pour les deux isomères *trans* et *cis* est 308 et 288 nm, respectivement, ce qui permet leur détection et séparation par la chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC (Jenner, 1998).

En plus des différences des propriétés spectrophotométriques, les deux isomères peuvent également être distingués par leurs déplacements chimiques en résonance magnétique nucléaire (RMN) (Fremont, 2000).

Le *trans-resvératrol* étudié dans différentes conditions, a montré une stabilité importante pendant quelques mois, sauf dans les tampons à pH élevé. Quoique le *cis-resvératrol* est extrêmement sensible à la lumière, il peut aussi rester stable dans le

noir à température ambiante pendant au moins 35 jours, dans l'éthanol 50% à la concentration de 5,3 à 52,8 mmol/L (Fremont, 2000).

Plusieurs études ont montré que le *trans* resvératrol est la forme biologiquement active du resvératrol. Toutefois, en ce qui concerne la structure de la molécule, loin de la stéréochimie de la liaison styrène, les positions des substituants phénoliques sur des cycles aromatiques jouent également un rôle important dans la détermination de l'activité biologique.

La structure moléculaire du resvératrol a été examinée en détail et des calculs théoriques d'énergie pour plusieurs états excités du *trans* resvératrol (et la *trans* -viniférine, aussi) ont montré l'importance de la position p-4'-OH du groupe pour l'activité biologique (Caruso *et al.*, 2004).

Au cours de ces dix dernières années, plusieurs méthodes basées sur l'utilisation de l'HPLC et la chromatographie en phase gazeuse (GC) ont été développées pour détecter la présence et pour mesurer les teneurs du resvératrol et ses analogues dans diverses sources nutritives et végétales (Soleas *et al.*, 1997).

I.1.12. Analyses chimiques du resveratrol

Depuis l'étude des propriétés biologiques du resvératrol, beaucoup d'efforts ont été fournis pour l'élaboration de méthodes nécessaires pour l'analyse des mélanges complexes contenant des quantités très faibles de stilbènes, en passant par des extractions rapides et complètes pour minimiser les pertes par isomérisation et/ou dénaturation. Généralement, les méthodes par HPLC sur des colonnes C18 en phase inverse couplée à un détecteur UV ou à barrettes de diodes peut établir une distinction adéquate entre les isomères du resvératrol et leurs analogues en fonction de leurs maxima d'absorptions différentes. Cependant, l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS), fluorimétrie, et des détecteurs électrochimiques (ECDS), qui sont encore plus spécifiques, a considérablement amélioré la sensibilité et la diminution de la taille de l'échantillon (Deak *et al.*, 2003).

I.1.13 travaux antérieurs sur le dosage des stilbènes dans le raisin et les jus de raisin

Dans une étude récente par Esna-Ashari *et al.* (2008), le resveratrol a été quantifié dans 147 variétés du raisin Iranien en utilisant l'HPLC, Il a été constaté que 41 sur les 147 variétés contenaient des teneurs importantes de *trans* resvératrol qui

variaient de 0,98 à 6,25 mg par kg de poids frais, avec une valeur moyenne de 3.59 (raisins blancs) et 3,08 mg/ kg (raisins rouges), respectivement.

D'autre part Sun *et al.* (2005) ont quantifié le *trans*-picéide, le *cis*-picéide et le *trans*-resvératrol dans les trois parties (rafle, peau, pépin) de trois variétés de raisin. Ces auteurs ont aussi entamé une étude cinétique au moyen d'une technique HPLC avec un détecteur UV visible sur l'extraction des stilbènes.

Selon Romero-Perez *et al.* (1999), le *trans* resvératrol contenu dans le jus de raisin rouge varie de 0,010 à 1,090 ppm et le *cis* resvératrol de 0,003 à 0,23 ppm. D'autre part, ces auteurs rapportent 0,05 ppm comme concentration de *trans* resveratrol présente dans les jus de raisin blanc et l'absence de *cis* resvératrol. Les faibles teneurs trouvées dans les jus sont dues au faible contact avec la peau, plus riche en stilbènes, pendant la macération.

Jeandet *et al.* (1991) ont constaté que dans le raisin, le resvératrol est synthétisé principalement par la peau (5-7 ppm). De faibles concentrations ont été trouvées dans les pépins (1 ppm) et dans la pulpe (moins de 0,1 ppm).

Les teneurs du *trans resvératrol* dans la pellicule du raisin rouge et blanc varient de 11,1 à 123,0 mg/ (kg de matière sèche), mais il a été trouvé que ces teneurs varient d'une année à une autre (Kammerer *et al.*, 2004).

Dans les travaux de Wang *et al.* (2002), la teneur du resvératrol dans le raisin dépend en grande partie du cépage de la vigne, l'origine géographique (sol, climat), l'intensité de l'infection fongique (en particulier *Botrytis cinerea*), puisque la synthèse du resvératrol est induite dans les raisins par les stress, les blessures, les infections fongiques et l'irradiation UV.

I.1.14. Dosage des stilbènes dans d'autres plantes et nutriments

En plus du raisin, le *trans* resvératrol a été dosé dans divers produits comestibles. On trouve donc de 0.03à 0.147 ppm dans les arachides et leurs dérivés (Sanders *et al.*, 2000; Sobolev *et al.*, 1999), 5.14 ± 2.85 ppm d'arachides torréfiés (Sobolev *et al.*, 1999), et de 0.27 à 0.75 ppm dans le beurre d'arachides (Ibern-Gomez *et al.*, 2000). Le resvératrol a aussi été détecté dans la peau de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) par Ragab *et al.* (2006), avec une concentration de $18,4 \pm 1,6$ mg/g de poids sec. Sierra Rayne *et al.* (2007), ont montré que les teneurs en *trans* resvératrol et *trans*-viniférine dans la tige de la vigne, variété pinot noir est de 3.45 ± 0.04 et 1.30 ± 0.07 mg /g respectivement. Vastano *et al.* (2000) ont en outre montré que les racines

du *Polygonum cuspidatum* constituent l'une des sources les plus riches en resvératrol (2960-3770 ppm).

Des concentrations très élevées de resvératrol ont également été détectées dans des feuilles de *Veratrum grandiflorum* et dans les racines et rhizomes de *Veratrum formosanum*. Ces trois dernières plantes ont été largement utilisées en médecine populaire chinoise et japonaise pour leurs propriétés curatives (laxatif, anti-artériosclérose, anticancéreuse) (Soleas *et al.*, 1997).

Counet *et al.* (2006) ont déclaré que le chocolat est une nouvelle source du *trans* resvératrol et du *trans*-picéide, les résultats de leurs travaux réalisés par HPLC-MS/MS, ont montré que le chocolat contient 0.5 ppm de *trans* resvératrol et 1.2 ppm de *trans* picéide.

I.2. Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Le cholestérol tire son nom du grec ancien *chole-* (bile) et de *stereos* (solide), car il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires en 1758 par François Poulletier de La Salle (Feltgen, 1993). Mais ce n'est qu'en 1814 que le chimiste français Eugène Chevreul lui donna le nom de *cholestérine*. Le mot « cholestérol » désigne une molécule unique. Ce qui signifie que les termes de « bon » et « mauvais cholestérol » ne servent pas à désigner deux molécules différentes, mais font référence aux HDL (High Density Lipoproteins ou lipoprotéines de haute densité) et LDL (Low Density Lipoproteins, lipoprotéines de basse densité), les transporteurs du cholestérol dans le sang.

I.2.1. Structure

La molécule de cholestérol comprend quatre cycles carbonés noté A,B,C et D (noyau cyclopentano-perhydro-phénanthrénique), 8 carbones asymétriques (les carbones 3, 8, 9, 10, 13, 14, 17 et 20), ce qui fait 2^8 soit 256 stéréoisomères dont un seul existe: le 3 -ol lévogyre. Le cholestérol possède un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3 (C3) (figure (I.8)). Ce groupe chimique constitue la tête polaire et la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau. Le cholestérol est présent sous forme de stérides (cholestérol estérifié) dans la plupart des tissus des vertébrés, et en particulier le foie, le cerveau, et la moelle épinière.

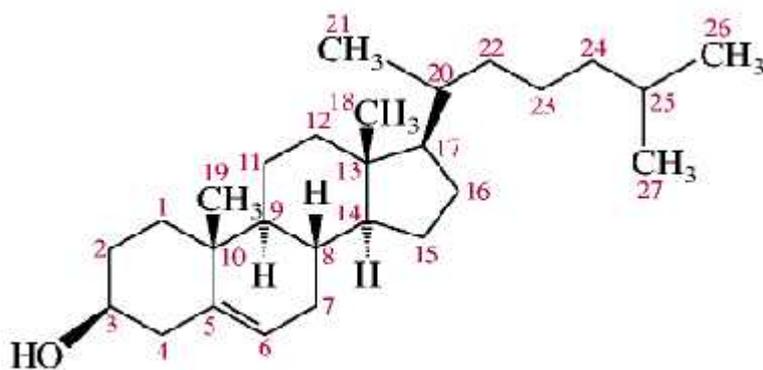


Figure (I.8): Structure et numérotation des atomes du cholestérol.

I.2.2. Sources du cholestérol

Le cholestérol présent dans l'organisme peut avoir deux sources, soit l'alimentation qui constitue l'apport exogène, soit la biosynthèse, le foie étant capable d'en produire à lui seul la moitié (apport endogène) (Repa *et al.*, 2000). On considère que chez l'être humain, l'apport de cholestérol par la nourriture est compris entre 300 et 500mg par jour alors que la production endogène est comprise entre 600 et 900 mg par jour. Sur ces 1200 mg de cholestérol acquis en moyenne, entre 400 et 600mg sont dégradés en acides biliaires, 600 mg sont sécrétés dans la bile, 85mg sont utilisés pour le renouvellement des membranes cellulaires et 50 mg sont utilisés pour la synthèse d'hormones stéroïdes. Dans des conditions physiologiques normales, la balance entre apport et utilisation du cholestérol par l'organisme est équilibrée (Repa *et al.*, 2000).

Le cholestérol issu de l'alimentation est capté au niveau de l'intestin, exporté vers le foie puis distribué aux autres tissus par les lipoprotéines de basse densité (LDL). L'élimination se fait par le chargement sur les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui suivent le cheminement inverse vers le foie (transport inverse du cholestérol) schématisé sur la figure (I.9) (Chang *et al.*, 2006).

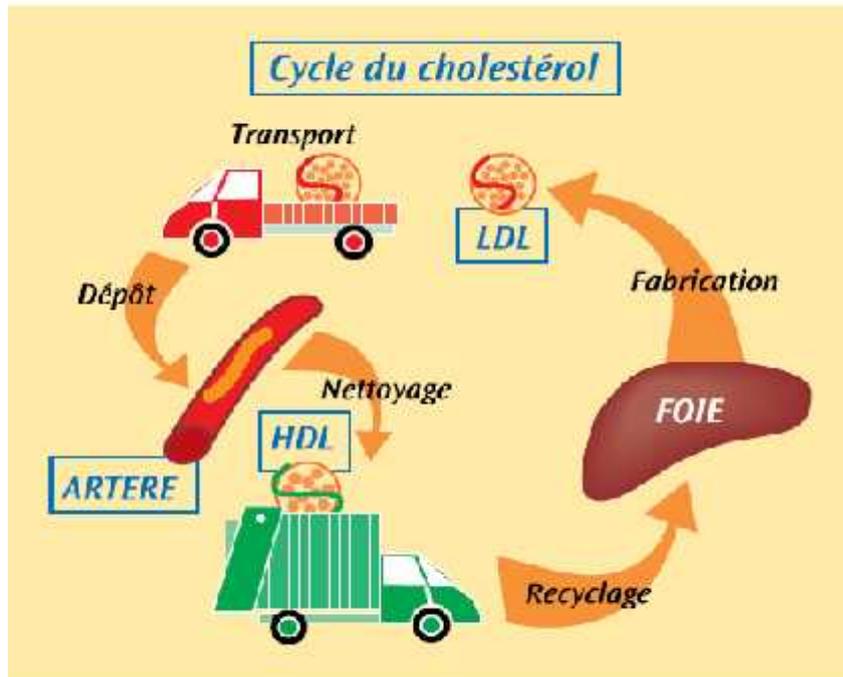


Figure (I.9): Schéma simplifié de la circulation du cholestérol dans l'organisme (Chang *et al.*, 2006).

I.2.3. Hypercholestérolémie et athérosclérose

Dès le début du XX^e siècle, les travaux expérimentaux d'Anitschkow et Chaladow avaient permis de mettre en évidence le rôle du cholestérol dans l'athérosclérose, chez le lapin, en le nourrissant de graisses animales (Anitschkow *et al.*, 1983). Aujourd'hui, plusieurs études proposent que l'athérosclérose soit une maladie inflammatoire (Davies, 1996 ; Ross, 1999) et qu'un marqueur de cette maladie soit probablement le cholestérol associé aux LDL après oxydation. Parallèlement, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre l'hypercholestérolémie et la présence d'une réaction inflammatoire dans le tissu vasculaire (Liao *et al.*, 1994 ; Young, 1994). Des études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation entre le taux de cholestérol sanguin et le risque de survenue de maladies cardio-vasculaires. Ce taux est inclus dans plusieurs méthodes de calcul de ce risque (« échelle de risque ») (Conroy *et al.*, 2003).

L'industrie alimentaire est soumise à des réglementations particulièrement strictes concernant la qualité et la sécurité de ses produits. De peur que des aliments contaminés parviennent jusqu'au marché de détail, les conséquences peuvent être graves. Pour satisfaire les exigences industrielles réglementaires de qualité et de sécurité, les laboratoires doivent utiliser des instruments et des méthodes fiables

répondant aux normes les plus strictes. La conformité à la réglementation est le maître-mot dans ce domaine.

I.3. Stress oxydant et activité antioxydante

La recherche sur la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique très important ; notion largement relatée dans l'étude des propriétés biologiques. Nous allons présenter ci-dessous, les molécules responsables de l'oxydation et celles qui permettent de la combattre.

I.3.1. Stress oxydant et radicaux libres

Le stress oxydatif correspond à une perturbation de l'état oxydant intracellulaire, induite soit par une production excessive de molécules particulièrement nocives qui viennent de l'oxygène que nous respirons pour vivre que l'on appelle les radicaux libres, soit par diminution de la capacité de défenses antioxydantes de l'organisme (Sorg, 2004). Ce déséquilibre peut avoir plusieurs origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Koechilin-Ramonatxo, 2006). Pour rattraper les électrons célibataires, les EOR (Espèces oxygénées réactives) attaquent toutes molécules susceptibles de donner un électron. Les protéines les lipides, l'acide désoxyribonucléique et l'ADN sont les cibles biologiques les plus vulnérables à cette agression, ceci a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles. (Halliwell *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006) (Figure (I.10)).

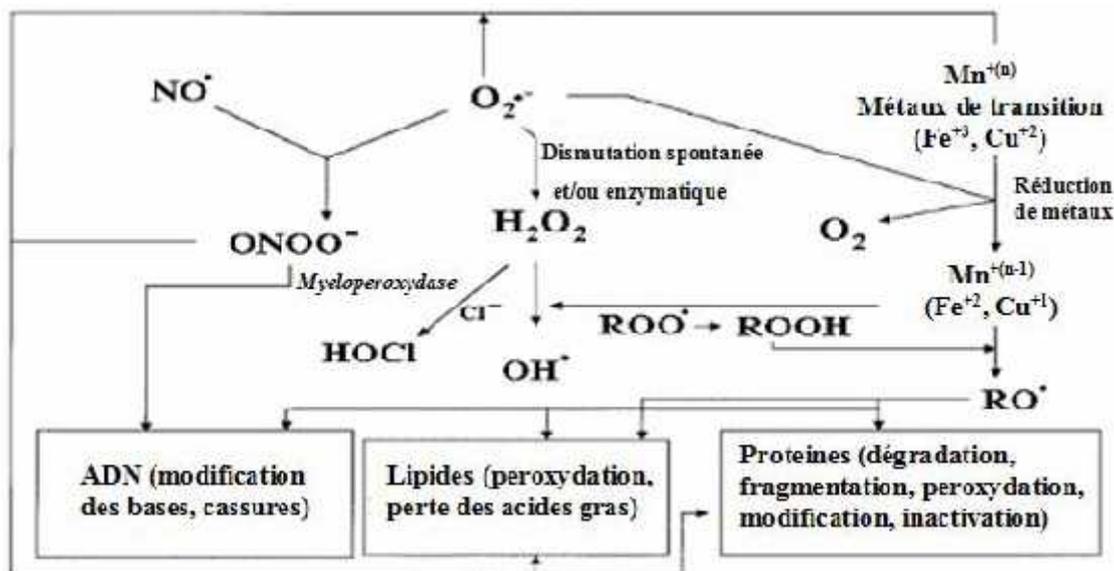


Figure (I.10): Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (D'après Kohen *et al.* (2002)).

I.3.2. Action sur les lipides

La peroxydation lipidique est un phénomène très important qui se produit dès la présence de l'oxygène atmosphérique. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés, quelle que soit leur origine, (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés (Cillard, 2006). Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes allyliques en position facilement oxydables. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides et les cardiolipines, ce qui explique leurs vulnérabilités particulières. Les peroxydes sont les produits primaires résultant de l'oxydation des acides gras, ensuite ils se décomposent rapidement pour donner de très nombreux produits qui vont contribuer à la propagation des dommages vis-à-vis d'autres molécules comme les protéines, les acides nucléiques et d'autres lipides. Ces conséquences dommageables constituent un problème sérieux pour l'industrie alimentaire confrontée à la préservation des aliments mais également pour la santé humaine car elle est associée à de nombreuses pathologies. En revanche, ces composés se comportent comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment

subcellulaire) (Beckman *et al.*, 1998 ; Lehucher-Michel, 2001). La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases suivantes (illustrées par la figure (I.11)).

a) l'initiation: L'hydrogène en position de chaque côté de la double liaison de l'acide gras subit une coupure homolytique due à l'attaque du radical OH^\bullet . Il apparaît alors un radical d'acide gras R^\bullet , sur lequel la double liaison peut migrer, en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxyde RO_2^\bullet (Martínez-Cayuela, 1995).

b) la propagation: au sein de cette deuxième phase dite propagation, l'oxygène atmosphérique peut alors se fixer sur le radical formé d'acide gras pour former un radical peroxydique RO_2^\bullet , ce dernier est instable, avec l'arrachement d'un autre hydrogène, le radical peroxydique se stabilise sous forme d'un hydroperoxyde d'acide gras. Le radical OH^\bullet arrache un autre hydrogène d'un nouveau AGPI voisin qui à son tour, produira un radical R^\bullet puis un radical RO_2^\bullet , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transition, les hydroperoxydes formés peuvent subir une rupture au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décomposition; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentent les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001).

c) la terminaison : cette phase correspond à la disparition des peroxydes et à la formation des composés stables issus de l'accumulation des composés secondaires d'oxydation ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne' (Khohen *et al.*, 2002).

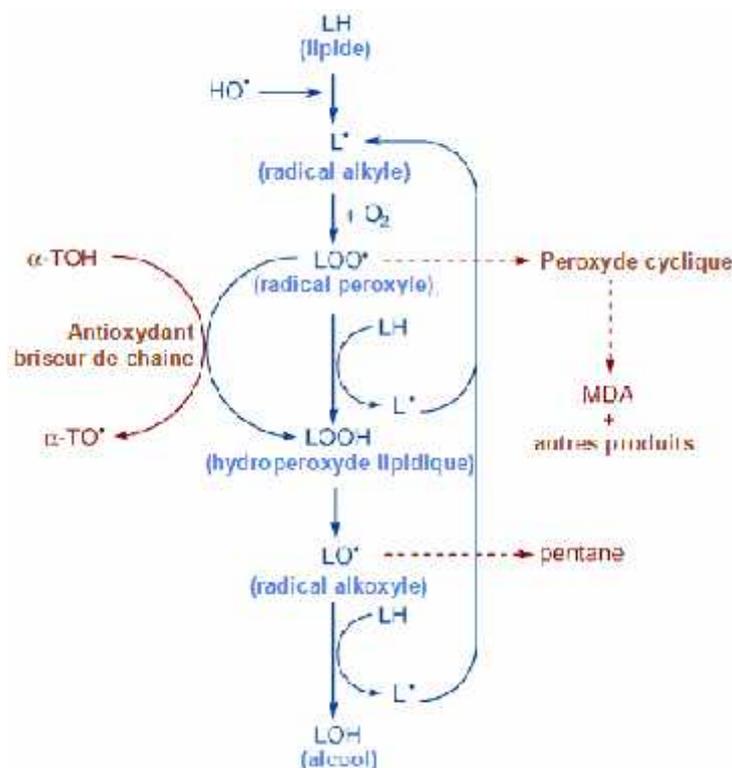


Figure (I.11): Les trois étapes de la peroxydation lipidique (D'après Sachdev *et al.*, 2008).

I.3.3. Les protéines

L'oxydation des protéines a lieu lorsque des EOR oxydent les groupes latéraux d'acides aminés, ou par la fragmentation de la liaison peptidique (Berlett *et al.*, 1997).

Bien que les acides aminés soient une cible importante pour les EOR, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés après le départ de l'atome d'hydrogène génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007). Les protéines dénaturées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung *et al.*, 2007).

I.3.4. Les acides nucléiques

Les bases constitutives de l'ADN et particulièrement la guanine sont la cible préférée des EOR. L'attaque radicalaire peut transformer ces bases en produits de

fragmentations et en bases oxydées (Martinez-Cayuela, 1995). L'attaque des EOR sur la guanine engendre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui sera éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être une cible pour les radicaux libres. Si les systèmes de protection sont défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

I.3.5. Implications pathologiques des EOR

Les radicaux libres provoquent des altérations de l'homéostasie cellulaire de l'organisme en raison de leur réactivité très élevée avec divers substrats biologiques. Il faut souligner que le stress oxydant est le facteur principal et originel déclenchant de nombreuses pathologies. C'est le cas des cancers et des maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer) (tableau (I.2)). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (Favier, 2003 ; 2006). Le rôle du stress oxydant a également été évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Sorg, 2004 ; Valko *et al.*, 2007).

Tableau (I.2): Les principales affections liées à la production des EOR.

Pathologies	Références
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier <i>et al.</i> , 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell <i>et al.</i> , 1990)
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i> , 2003)
Maladies inflammatoires	(Densiov <i>et al.</i> , 2005)
Athérosclérose	(Harrison <i>et al.</i> , 2003)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Emphysème	(Lehucher-Michel <i>et al.</i> , 2001)
Diabète sucré	(Pal Yu, 1994)
Certains cancers	(Valko <i>et al.</i> , 2007)
Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela, 1995)

I.3.6. Systèmes de défenses antioxydants

Un stress oxydatif peut provoquer un excès des EOR dans le corps humain. Le système de défense antioxydant joue un rôle très important pour le maintien d'un niveau non cytotoxique des radicaux libres. La relation entre le système de défense antioxydant et la gestion du stress est un enjeu intense qui a attiré l'attention des chercheurs. Comme il a déjà été mentionné, l'antioxydant peut retarder ou empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques oxydables, en entrant en compétition avec ces substrats pour le piégeage des EOR (Berger, 2006). Les cellules consomment beaucoup d'énergie et utilisent différentes stratégies pour régler le niveau des EOR (figure (I.12)).

La nature des systèmes antioxydants se diffère selon les tissus et les types cellulaires, l'environnement intracellulaire et les facteurs extérieurs. Les défenses antioxydantes de notre organisme se répartissent en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable *et al.*, 1997).

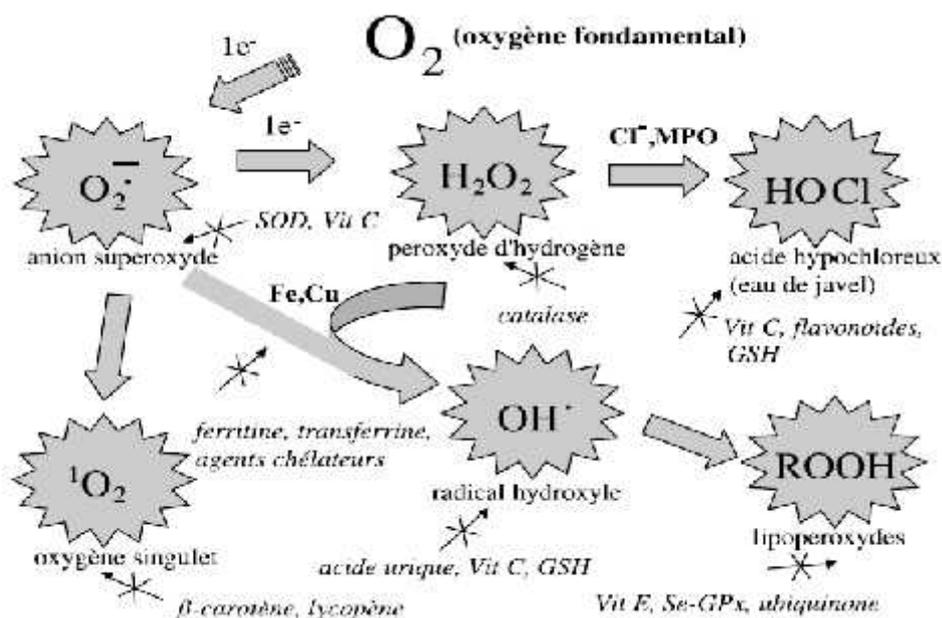


Figure (I.12): Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (D'après Pincemail *et al.*, 2002).

I.3.7. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'une substance correspond à sa résistance contre l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A),

l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupements hydroxyles phénoliques dans leurs structures qui leur confère la capacité de piéger les EOR.

Plusieurs méthodes *in vitro* ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Tabart *et al.*, 2009 ; De Gaulejac *et al.*, 1999 ; Hua *et al.*, 2008).

Les stilbènes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des stilbenes sont souvent associées à leur potentiel antiradicalaire.

De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des stilbènes et essentiellement du *trans* resvératrol, est liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène.

I.3.8. Mécanismes de piégeage des radicaux libres

a) Mécanisme HAT

Les propriétés antiradicalaires des composés phénoliques (ArOH) sont liées à leur capacité de transférer leur atome H phénolique à un radical libre. De nombreux auteurs ont suggéré que l'enthalpie de dissociation homolytique de la liaison O-H (BDE-OH) (de l'acronyme anglais Bond Dissociation Enthalpy, BDE) est le descripteur principal de l'activité antioxydante.

Ce mécanisme dépend des enthalpies de dissociation de deux liaisons (BDEs): la BDE de O-H de ArOH et la BDE de H-R du radical. Le paramètre BDE-OH (l'enthalpie par mole nécessaire pour rompre la liaison OH de certaines molécules spécifiques) (McNaught et Wilkinson, 1997) est lié à la voie de transfert de l'atome H suivant la réaction suivante :



En utilisant les enthalpies de l'état standard à 1 atm et 298,15 K, les valeurs des BDE homolytiques ont été calculées par la relation suivante:

$$\text{BDE}_{\text{ArO-H}} = {}_f\text{H}(\text{ArO}\cdot) + {}_f\text{H}(\text{H}\cdot) - {}_f\text{H}(\text{ArOH}) \quad (\text{I.1})$$

Où:

- ✓ $H_f(\text{ArO}\cdot)$ est l'enthalpie de formation du radical stilbénique générée après abstraction de H,
- ✓ $H_f(\text{H}\cdot)$ est l'enthalpie de formation du radical H \cdot ,
- ✓ $H_f(\text{ArOH})$ est l'enthalpie de formation de la molécule antioxydante.

Une faible valeur de la BDE est généralement attribuée à une plus grande capacité de donner un atome d'hydrogène du groupe hydroxyle en entraînant plus facilement une réaction de piégeage de radicaux libres. Le radical généré est un radical libre relativement stable. De l'autre côté, des approches basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) permettent de calculer des valeurs précises de la BDE.

b) Mécanisme (SET-PA)

Transfert d'électron suivi d'un transfert de proton (Single-Electron Transfer – ProtonTransfer (SET-PT)) :

❖ **Potentiel d'ionisation adiabatique (AIP)**

Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP) est défini comme étant l'énergie minimale nécessaire pour arracher un électron à partir d'une molécule isolée (ou atomes) dans son état fondamental pour former un ion en phase gazeuse (McNaught *et al.*, 1997). De nombreux auteurs ont corrélé les AIPs d'un composé à son activité antioxydante (Cheng *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2006). Les valeurs des AIPs, associées à la première étape du mécanisme SET-PA, ont été calculées à partir de l'équation (I.2).

$$\text{AIP} = H_f(\text{ArOH}^{\cdot+}) - H_f(\text{ArOH}) \quad (\text{I.2})$$

Dans l'équation II:

$H_f(\text{ArOH})$: correspond à l'enthalpie de formation du composé phénolique (ArOH),

$H_f(\text{ArOH}^{\cdot+})$: correspond à l'enthalpie de formation du radical cationique correspondant (ArOH $^{\cdot+}$).

❖ **Enthalpie de dissociation du proton (PDE)**

L'enthalpie de dissociation du proton est la deuxième étape du mécanisme SET-PA, (équation (I.3)).

$$PDE = H_f(ArOH^\bullet) + H_f(H^+) - H_f(ArOH^{+\bullet}) \quad (I.3)$$

c) Mécanisme SPLET

Récemment, un nouveau mécanisme a été établi (Staško *et al.*, 2007). Il s'agit de la perte séquentielle de proton suivi par un transfert d'électron (Sequential Proton Loss Electron Transfer (SPLET)) :

❖ **PA :**

Le PA (Proton affinity) représente l'enthalpie de la réaction de la première étape du mécanisme SPLET (équation (I.4)).

$$PA = H_f(ArOH^-) + H_f(H^+) - H_f(ArOH) \quad (I.4)$$

❖ **b) ETE :**

L'ETE (Electron Transfer Enthalpie) représente l'enthalpie de la réaction de la seconde étape du mécanisme SPLET (équation (I.5)).

$$ETE = H_f(ArOH^\bullet) + H_f(e^-) - H_f(ArOH^-) \quad (I.5)$$

$H_f(ArOH)$: Enthalpie de formation du composé phénolique (ArOH),

$H_f(ArOH^{+\bullet})$: Enthalpie de formation du radical cationique (ArOH⁺).

$H_f(ArOH^-)$: Enthalpie de formation du radical ionique correspondant (ArOH⁻).

$H_f(H^+)$: Enthalpie de formation du proton H⁺.

$H_f(e^-)$: Enthalpie de formation de l'électron.

I.3.9. Stilbènes et activité antioxydante

L'activité antioxydante du resvératrol est liée à la capacité des groupements hydroxyles à piéger les radicaux libres produits *in vivo* (Wang *et al.*, 1998, Fang *et al.*, 2002). Le caractère antioxydant de ce composé et ses dérivés hydroxylés a été étudié par Murias *et al.* (2004). Cette investigation repose sur l'étude du mécanisme réactionnel entre le *trans* resvératrol et les radicaux peroxy. Ces auteurs ont montré en particulier, que l'augmentation de la cytotoxicité et l'activité antioxydante du *trans* resvératrol sont liées à la présence de la forme radicalaire semi-quinone formée au cours de l'oxydation. En outre, l'influence des groupes hydroxyles sur les propriétés antiradicalaires du *trans* resvératrol ont fait l'objet de nombreuses recherches. Les résultats ont montré que le groupement hydroxyle 4'-OH est essentiel pour la génotoxicité et l'activité antioxydante des stilbènes (Matsuoka *et al.*, 2002). D'autre

part, Stivala *et al.* (2001) ont montré que la valeur EC_{50} du radical DPPH^{*} est 48,6 après méthylation du groupe 4'-OH du resvératrol, alors que la substitution des groupes 3 et 5-OH par des groupes méthoxy- donne une valeur de 30,1. Ces résultats montrent l'importance du groupe hydroxyle en position 4' pour l'activité antioxydante, mais ce dernier agit de manière synergique avec les groupes 3 et 5-OH. D'autres études ont montré que l'activité antioxydante du *trans* resvératrol et de ses analogues dépend fortement du nombre et de la position des groupements hydroxyles, des liaisons hydrogène et de la présence de la liaison vinyle entre les deux cycles aromatiques (Cai *et al.*, 2003). Il a été également constaté que certains dérivés du resvératrol, portant la fonction catéchol, possèdent une activité antioxydante beaucoup plus élevée (contre la peroxydation induite par les radicaux libres dans les systèmes mimétiques de la membrane) que celle obtenus avec des composés ne possédant pas cette entité (Fang *et al.*, 2002).

En parallèle, des méthodes de chimie quantique ont été mises au point pour étudier l'activité antioxydante des stilbènes. L'activité antioxydante du *trans* resvératrol a été étudiée par application de la méthode de DFT, par Cao *et al.* (2003). Les résultats ont révélé que ce composé est un antioxydant très fort, parce qu'après la rupture de l'atome d'hydrogène, les formes radicalaires ont généré des formes semiquinones dans lesquelles, l'électron célibataire est réparti le long de la molécule.

En outre, Caruso *et al.* (2004) ont effectué des calculs quantiques en phase gazeuse révélant l'activité antioxydante du *trans* resvératrol et de certains de ses dérivés. Ces auteurs ont montré que le transfert de proton est le mécanisme dominant de la réaction des radicaux libres avec ces antioxydants et que le groupe para-4'-OH est le site le plus acide de la molécule; cette observation est en corrélation avec la capacité de piégeage des radicaux libres.

En revanche, Wright *et al.* (2001) ont étudié l'activité antioxydante du resvératrol et d'autres dérivés stilbéniques, en phase gazeuse, avec la méthode LDBS (acronyme en Anglais, Locally Dense Basis Sets) en se basant sur la BDE et l'AIP comme paramètres. Les résultats ont montré que le mécanisme dominant dans le piégeage des radicaux libres est le mécanisme HAT au lieu du SET-PA.

Bien que ces calculs aient été effectués en phase gazeuse, ils apportent de précieuses informations sur l'activité antioxydante du *trans* resvératrol, mais l'effet

du solvant sur ces paramètres n'a pas été pris en considération bien que la majorité des réactions dans la nature, aient lieu en phase aqueuse.

Mikulski *et al.* (2010) ont étudié les propriétés électroniques du *trans* resvératrol en phase gazeuse et aqueuse, en tenant compte des deux mécanismes HAT et SET-PT. Ces auteurs ont calculé les paramètres : BDE, AIP et PDE, dans les deux environnements. Les calculs ont révélé que le mécanisme HAT est plus dominant que le mécanisme SET-PT dans les deux phases étudiées. Les valeurs de la PDE (la deuxième étape du mécanisme SET-PT) étaient 322,582 et 281,161 kcal/mol sous vide et dans l'eau respectivement. D'autre part, Lu *et al.* (2013) ont trouvé 233,58 et 266,12 kcal/mol pour les mêmes paramètres calculés avec la même méthode 6-311G (d,p). Bien que ces auteurs aient utilisé la même méthode de calcul, les résultats obtenus montrent une grande variabilité et une contradiction très apparente. En plus, l'effet de l'hydratation sur l'enthalpie de déprotonation n'est pas apparent dans les deux travaux.

Bien que la connaissance des énergies associées à ces deux processus élémentaires (BDE et AIP) soit essentielle pour estimer le potentiel antioxydant d'un système polyphénolique, l'investigation du mécanisme SPLET est indispensable, surtout en phase aqueuse, pour élargir le spectre de compréhension des processus responsables de l'activité antioxydante.

Les travaux réalisés sur ce sujet ont montré que le site 4'-OH est le pharmacophore dans le resvératrol et ses dérivés.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II.1 Solvants

Tous les solvants que nous avons utilisés en chromatographie analytique étaient de grade HPLC. Le méthanol, l'acide trifluoroacétique (TFA), le n-Hexane, l'éthanol, le 2-propanol et le KOH ont été achetés chez Sigma Aldrich (Sigma, Allemagne). L'eau a été distillée et filtrée. Les molécules standards : le *trans* resvératrol, le *trans*-picéide et l' -viniférine ont été extraits à partir des sarments de la vigne *Vitis vinifera* lors d'un travail antérieur (Amira-Guebailia, 2007). Le cholestérol a été fourni par le département de biologie (université de Guelma).

II.2 Appareillage :

- Évaporateur sous pression réduite.
- Centrifugeuse.
- HPLC analytique (Shimadzu) équipée de :
 - Colonne C18: (Nucleosil 100, diamètre de la colonne : 250 x4 mm, diamètre des billes: 5 µm).
 - Colonne 120-7 CN: (Nucleosil 100, diamètre de la colonne : 125mm×4.6mm, diamètre des billes de silice: 5 µm).
 - Détecteur UV type SPD-10Avp UV / VIS.
 - Pompe type LC-10ATvp.
 - Dégazeur type DGU-14A.
 - System de control de type SCL-10Avp.

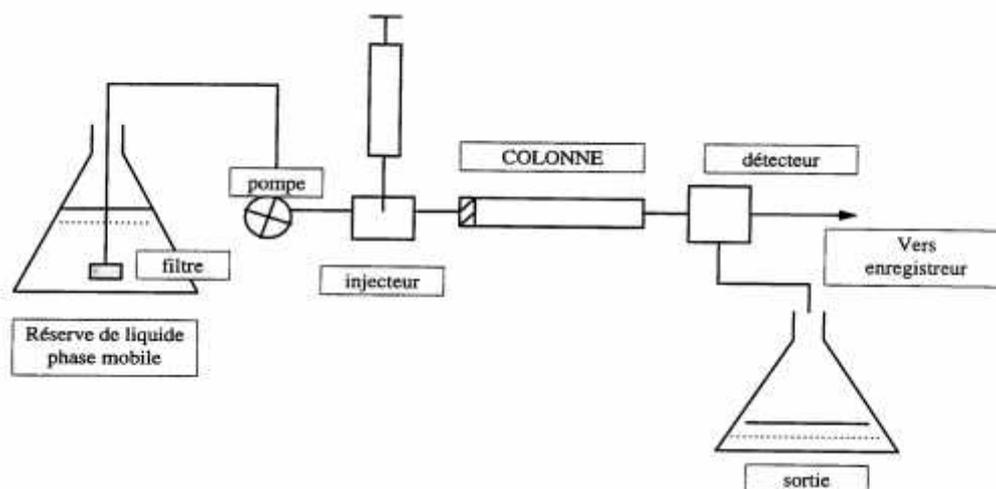


Figure (II.1): Schéma de principe d'une chaîne HPLC (http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/chim/Jumber/HPLC/Chromatographie_en_phase_liquide.htm)

Le schéma de principe est représenté dans la figure (II.1), c'est un appareil de type Shimadzu muni de deux pompes pour la délivrance de solvants, d'un détecteur UV-visible. La colonne (250 x4 mm) utilisée est garnie de silice greffée au C18 (Nucleosil 100, diamètre des billes de silice : 5 µl), cette dernière est utilisée comme phase stationnaire pour l'analyse des stilbènes. Tandis que La colonne (125 x4,6 mm) utilisée pour l'analyse du cholestérol est garnie de silice greffée au CN (Nucleosil 100, diamètre des billes de silice : 5 µl). La température de la colonne est de 25°C et le débit est de 1ml/min. Les composantes de l'appareil HPLC sont :

➤ **Réservoir de la phase mobile (solvant) :**

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire, le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

➤ **Pompe :**

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Les paramètres des pompes utilisées sont :

- débit: 1 ml/min.
- pression maximale \leq 300 bars.

➤ **Injecteur :**

Le type d'injecteur utilisé comportait une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité maximale de 20 microlitres. Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. L'injection se fait à l'aide d'une seringue après que la colonne soit bien équilibrée.

➤ **Vanne à boucle d'échantillonnage :**

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

➤ **Détecteurs :**

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le détecteur utilisé est un spectrophotomètre d'absorption UV visible relié à la sortie de la colonne. Le signal du détecteur est alors amplifié et enregistré.

II.3 Première partie : Analyse quantitative de stilbènes dans les raisins

II.3.1 Broyage et macération

Deux variétés rouges (le gros noir et le Cardinal) et trois variétés blanches (Sabel, muscat et dattier) de raisin (quatre échantillons de chaque variété) ont été aléatoirement récoltées de diverses régions de l'Algérie (Guelma, Boumerdes, El Taref) en 2010.

Les quatre parties de raisin (pépin, pellicule, rafle et pulpe) ont été séparées. Les pellicules et pépins ont été séchés et broyés finement à l'aide d'un moulin électrique.

Pour l'étude de l'effet du solvant, le temps de macération et la température utilisée pendant l'extraction, environ 0,5g de poudre de pellicule de raisin ont été soumis à l'extraction dans 10 ml de chaque solvant (figure (II.2-4)).

II.3.2 Optimisation de l'extraction des stilbènes

a) Effet du solvant

Dans cette partie, l'effet du solvant sur la capacité d'extraction du RSV et ses analogues a été étudié. En utilisant trois divers solvants, le méthanol, le méthanol/ (TFA 0,0025 %) et un mélange méthanol /eau (80/20,% volumique), 0,5 g de poudre de pellicule de raisin ont été soumis à l'extraction dans 10 ml de chaque solvant pendant 24 heures. Une fois filtré, l'extrait de chaque variété a été stocké jusqu' a son utilisation.

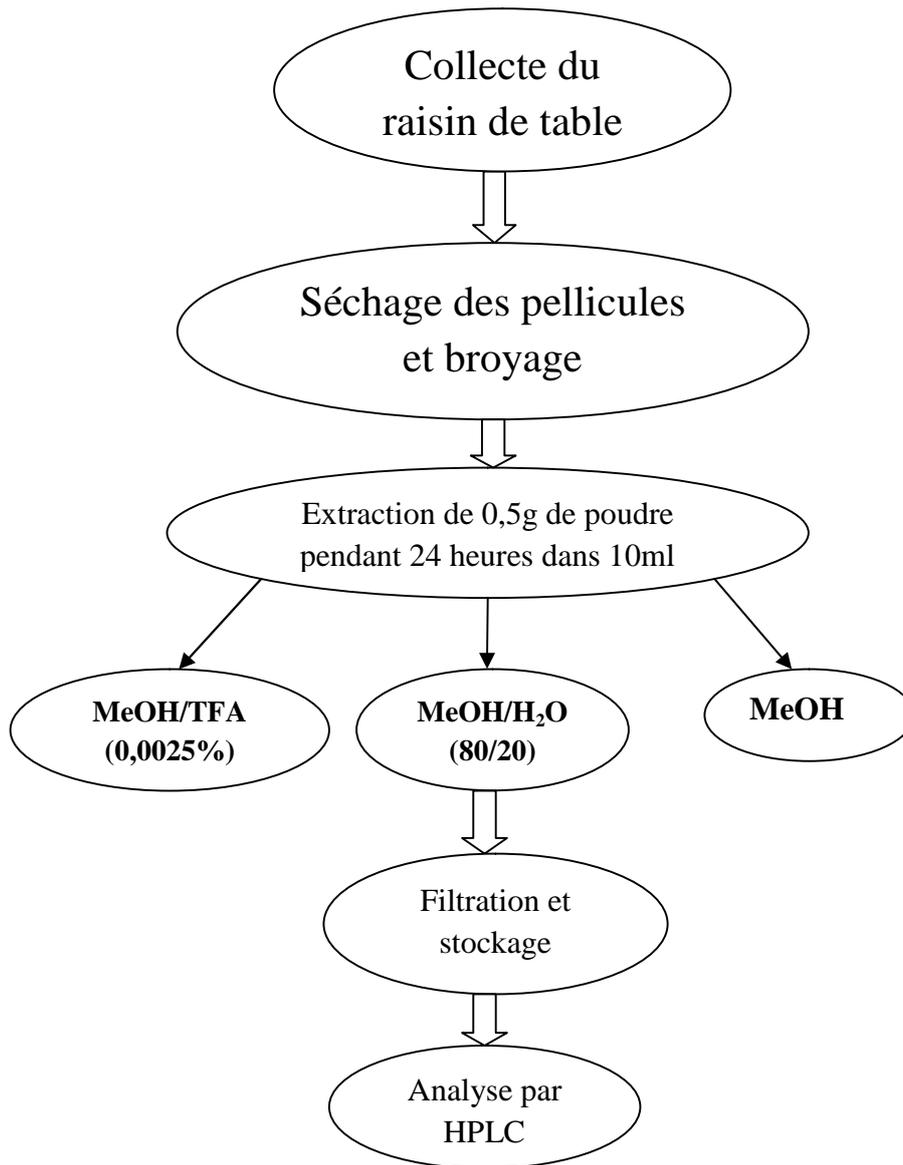


Figure (II.2): Extraction des pellicules de raisin par différents solvants.

b) Effet de la température

Pour étudier l'effet de la température sur l'extraction, 0,5g de poudre de pellicules de raisin ont été utilisés pour l'extraction dans un tube à l'aide de 10 ml de MeOH/TFA (0,0025%), en changeant la température chaque fois de 30 à 80°C. Dans ce processus, le RSV, le trans-picéide et la -viniférine ont été examinés pour leur résistance à la température.

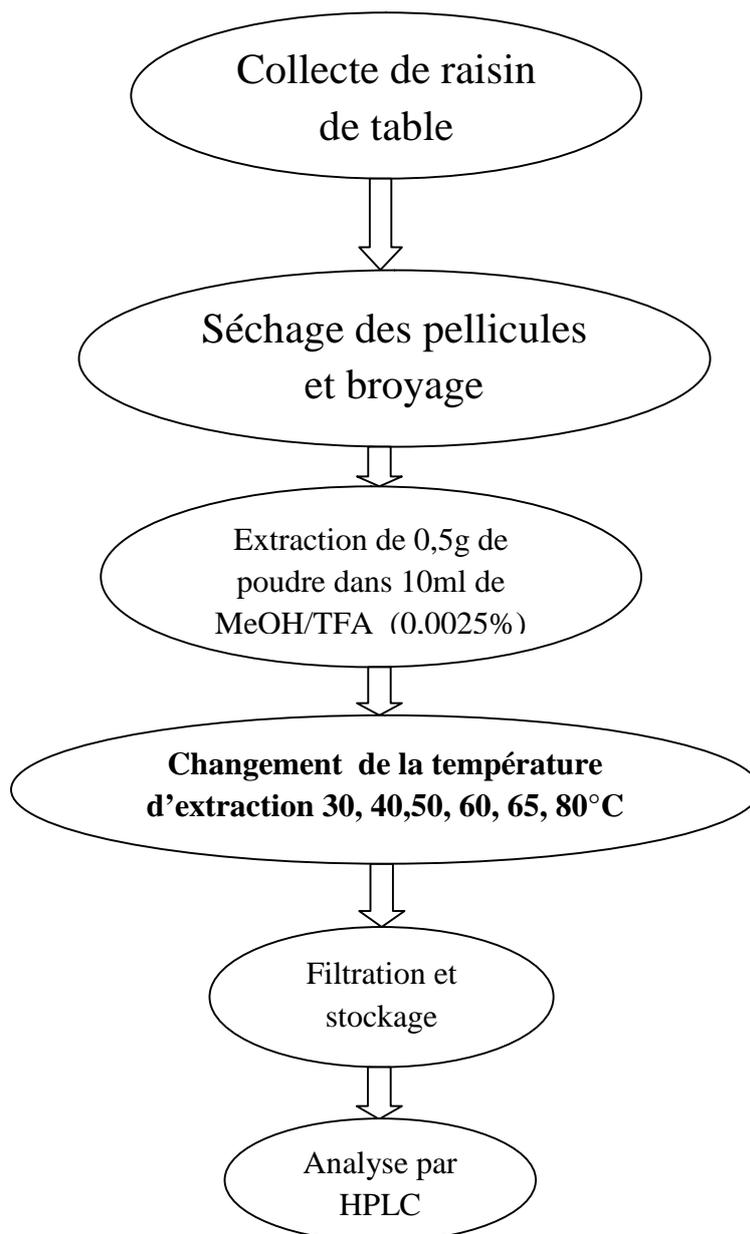


Figure (II.3) : Extraction avec variation de la température.

c) Effet du temps de macération

Le temps de macération est un paramètre très important qui influe quantitativement et qualitativement sur l'extraction. Pour éviter la dégradation des molécules ainsi que l'apparition des composés indésirables, cette partie de notre investigation se focalise sur la diminution du temps de macération. Pour cela, 0,5g de pellicule de raisin ont subi une extraction dans 10 ml de MeOH/TFA (0,0025%) pendant 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 30 et 60 minutes, respectivement.

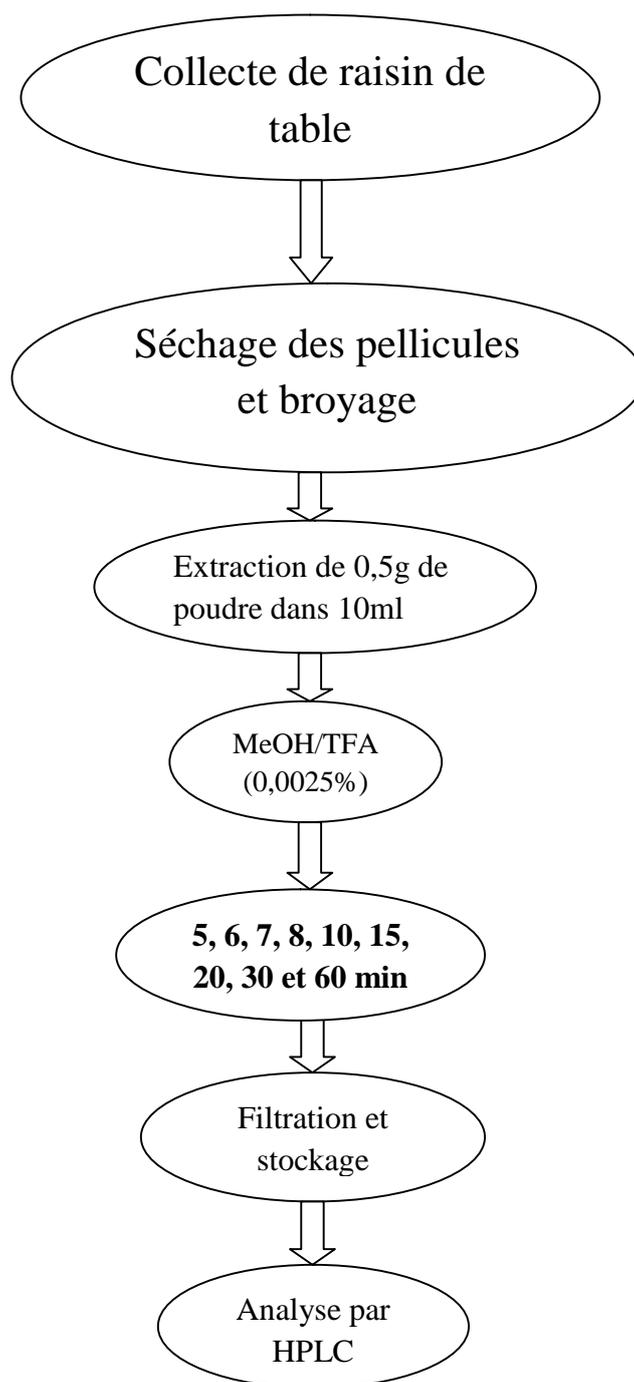


Figure (II.4): Extraction à différents intervalles de temps.

II.3.3 Analyse par RP-HPLC des stilbènes

a) Solvants utilisés

Les phases mobiles utilisées dans le dosage des stilbènes sont:

Solvant A: H₂O/ (TFA 0,0025%)

Solvant B: Méthanol.

Colonne: pour cette étude la colonne utilisée est une C₁₈, (silice greffée au radical octadécyl), c'est donc une colonne avec une phase stationnaire apolaire, les solvants étant polaires, on est donc en présence d'une RP-HPLC (reversed phase-HPLC), ou HPLC à polarité de phases inversée.

b) Injection

L'appareil HPLC **Shimadzu** est équipé d'un injecteur manuel de 20 µl de capacité. Pour le dosage des stilbènes, une solution contenant l'échantillon à analyser dans 50% MeOH/H₂O a été préparée dans des cupules spéciales, des dilutions successives ont été effectuées par la suite. Les courbes étalons ont ensuite été tracées pour chacun des standards.

c) Gradient

Comme le montre le tableau (II.1), le gradient utilisé pour l'HPLC analytique des stilbènes était: 20-50% B (0-35 min), 50-100% B (35-40 min), 100% B (40-46 min), 100-20% B (46-48 min), 20% B (48-53 min). Débit 1ml/min.

Tableau (II.1) : Gradient HPLC analytique.

Temps (min)	A%	B%	Débit (ml/min)
0	80	20	1
10	70	30	1
15	65	35	1
35	50	50	1
40	0	100	1
46	0	100	1
48	80	20	1
53	80	20	0

II.4 Analyse quantitative du cholestérol dans les aliments

II.4.1 Collection des œufs

Les jaunes d'œuf crus de six variétés de poules aléatoirement collectés, ont été mélangés et homogénéisés. Six autres œufs ont été portés à ébullition pendant 5 min et les jaunes d'œufs ont ensuite été prélevés écrasés et homogénéisés.

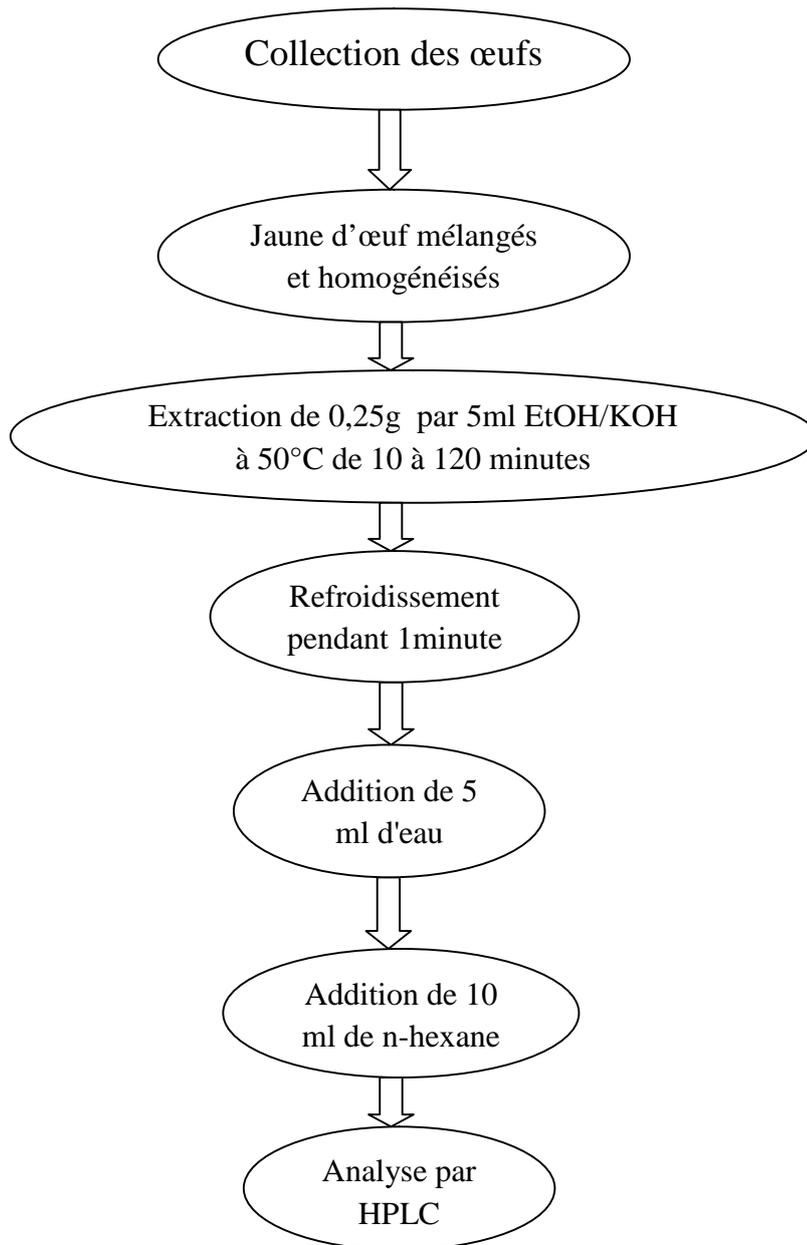


Figure (II.5): Protocole d'extraction du cholestérol du jaune d'œuf.

II.4.2 Préparation des échantillons

0,25 g de jaune d'œuf ont été soumis à l'extraction dans 5 ml d'une solution éthanolique (à 2% KOH) à 50°C (Jiang et *al.*, 1991). La durée de la saponification sur le rendement d'extraction a été examinée à plusieurs reprises en augmentant le temps de 10 minutes à 120 minutes. Ensuite, le mélange a été refroidi pendant 1 min, 5 ml d'eau distillée ont été ajoutés. La phase insaponifiable a ensuite subi deux extractions liquide-liquide avec 10 ml de n-hexane. Deux phases ont été obtenues; une phase organique (phase n-Hexane) et une phase aqueuse. La phase n-Hexane a été stockée au frais jusqu'à son utilisation (figure (II.5)).

II.4.3. Collection de lait de vache

Le lait de vache a été collecté de diverses sources de la région de Guelma. Chaque échantillon a subi une fermentation par la méthode traditionnelle connue. Un litre de chaque échantillon a été stocké dans une bouteille enfermée à l'abri de la lumière, pendant environ 24 heures sans aucun additif. Ensuite l'effet de la fermentation sur la teneur en cholestérol a été étudié.

II.4.4 Préparation des échantillons

0,2g de lait de vache fermenté a subi une saponification avec une solution étalonique (5M KOH) à 80 °C pendant 15 minutes (Fletouris *et al.*, 1998). Le processus d'extraction du cholestérol est le même que celui du jaune d'œuf.

En revanche, la solution mère du cholestérol a été préparée par dissolution de 1mg de cholestérol pur dans 1ml de n-Hexane. Des dilutions successives ont été effectuées pour tracer les courbes étalons. Les solutions à analyser ont été injectées dans la boucle. La détection du cholestérol par HPLC a été faite à 210nm.

II.4.5 Analyse par NP-HPLC du cholestérol

Les solvants utilisés dans le dosage du cholestérol sont :

Solvant A: n-Hexane.

Solvant B: 2-propanol.

Colonne: pour cette étude la colonne utilisée est une colonne de silice greffée au cyanure, c'est donc une colonne avec une phase stationnaire polaire, les solvants étant apolaires, on est donc en présence d'une NP-HPLC (Normal Phase –HPLC), ou HPLC à polarité de phase normales.

Gradient

L'élution du cholestérol a été effectuée en mode isocratique avec le n-hexane/ isopropanol (96/ 4, V/V). Le débit a été fixé à 1ml/min.

Dans les conditions expérimentales citées, la méthode proposée a été validée par la linéarité, la précision, la récupération, la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ). Les limites de détection (LOD, S / N = 3) et de quantification (LOQ, S / N = 10) étaient déterminées.

Chapitre III : Méthodes de calculs

III.1. Méthodes de calculs utilisées

La chimie assistée par ordinateur (en anglais «Computational Chemistry ») est le domaine de la chimie qui fait intervenir l'ordinateur; ses applications peuvent être de différentes natures, telles que l'élucidation et l'analyse de structures chimiques, le traitement d'informations chimiques ou encore la chimie théorique (Doucet, 1996). Les domaines de la chimie théorique sont, de même, très nombreux : chimie quantique, mécanique moléculaire, dynamique moléculaire ou encore représentation moléculaire.

La chimie quantique tient compte de la structure électronique d'un système et repose sur l'équation de Schrödinger. L'utilisation de méthodes théoriques pour l'obtention de modèles qui puissent prédire et comprendre les structures, les propriétés et les interactions moléculaires est connue sous le nom de « Modélisation Moléculaire». Celle-ci permet de fournir des informations qui ne sont pas disponibles par l'expérience et joue donc un rôle complémentaire à celui de la chimie expérimentale. Ainsi, la modélisation moléculaire peut par exemple permettre de se faire une idée précise de la structure de l'état de transition pour une réaction donnée, ce qui est difficile, voire impossible, pour la chimie expérimentale. Le nombre d'études théoriques a fortement augmenté avec le développement des outils informatiques dans les 20 dernières années: des procédures de calculs numériques ainsi que des ordinateurs toujours plus puissants ont été mis au point, rendant ainsi possible l'étude de systèmes de plus en plus compliqués, et permettant l'utilisation de techniques de calculs et de niveaux de théorie de plus en plus poussés (Rivail, 1994).

Nous présentons ici les méthodes de chimie théorique qui ont été utilisées au cours de cette thèse. Il ne s'agit pas d'une description exhaustive et il est possible de consulter de nombreux ouvrages spécialisés pour plus de détails (McWeeny et al, 1969 ; Leach, 1996).

III.1.1 L'équation de Schrödinger

On sait que l'état et toutes les propriétés observables d'un système quantique ; atome, molécule, ensemble de molécules, macromolécule ou solide sont en principe, déterminés par sa fonction d'onde Ψ . Celle-ci dépend des variables d'espace (position) et de spin de chaque particule, soit quatre paramètres par particule, et doit satisfaire à l'équation de Schrödinger (Schrödinger, 1926) :

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (\text{III-1})$$

Où E est l'énergie du système et \hat{H} est l'opérateur hamiltonien du système. ψ est la fonction d'onde du système, fonction des coordonnées des noyaux, des électrons et contient toute l'information du système, E est l'énergie totale. Les valeurs propres de \hat{H} sont les valeurs observables de cette énergie et les fonctions d'onde correspondantes sont les fonctions propres associées.

Les propriétés moléculaires qui peuvent être calculées par la résolution de l'équation de Schrödinger sont la géométrie moléculaire, les spectres de vibrations, les moments dipolaires et quadripolaires, les spectres électroniques et aussi des fonctions descriptives de la réactivité, telles que les charges atomiques et les fonctions de Fukui. Toutefois, la précision avec laquelle on peut espérer calculer ces quantités est très variable en fonction de la nature de ces propriétés. Cette équation ne peut, en effet, pas être résolue de manière exacte pour les systèmes moléculaires, et l'on doit donc effectuer un certain nombre d'approximations. L'hamiltonien pour un système à couches fermées et composé de charges ponctuelles ($2n$ électrons et N noyaux), sans prise en compte des effets relativistes, est donné par la relation:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{U} = \hat{T}_n + \hat{T}_e + \hat{U}_{nn} + \hat{U}_{ee} + \hat{U}_{ne} \quad \text{avec :} \quad \left\{ \begin{array}{l} \hat{T}_n = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{I=1}^M \frac{\Delta_I}{M_I} \\ \hat{T}_e = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^N \frac{\Delta_i}{m_e} \\ \hat{U}_{nn} = \sum_{I=1}^M \sum_{J=1}^M \frac{Z_I Z_J e^2}{4\pi\epsilon_0 R_{IJ}} \\ \hat{U}_{ee} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \\ \hat{U}_{ne} = -\sum_{I=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{Ii}} \end{array} \right. \quad \text{(III- 2)}$$

Où :

\hat{T} : L'opérateur de l'énergie cinétique.

\hat{U} : L'opérateur de l'énergie potentielle.

\hat{T}_n : L'énergie cinétique des noyaux.

T_e : L'énergie cinétique des électrons.

nn : L'énergie de répulsion entre les noyaux.

ee : L'énergie de répulsion entre les électrons.

ne : L'énergie de l'attraction entre noyaux et électrons.

est la constante de Planck universelle, m_e est la masse de l'électron, e est la charge de l'électron, M_I est la masse du noyau I, r_{iI} est la distance entre l'électron i et le noyau I, R_{IJ} est la distance entre les noyaux de l'atome I et de l'atome J dont les charges nucléaires sont respectivement Z_I et Z_J . Δ_i est le laplacien du $i^{\text{ème}}$ électron.

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \Delta_i - \frac{1}{2} \sum_{I=1}^M \frac{\Delta_I}{M_I} + \sum_{I=1}^M \sum_{J=1}^M \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{I=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_I}{r_{iI}} \quad (\text{III. 3})$$

L'équation permettant d'obtenir les états stationnaires du système, est ainsi donnée par :

$$\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \Delta_i \Psi_k + \sum_{I=1}^M \frac{\Delta_I \Psi_k}{2M_I} + \left(E_k - \sum_{I=1}^M \sum_{J=1}^M \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{I=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_I}{r_{iI}} \right) \Psi_k = 0 \quad (\text{III- 4})$$

On constate que l'équation de Schrödinger, basée sur cet opérateur hamiltonien, est difficilement applicable à des molécules polyatomiques; pour la résoudre on doit introduire des approximations telles que l'approximation de Born-Oppenheimer et l'approximation orbitalaire.

III.1.2. L'approximation de Born-Oppenheimer :

En séparant la partie électronique de la partie nucléaire dans la fonction d'onde Ψ , Born et Oppenheimer ont proposé de simplifier la résolution de l'équation (III-1). Cette approximation est basée sur le fait que les électrons bougent beaucoup plus rapidement que les noyaux, ceci étant dû à la masse beaucoup plus faible des électrons (environ 1836 fois moindre de celle du proton). Par conséquent, les électrons réagissent quasi instantanément à une modification de la position des noyaux (Born et al ; 1927).

En revanche, pour une conformation R donnée des noyaux, seule la contribution électronique $E(R)$ à l'énergie totale E est nécessaire pour connaître les propriétés du système. Cela revient donc à résoudre deux équations du type Schrödinger, l'une pour la partie

nucléaire et l'autre pour la partie électronique. La fonction d'onde du système, solution de l'équation de Schrödinger dans l'approximation de Born et Oppenheimer, peut donc s'écrire sous la forme d'un produit de deux fonctions :

$$\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \Psi_{\text{e}}(\mathbf{r}) \Psi_{\text{n}}(\mathbf{R}) \quad (\text{III-5})$$

Où $\Psi_{\text{n}}(\mathbf{R})$ est la fonction d'onde nucléaire, $\Psi_{\text{e}}(\mathbf{r})$ est la fonction d'onde électronique correspondant à un jeu de positions \mathbf{R} des noyaux figés, \mathbf{r} et \mathbf{R} étant respectivement les positions des électrons et des noyaux. En écrivant l'hamiltonien H sous la forme :

$$H = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^N \frac{1}{M_A} \nabla_{R_A}^2 + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} - \frac{1}{2} \sum_{k=1}^{2n} \nabla_k^2 + V(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (\text{III-6})$$

Où $V(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ est un potentiel dépendant de la position des électrons et des noyaux, on fait apparaître un opérateur électronique $H_{\text{e}}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ de la forme :

$$H_{\text{e}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = -\frac{1}{2} \sum_{k=1}^{2n} \nabla_k^2 + V(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (\text{III-7})$$

On peut montrer, moyennant certaines approximations, que si l'on remplace l'expression (III-5) dans l'équation de Schrödinger, on obtient :

$$H_{\text{e}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \Psi_{\text{e}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \varepsilon(\mathbf{R}) \Psi_{\text{e}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (\text{III-8})$$

La fonction d'onde $\Psi_{\text{e}}(\mathbf{r})$ est une fonction propre de l'opérateur électronique H_{e} avec la valeur propre $\varepsilon(\mathbf{R})$, pour des positions \mathbf{R} des noyaux figées. En résolvant l'équation (III-8) pour plusieurs positions successives des noyaux, on obtient alors une fonction de \mathbf{R} :

$$U(\mathbf{R}) = \varepsilon(\mathbf{R}) + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (\text{III-9})$$

$U(\mathbf{R})$ représente l'énergie Born-Oppenheimer du système en fonction des positions \mathbf{R} des noyaux immobiles.

Born et Oppenheimer ont aussi montré que le mouvement des atomes est régi par une équation de type Schrödinger où le potentiel dépend de l'énergie électronique évaluée par l'équation (III-9) :

$$H_e = -\sum_{K=1}^{2n} \frac{1}{2} \nabla_k^2 - \sum_{K=1}^{2n} \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{KA}} + \sum_{K=1}^{2n} \sum_{l>K}^{2n} \frac{1}{r_{Kl}} \quad (\text{III. 10})$$

$U(R)$ joue donc le rôle d'une énergie potentielle pour le mouvement des noyaux. L'ensemble des conformations R des atomes permet alors de construire une surface d'énergie potentielle appelée « surface de Born-Oppenheimer (BO) ». Il s'agira d'une fonction à $3N-6$ variables ($3N-5$ pour les molécules linaires) dont les minima correspondent aux géométries stables de la molécule. Au minimum de plus basse énergie correspond la géométrie à l'équilibre de la molécule. La détermination de $U(R)$ et de ses dérivées première et seconde permet de localiser des points stationnaires sur la surface de BO et, par conséquent, d'élaborer des chemins réactionnels. Elle donne aussi accès aux constantes de force des molécules et donc aux fréquences de vibrations, des propriétés telles que le moment dipolaire, la polarisabilité, etc, peuvent être calculées. Pour la résolution de la partie électronique, en considérant que le comportement des électrons n'est pratiquement pas modifié par les faibles déplacements des noyaux que l'on suppose comme étant figés dans leur position instantanée, l'hamiltonien dans l'approximation de Born-Oppenheimer se limite aux composantes électroniques seules.

$$H_e = -\sum_{K=1}^{2n} \frac{1}{2} \nabla_k^2 - \sum_{K=1}^{2n} \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{KA}} + \sum_{K=1}^{2n} \sum_{l>K}^{2n} \frac{1}{r_{Kl}} \quad (\text{III- 11})$$

Il est bien clair que le dernier terme est un opérateur biélectronique alors que les deux premiers sont monoélectroniques, ce qui pose une difficulté ultérieure pour le traitement de la fonction ψ_e .

III.1.3. Approximation orbitalaire

La fonction d'onde électronique ψ_e est une fonction des coordonnées de tous les électrons du système. Si $2n$ est le nombre d'électrons, ψ_e est une fonction à $(2n) \times 3$ variables que l'on note communément $(1, 2, \dots, 2n)$. L'approximation orbitalaire, introduite par Hartree en 1928 (Hartree, 1928), consiste à découpler les $2n$ électrons en développant la fonction $\psi_e(1, 2, \dots, 2n)$ en un produit de $2n$ fonctions monoélectroniques, de sorte que:

$$\Psi(1,2,\dots,2n) = \prod_{i=1}^{2n} \phi_i(i) \quad \text{(III- 12)}$$

où l'indice i désigne l'orbitale i .

Cette situation correspond physiquement à un modèle de particules indépendantes dans lequel chaque électron se déplace dans un champ moyen créé par les noyaux et la densité électronique moyenne des autres électrons. Cela signifie que chaque électron ressent les autres en moyenne, ce qui constitue naturellement une approximation.

La fonction d'onde n'a cependant pas de terme décrivant le spin car celui-ci est absent de l'hamiltonien électronique. Pour décrire complètement la distribution des électrons, la coordonnée de spin s doit donc être introduite, et celle-ci prendra les valeurs $+1/2$ ou $-1/2$. Le spin est une propriété intrinsèque de l'électron, de nature purement quantique, et n'a donc pas d'équivalent en mécanique classique. La fonction d'onde de spin pour le spin aligné le long de l'axe $(+)z$ sera $\chi_+(s)$ et celle pour le spin aligné le long de $(-)z$ sera $\chi_-(s)$.

La fonction d'onde électronique est donc composée d'une partie spatiale, l'orbitale, et d'une partie de spin. La fonction $F(r,s)$ est ce que l'on appelle une spin-orbitale et on l'écrit :

$$F(r,s) = c(r)h(s) \quad \text{(III- 13)}$$

Où r et s sont les coordonnées d'espace et de spin, respectivement.

Pour un système à $2n$ électrons la fonction d'onde polyélectronique la plus simple s'écrira donc sous la forme d'un produit de spin-orbitales supposées normalisées :

$$\Psi = \phi_1(1) \phi_2(2) \phi_3(3) \dots \phi_{2n}(2n) \quad \text{(III. 14)}$$

La fonction d'onde représentée par l'équation ci-dessus n'est cependant pas encore complète, car elle ne prend pas en compte l'indiscernabilité des électrons, ni le principe d'exclusion de Pauli (Pauli, 1940). Celui-ci a montré que pour les fermions (particules à spin $1/2$), une spin-orbitale doit être antisymétrique par rapport à la permutation impaire des coordonnées d'espace et de spin. En permutant deux électrons, il vient par exemple:

$$\Psi(1,2,\dots,K,\dots,2n) = - \Psi(1,K,\dots,2,\dots,2n) \quad \text{(III. 15)}$$

Une telle fonction obéit au principe d'exclusion de Pauli qui impose à deux électrons de ne pas pouvoir occuper la même spin-orbitale, ainsi qu'à l'indiscernabilité des électrons. Or,

dans la formulation de Hartree de la fonction d'onde, cela n'est pas le cas, car l'électron i occupe précisément la spin-orbitale i .

Hartree et Fock ont généralisé ce concept en montrant que le principe d'exclusion de Pauli est respecté si l'on écrit la fonction d'onde sous la forme d'un déterminant construit à partir de n spin-orbitales (Slater, 1972); on obtient alors ce qui est connu sous le nom de «déterminant de Slater» :

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_{2n}) = \frac{1}{\sqrt{2n!}} \begin{vmatrix} \phi_1(x_1) & \phi_2(x_1) \dots & \phi_{2n}(x_1) \\ \phi_1(x_2) & \phi_2(x_2) \dots & \phi_{2n}(x_2) \\ \dots & \dots & \dots \\ \phi_1(x_{2n}) & \phi_2(x_{2n}) \dots & \phi_{2n}(x_{2n}) \end{vmatrix} \quad \text{(III. 16)}$$

On constate que la forme déterminantale de la fonction d'onde respecte le principe de Pauli: l'inversion de deux électrons correspond à la permutation de deux lignes (ou de deux colonnes), ce qui a pour effet de changer le signe du déterminant. Les spin-orbitales i doivent, d'autre part, être différentes les unes des autres, car dans le cas contraire, le déterminant (-13) s'annule.

III.1.4. Méthode Hartree-Fock

Dans la méthode Hartree-Fock (Fock, 1930 ; Hartree, 1928), l'équation de Schrödinger est résolue selon le principe variationnel. On cherche les orbitales moléculaires donnant une énergie minimale du système en s'appuyant sur la condition d'extremum par résolution itérative des équations de Hartree-Fock (méthode du champ auto-cohérent ou *Self-Consistent-Field*). En appliquant l'approximation LCAO aux équations de Hartree-Fock, on exprime les orbitales moléculaires à l'aide d'une combinaison linéaire d'orbitales atomiques. On obtient ainsi les équations de Roothaan (Roothaan, 1951). Dans le formalisme restreint (RHF) on raisonne en terme d'orbitales atomiques et non en terme de spin orbitales. On travaille en couches fermées. Dans le cas du formalisme non restreint (UHF), on sépare les électrons de spin \uparrow et \downarrow et ceci conduit à un ensemble d'équations pratiquement analogues (connues sous le nom d'équations de Berthier-Pople-Nesbet (Pople et al, 1954; Berthier, 1954) à celle du formalisme RHF.

Pour décrire la méthode de Hartree-Fock, nous nous placerons dans le cas d'un système à couches fermées.

III.1.5. L'approximation CLOA

Une des méthodes permettant de résoudre les équations (III-19) consiste à développer les Orbitales Moléculaires en combinaisons linéaires de fonctions de base. Le choix de ces fonctions de base se porte généralement sur les orbitales atomiques (OA) du système et conduit à l'approximation C.L.O.A. (Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques) :

$$\Psi_i = \sum_{\nu} C_{\nu i} \Phi_{\nu} \quad (\text{III-17})$$

Dans le cadre de cette approximation, il s'agit de trouver les meilleurs coefficients C_i qui minimisent l'énergie électronique E . En substituant l'équation (III-5) dans l'expression (III-19) et en multipliant chaque membre par μ^* , on aboutit aux *équations de Roothaan* :

$$\sum_{\nu} F_{\mu\nu} C_{\nu i} = \epsilon_i \sum_{\nu} S_{\mu\nu} C_{\nu i} \quad (\text{III-18})$$

où $S_{\mu\nu}$ est un élément de la matrice de recouvrement et $F_{\mu\nu}$ un élément de la matrice de Fock qui s'écrit :

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^c + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \left[\langle \mu\sigma | \nu\lambda \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\sigma | \lambda\nu \rangle \right] \quad (\text{III-19})$$

P est un élément de la matrice densité définie par :

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{\text{occ}} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i} \quad (\text{III-20})$$

III.1.6. La théorie de la fonctionnelle de la densité

La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) se distingue des méthodes *ab initio* basées sur les équations HF car elle s'appuie sur la notion de densité électronique $\rho(r)$ et non sur celle de fonction d'onde multiélectronique. Cette approche est basée sur deux théorèmes dûs à Hohenberg et Kohn

III.1.7. Premier théorème de Hohenberg et Kohn

Le potentiel externe $V_{ext}(\vec{r})$ est, à une constante près, une fonctionnelle de $\rho(\vec{r})$; par conséquent, comme $V_{ext}(\vec{r})$ définit l'Hamiltonien du système, l'énergie de l'état fondamental est une fonctionnelle unique de $\rho(\vec{r})$.

D'après le premier théorème, il existe une et une seule fonctionnelle de la densité donnant l'énergie de l'état fondamental d'un système à N électrons. Le second théorème assure que cette fonctionnelle obéit au principe variationnel.

III.1.8. Deuxième théorème de Hohenberg et Kohn (Hohenberg *et al.*, 1964)

La fonctionnelle de $E[\rho]$ qui donne l'énergie de l'état fondamental d'un système à N électrons n'atteint son minimum que pour la densité électronique exacte correspondant à cet état. Le problème majeur de la DFT est que l'expression de cette fonctionnelle, reste inconnue. Abordons maintenant l'approche de Kohn et Sham (Kohn et al, 1965), pour obtenir E .

$$E[\rho] = T[\rho] + E_{en}[\rho] + E_{ee}[\rho] + E_{nn} \quad (\text{III. 21})$$

T étant l'énergie cinétique, E_{en} - l'énergie d'interaction électron-noyau, E_{ee} - l'énergie d'interaction électron-électron. Dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer, l'énergie d'interaction noyau-noyau E_{nn} est une constante. Nous ne la considérons plus par la suite. De plus, E_{ee} peut s'écrire comme la somme d'un terme de Coulomb J et d'un terme d'échange K . L'équation (II-17) s'écrit alors:

$$E[\rho] = T[\rho] + E_{en}[\rho] + J[\rho] + K[\rho] + E_{nn} \quad (\text{III. 22})$$

Les expressions analytiques de E_{ne} et J sont bien connues :

$$E_{ne}[\rho] = \sum_I \int \frac{Z_I \rho(\vec{r})}{|\vec{R}_I - \vec{r}|} d\vec{r} \quad (\text{III- 23})$$

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\vec{r}) \rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' \quad (\text{III- 24})$$

Tandis que les termes d'énergie cinétique T et d'échange K ne peuvent être exprimés analytiquement à ce jour. L'idée fondatrice de l'approche de Kohn et Sham est d'écrire l'énergie cinétique T en deux termes, un terme calculable exactement et un terme de correction plus petit. Le terme calculable exactement est évalué en introduisant un système fictif de N électrons indépendants ayant la même densité électronique que le système réel. L'équation de Schrödinger de ce système fictif admet comme solution exacte le déterminant de Slater des orbitales moléculaires Ψ_i . L'énergie cinétique de ce même système est donc donnée par :

$$T_s = \sum_i^N \langle \Psi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \Psi_i \rangle \quad \text{(III- 25)}$$

La différence entre T_s et T est petite. Elle est absorbée dans un terme d'échange corrélation.

En effet, une expression générale de l'énergie DFT peut être donnée par :

$$E_{\text{DFT}}[\rho] = T_s[\rho] + E_{\text{en}}[\rho] + J[\rho] + E_{\text{xc}}[\rho] \quad \text{(III- 26)}$$

En écrivant $E_{\text{DFT}} = E$, cette expression définit E_{xc} :

$$E_{\text{xc}}[\rho] = (T[\rho] + T_s[\rho]) + (E_{\text{ee}}[\rho] - J[\rho]) \quad \text{(III- 27)}$$

La première parenthèse de l'équation (II -27) peut être considérée comme l'énergie cinétique de corrélation tandis que le deuxième terme de l'équation (II -27) contient à la fois un terme d'échange et celui d'énergie potentielle de corrélation. Ce terme d'échange-corrélation concentre les approximations de la DFT.

III.2 Les fonctionnelles utilisées

Les fonctionnelles locales (LDA) qui dépendent uniquement de la densité électronique en chaque point du système et négligent toute influence de l'inhomogénéité du système. Cette approximation est correcte lorsque la densité varie suffisamment lentement. Ces fonctionnelles ne sont plus utilisées à présent de façon régulière.

- Les fonctionnelles à correction de gradient (GGA) qui introduisent dans leur expression le gradient de la densité permettent de tenir compte de l'inhomogénéité de la distribution électronique. Les fonctionnelles les plus employées sont : Becke88, PW91, P86 et LYP.

- Les fonctionnelles hybrides HF-DFT, apparues récemment, qui incluent pour l'énergie d'échange un mélange Hartree-Fock et DFT tandis que l'énergie de corrélation reste

purement DFT. Ces fonctionnelles apparaissent comme étant les plus fiables du moment. La fonctionnelle que nous avons employée dans nos calculs est la fonctionnelle hybride B3LYP couramment utilisée dans la littérature.

III.3 Choix d'une fonctionnelle

Une fonction inconnue peut être écrite comme la combinaison linéaire de fonctions connues, si et seulement si le jeu de fonctions connues utilisées constitue une base complète de l'espace dans lequel est définie cette fonction. Dans les cas des fonctions d'onde, une base complète comporte une infinité d'éléments. Une telle base est inutilisable pour calculer une fonction d'onde actuellement. Il faut nous restreindre à une base finie.

Dans ce cadre, l'information contenue dans les dimensions manquantes est inaccessible. Seules les composantes de la fonction d'onde, selon les fonctions de base, sont accessibles. Plus la base choisie est petite, plus la représentation de la fonction d'onde est pauvre. Les fonctions de base choisies influencent également la qualité de la représentation. Plus, une seule de ces fonctions est capable de décrire la fonction d'onde, plus la base est précise. Autrement dit, un choix judicieux permet de réduire le nombre de fonctions nécessaires pour atteindre une précision donnée.

Dans le cadre d'une vision générale impliquant la description d'une structure statique mais aussi l'élaboration d'un mécanisme réactionnel, il nous a semblé important de choisir une méthode alliant une reproduction précise des grandeurs structurales expérimentales du resvératrol. Une pré-étude a permis d'établir que la méthode B3LYP, associée à des bases d'orbitales atomiques de type 6-31G** et 6-311G (d,p) remplissait ces conditions. Cette méthode introduit les effets de la corrélation électronique pour un moindre coût en temps de calculs.

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1 Dosage des stilbènes dans la pellicule du raisin

IV.1.1. Stilbènes dosés dans les pellicules de raisin

a) *Trans* resvératrol :

Le resvératrol de formule brute $C_{14}H_{12}O_3$ (figure (IV.2)), est le stilbène majoritaire dans le raisin. Les divers effets thérapeutiques de cette molécule ont été discutés dans le chapitre 1. Son point de fusion est de (258-260 °C).

b) *Trans* picéide (polydatin):

Formule brute : $C_{20}H_{22}O_8$ (5-4'-dihydroxystilbène-3-beta-D-glucopyranoside).

Masse moléculaire = 390 g/mol.

Point de fusion : 223-226°C, $[\alpha]_D = -55^\circ$ (c =1, acétone).

Le picéide, glucoside du resvératrol (figure (IV.4)), a été trouvé dans les suspensions cellulaires de vigne par Waffo-Tueguo *et al.* (2001). Concernant ses activités biologiques, il a été reporté comme anti-inflammatoire mais à des concentrations de 1000 μmol (Kimura *et al.*, 2000). Le picéide possède un effet inhibiteur de la prolifération de tumeurs de poumons et des métastases chez la souris à 1000 μmol (Uldrich, 2005). De même, le picéide a la propriété d'inhiber la différenciation des lignées cellulaires endothéliales (HUVECs) et donc l'angiogénèse (Néoformation de vaisseaux capillaires, dans le cas d'une tumeur, elle est induite directement ou indirectement par les cellules tumorales) pour des concentrations de l'ordre de 100 à 1000 μMol (Kimura, 1985). Ces auteurs suggèrent que les effets, anti-tumoral et anti- métastatique du picéide pourraient être liés à l'inhibition de la synthèse de l'ADN dans les cellules cancéreuses et à l'inhibition de l'angiogénèse des lignées HUVECs (Kimura, 2005).

c) *Trans* -viniférine :

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$.

Poids moléculaire : 454 g/mol.

SM (ESI) (m/z): 453.7 [M-H].

Pouvoir rotatoire, $[\alpha]_D : +41,9^\circ$.

Ce composé (figure (IV.6)), a pour la première fois été isolé à partir de la vigne *Vitis vinifera* en 1977 par P. Langcake (Langcake *et al.*, 1977). Il a ensuite été isolé de la vigne par W. Li en 1996 (Li, 1996) et de *Gnetum parvifolium* en 1992 par M. Lin (Lin, 1992). Ce stilbène dimérique est produit par les processus d'oxydation du resvératrol. La viniférine est aussi produite par la vigne en réponse à une attaque fongique (Langcake, 1981). La

viniférine a non seulement une meilleure activité antifongique que le resvératrol mais également de meilleurs pouvoirs antioxydants (Baderschneider *et al.*, 2000; Bala *et al.*, 2000).

Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *Vitis coignetiae* (Vitaceae) guidé par l'activité hépato-protectrice a conduit à l'isolement de l' -viniférine comme principe actif (Oshima, 1995). Selon Piver *et al.* (2003), la *trans* -viniférine a montré des effets inhibiteurs des enzymes des cytochromes P450 humains impliqués dans la bioactivation de nombreux carcinogènes. La *trans* -viniférine, possède une activité antioxydante (Privat *et al.* 2002) et anti-hépatotoxique (Langcake *et al.*, 1976).

IV.1.2. Données chromatographiques des standards

Les figures (IV.1, IV.3 et IV.5) représentent les courbes étalons des différents composés purs dosés et les figures (IV.2, IV.4 et IV.6) représentent les chromatogrammes HPLC des mêmes composés. Les tableaux (IV.1- IV.3) regroupent les données à partir desquelles sont construites les courbes d'étalonnage.

IV.1.2.1. Courbes étalons, temps de rétention et maximum d'absorption

a-Trans resvératrol :

Tableau (IV.1): Données de l'HPLC analytique du *trans* resvératrol.

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Écart type	µg injectés
	1	2	3			
2.5	102	102,2	102,1	102,1	0,1	0,125
5	204	204,4	204,2	204,2	0,2	0,25
10	408	408,8	408,4	408,4	0,3	0,5
15	608	608,4	608,5	608,3	0,3	0,75
20	812,1	812,2	812	812,1	0,1	1

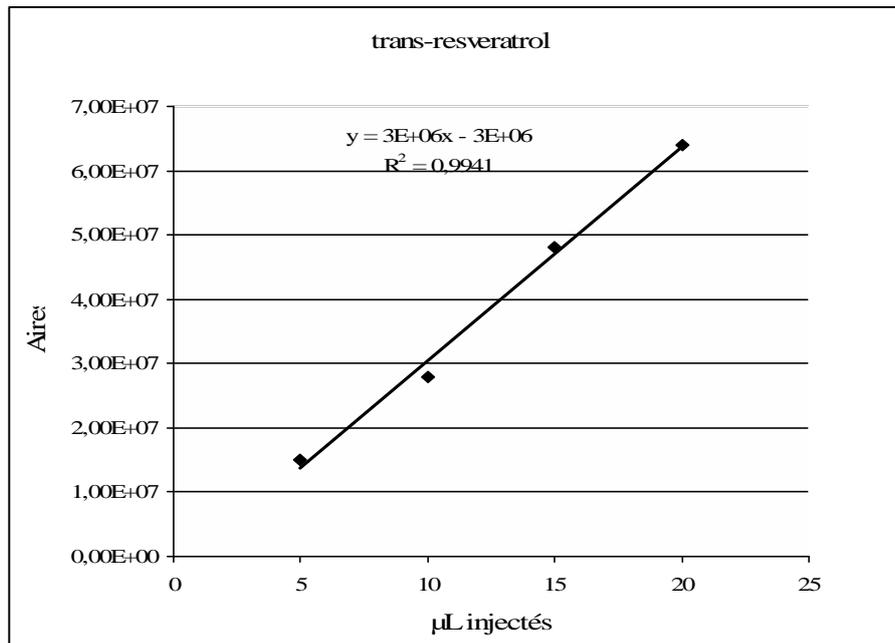


Figure (IV.2): Courbe étalon du resvératrol.

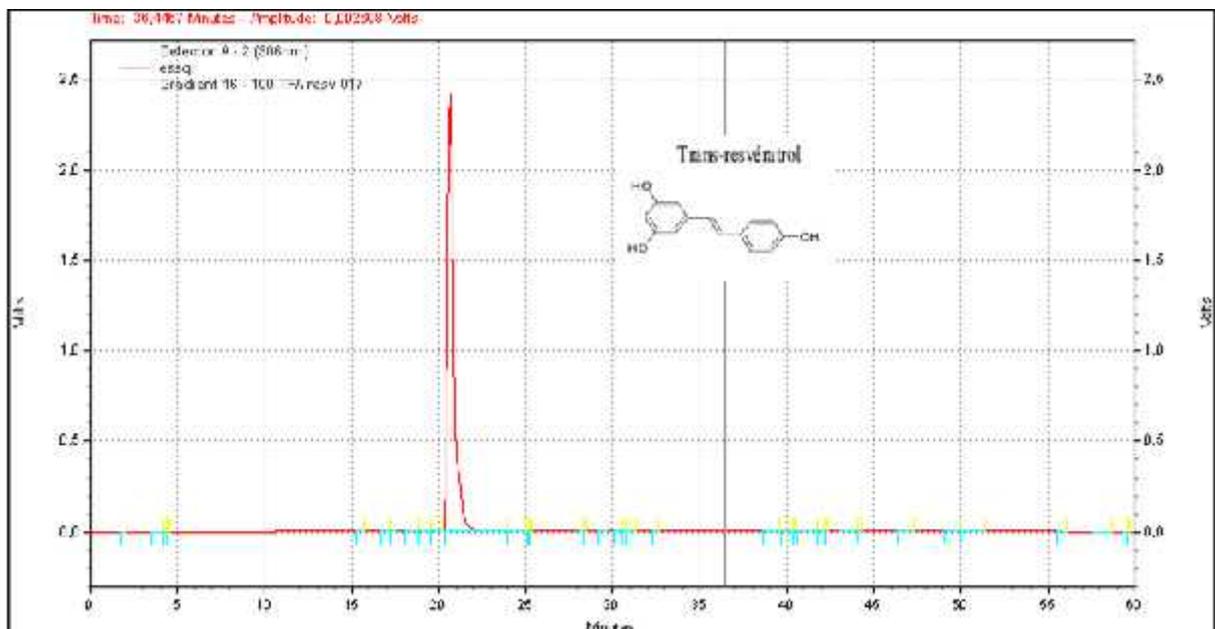


Figure (IV.2): Chromatogramme HPLC du resvératrol pur, Tr: 21min, λ_{max} : 306nm.

b- Trans picéide :

Tableau (IV.2): Données de l'HPLC analytique du *trans* picéide.

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Ecart type	µg injectés
	1	2	3			
2,5	127	128	129,1	128	1,1	0,125
5	256,4	256,9	257	256,8	0,3	0,25
10	520	521	522	521,0	0,8	0,5
15	770	771	772	771,0	1,0	0,75
20	1040	1041	1042	1041,0	1,0	1

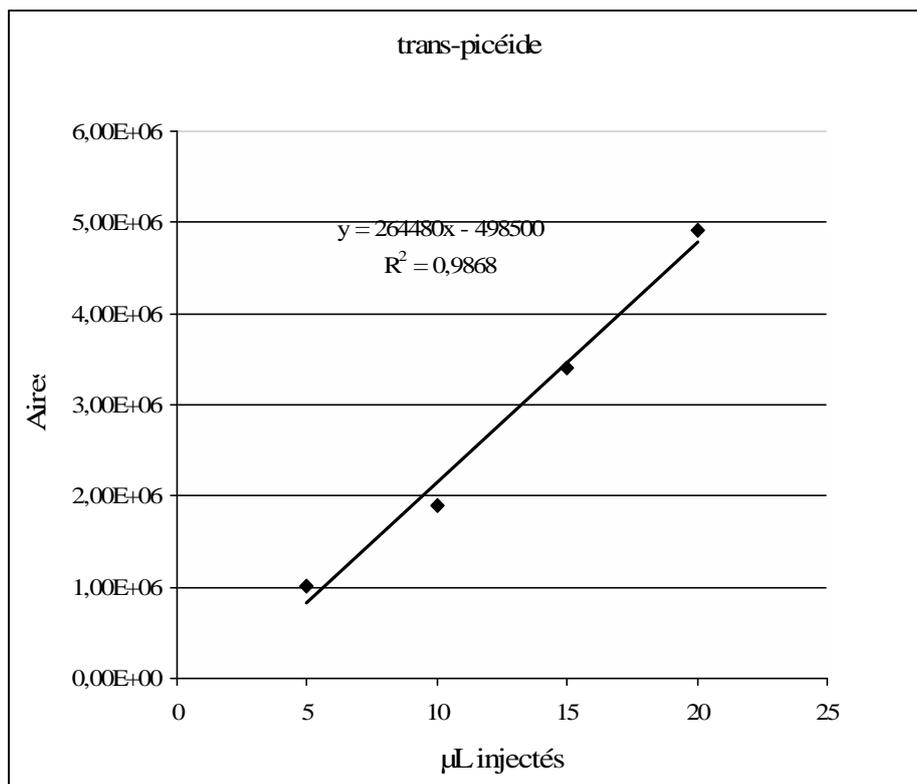


Figure (IV.3): Courbe étalon du picéide.

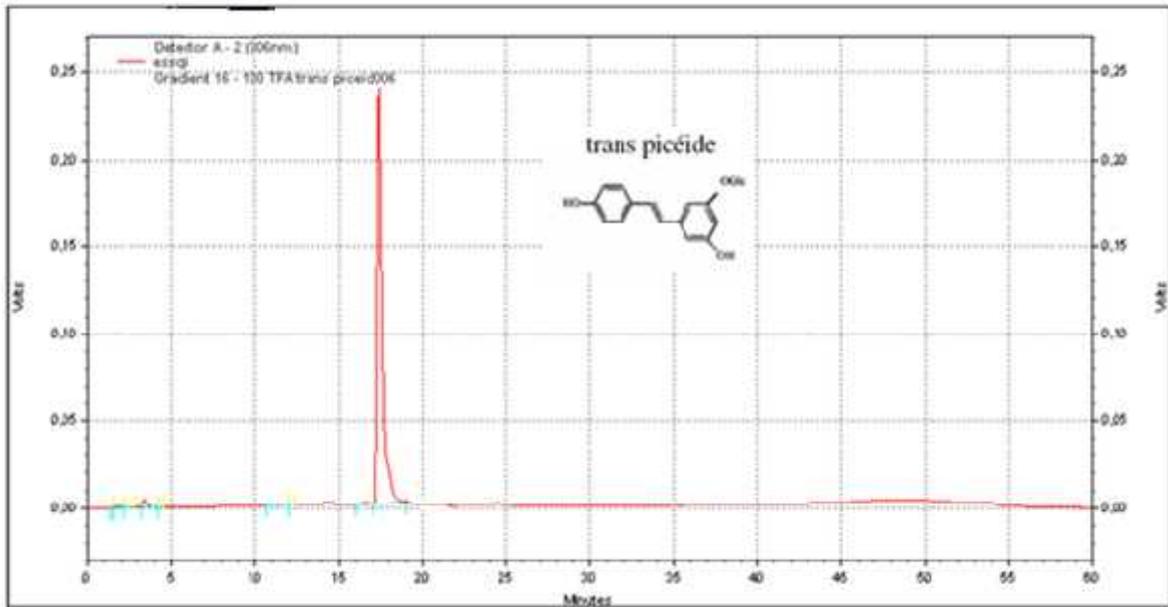


Figure (IV.4): Chromatogramme HPLC du trans picéide, Tr: 17 min, λ_{max} : 306nm.

c- *Trans* -viniférine :

Tableau (IV.3): Données de l'HPLC analytique de la *trans* - viniférine.

Concentrations $\mu\text{g/ml}$	Aires			Moyenne	Écart type	μg injectés
	1	2	3			
2,5	127	128	129,1	128	1,1	0,125
5	256,4	256,9	257	256,8	0,3	0,25
10	520	521	522	521,0	0,8	0,5
15	770	771	772	771,0	1,0	0,75
20	1040	1041	1042	1041,0	1,0	1

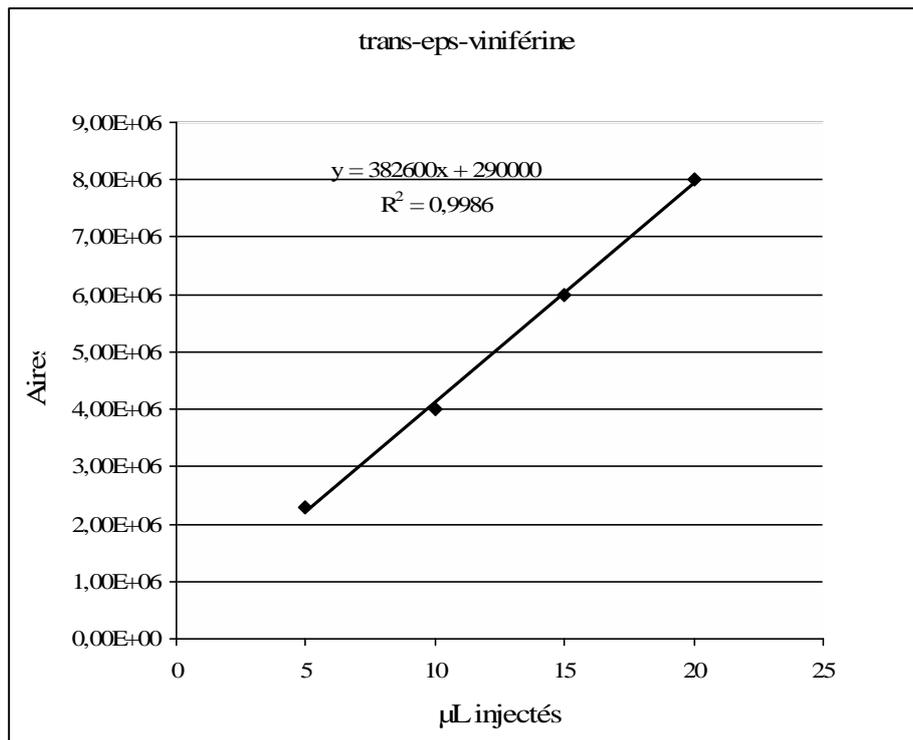


Figure (IV.5): Courbe étalon de la trans ε-viniférine.

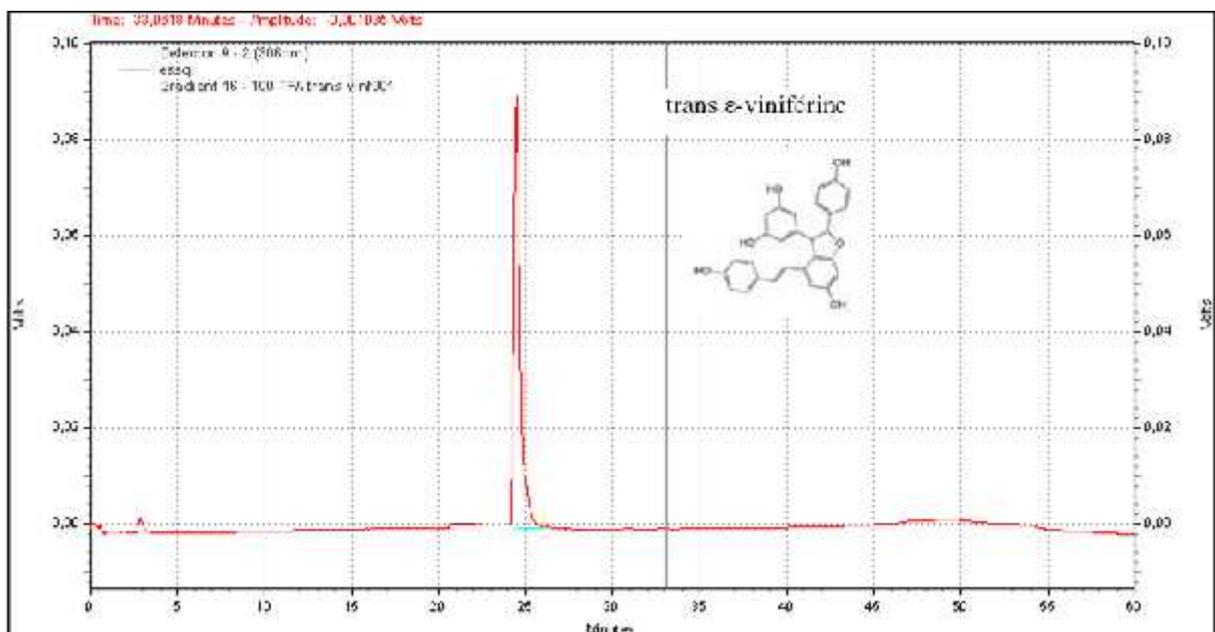


Figure (IV.6): Chromatogramme HPLC de la trans ε-viniférine, Tr : 24min, λ_{max} : 306nm.

IV.1.3 Concentration des stilbènes dans diverses variétés de raisin

Les courbes d'étalonnage étaient linéaires et un facteur de régression $R^2 > 0,98$ a été obtenu pour toutes les solutions des composés standards. L'analyse quantitative des stilbènes a été accomplie par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-visible. La ligne de base pour tous les échantillons était linéaire et la séparation et la résolution des pics qui nous intéressaient étaient acceptables.

Nous représentons ci-dessous les chromatogrammes HPLC des diverses variétés de raisin :

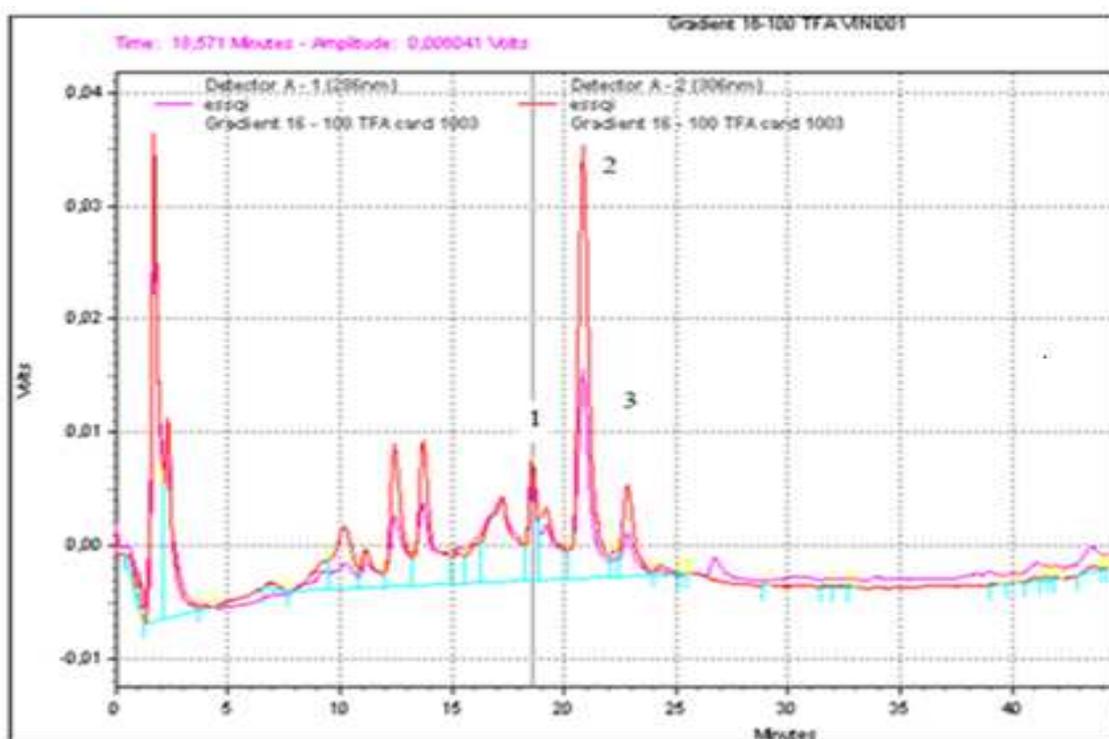


Figure (IV.7): Chromatogramme HPLC du Cardinal; 1: *trans* picéide, 2: resvératrol, *trans* - viniférin.

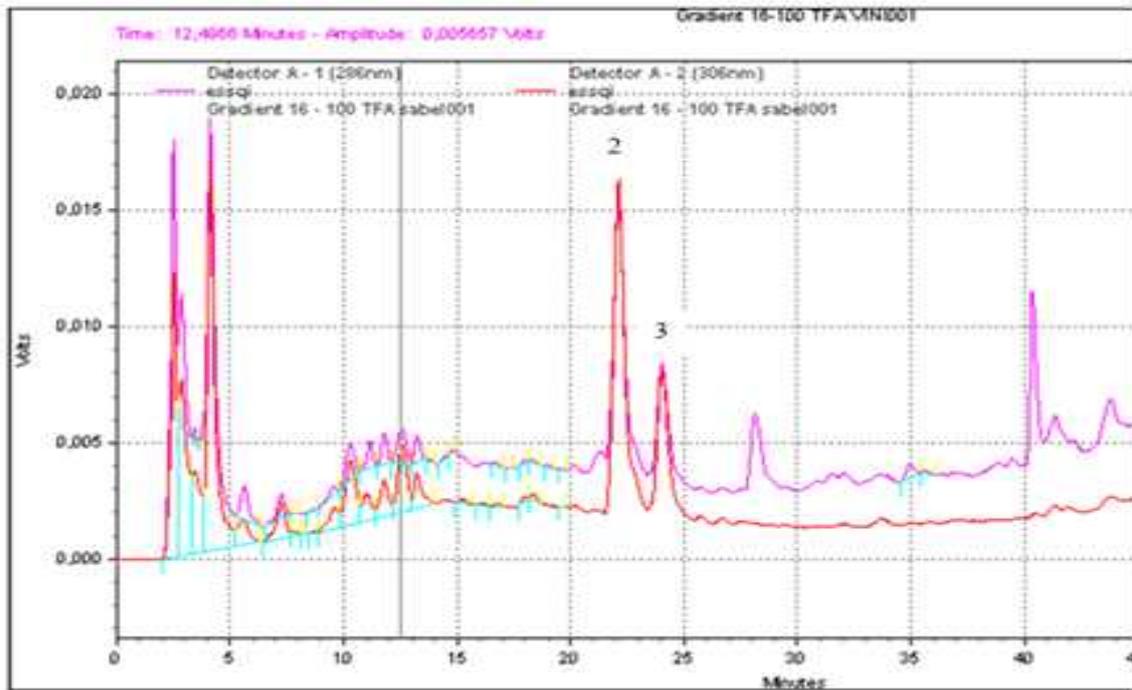


Figure (IV. 8): Chromatogramme HPLC de la variété Sabel; 2: resvératrol, 3: *trans* - viniférine.

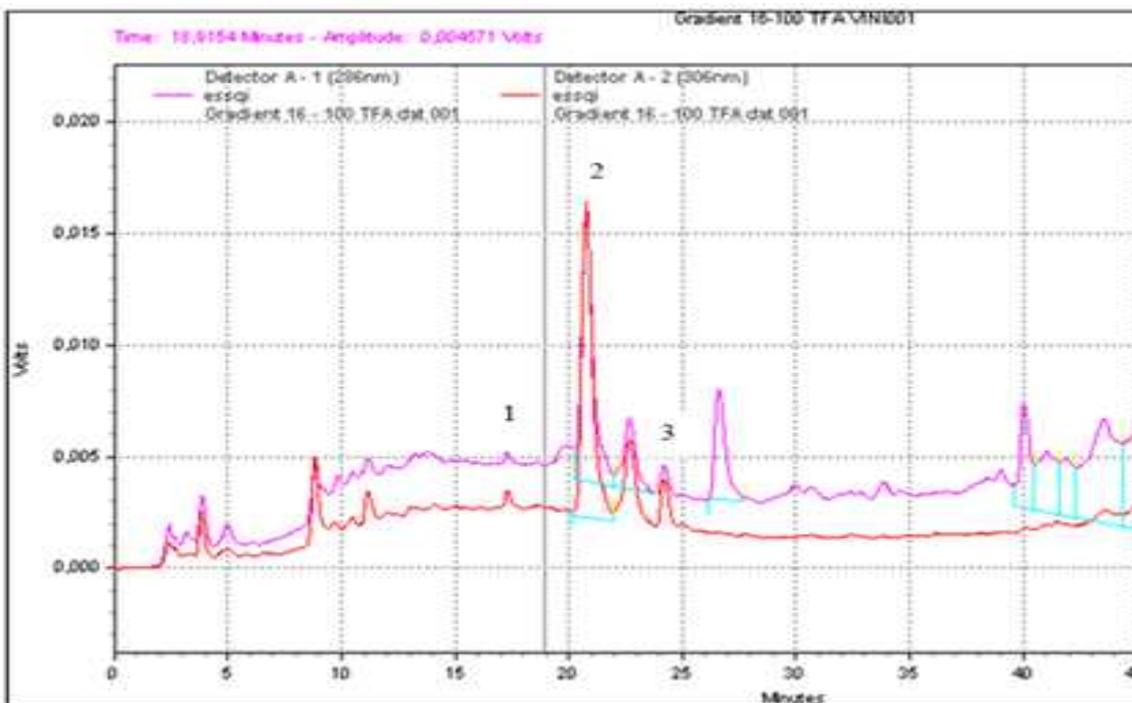


Figure (IV. 9): Chromatogramme HPLC du Dattier; 1: *trans* picéide, 2 : resvératrol, 3: *trans* - viniférine.

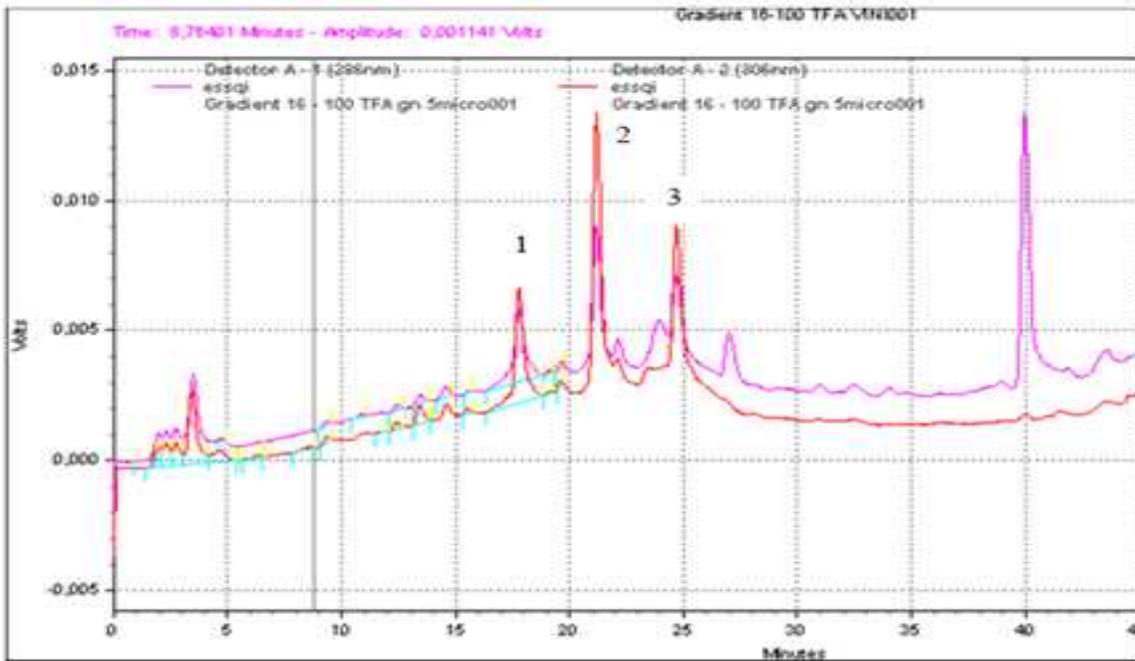


Figure (IV. 10): Chromatogramme HPLC du Gros noir; 1: *trans* picéide, 2: resvératrol, 3: *trans* -viniférine.

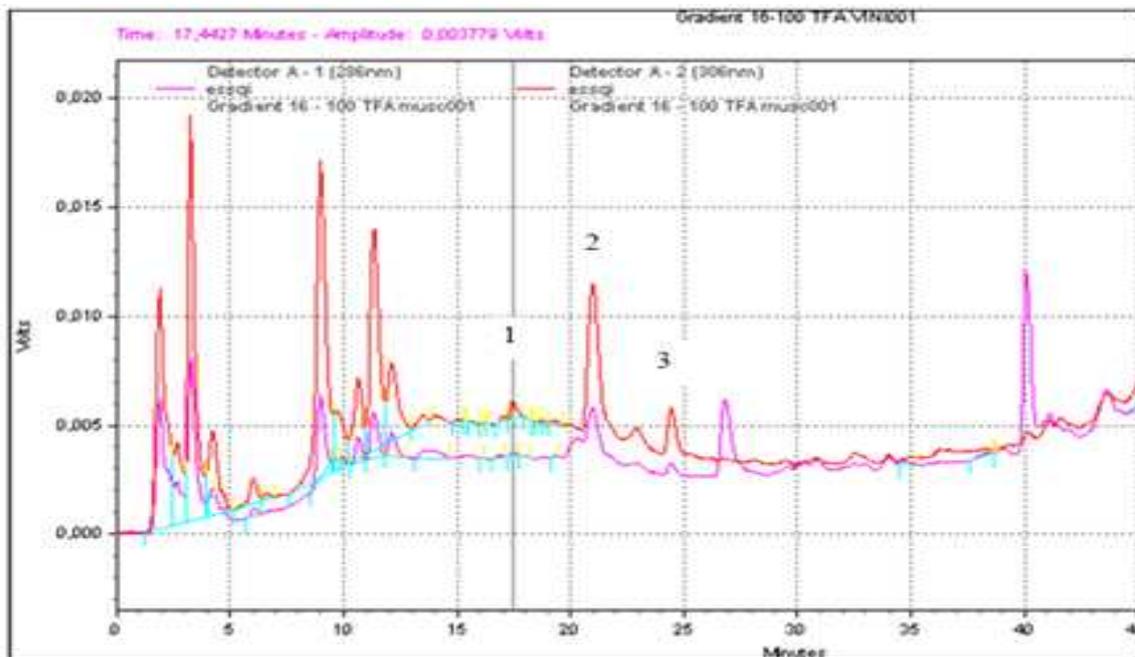


Figure (IV. 11): Chromatogramme HPLC du Muscat; 1: *trans* picéide, 2: resvératrol, 3: *trans* -viniférine.

Tableau (IV.4): Concentrations des stilbènes calculées en mg/(Kg de matière sèche) pour les variétés étudiées.

Variété	<i>Trans</i> resvératrol	<i>Trans</i> -viniférine	<i>Trans</i> picéide	Stilbènes Totaux ^a
Gros noir	1,2113	0,4121	1,4321	3,0555
Cardinal	1,5012	0,4812	0,69	2,6724
Muscat	1,2812	ND	0,597	1,8782
Muscat <i>bis</i>	1,2823	0,4812	ND	1,7635
Sabel	1,3894	0,6987	ND	2,0881
Dattier	1,4821	ND	ND	1,4821

ND : non détecté.

^a : Somme des concentrations en stilbènes de chaque composé.

Les valeurs calculées sont une moyenne de trois essais pour chaque même variété.

IV.1.4 Discussions

IV.1.4.1 Teneurs des stilbènes

Les concentrations des composés dans les divers échantillons de raisin étudiés (tableau (IV.4) sont calculées à partir des aires des pics des chromatogrammes de l'HPLC analytique (figures (IV.7- IV.11)).

Comme il est montré dans le tableau (IV.4), certains composés n'ont pas été détectés dans quelques cépages de raisin. Le resvératrol est le composant stilbénique majoritaire dans la pellicule du raisin. La *trans* -viniférine est présente dans six variétés de raisins analysées à des concentrations importantes, et elle est absente chez le Muscat et le Dattier. La variété Sabel contient la quantité la plus importante de la *trans* -viniférine (0,6987 mg/Kg), suivie du Cardinal, Muscat bis (0,4812 mg/Kg) et Gros noir (0,4121 mg/Kg). Le *trans* picéide est présent dans trois variétés, Gros noir (1,4321 mg/Kg), Cardinal (0,69mg/Kg) et Muscat (0,597mg/Kg).

La concentration moyenne du resvératrol était de 1,3516 mg/Kg, cette valeur se situe dans l'intervalle reportée par Esna-Ashari *et al.* (2008) où il a été constaté que 41 sur les 147 variétés étudiées contenaient des teneurs importantes de resvératrol et qui variaient de 0,98 à 6,25 mg/Kg.

Selon Romero-Perez *et al.* (1999), le resvératrol contenu dans le jus de raisin rouge varie de 0,010 à 1,090 mg/Kg. Jeandet *et al.* (1991) ont constaté que dans le raisin, le resvératrol est synthétisé principalement par la peau (5-7 mg/Kg). De faibles concentrations ont été trouvées dans les pépins (1 mg/Kg) et la pulpe (moins de 0,1 mg/Kg). Les teneurs du resvératrol dans la pellicule du raisin rouge et blanc varient de 11,1 à 123,0 mg/kg de matière sèche (Kammerer *et al.* 2004).

Le *trans* picéide était présent dans quatre variétés, seulement. La concentration moyenne en picéide était de 0,8578 mg/Kg avec une valeur maximale pour le Gros noir de 1,4321 mg/Kg, La valeur minimale étant de 0,597 mg/Kg, détectée dans le Muscat. Dans la littérature, 72,19 mg/Kg de ce composé ont été détectés dans la variété Castelao (Espagne) (Sun *et al.* 2005).

La *trans* -viniférine a été détectée dans six variétés, avec une moyenne de 0,5221 mg/Kg. Dans cette étude, ce composé a été détecté et dosé pour la première fois dans le raisin. La valeur maximale était de 0,698 mg/Kg dans la variété Sabel.

IV.1.4.2 Effet de l'ajout du TFA sur la rétention des composés

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'ajout du TFA (acide Trifluoro Acétique) sur la résolution. Pour cela, des injections ont été réalisées avec et sans TFA, les résultats ont montré que le TFA peut totalement modifier les ordres de rétention et améliorer la sélectivité d'un gradient. Le resvératrol sort à 21 minutes avec l'addition de 0.0025% de TFA, et à 54 minutes sans TFA.

Nous avons remarqué aussi que l'augmentation de la taille des molécules (du resvératrol à la *trans* -viniférine) augmente l'hydrophobicité du soluté, il en résulte un volume (temps) de rétention important. Ceci indique que le volume de Van der Waals est une propriété importante de l'optimisation de la séparation.

IV.1.4.3 Explication des différences des teneurs de stilbènes entre les variétés noires et blanches de raisin

L'analyse quantitative des stilbenes dans le raisin a montré que les variétés noires ou rouges contiennent un taux stilbénique plus élevé que les variétés blanches. Ce résultat est en parfait accord avec l'étude effectuée au sein de notre équipe de recherche sur huit variétés algériennes de *Ficus carica* L. où les variétés noires ont montré un taux de coumarines plus important que les variétés blanches (Bouakkaz-Rouaiguia *et al.*, 2013). Plusieurs études ont montré que les variétés rouges ou noires de fruits, en d'autres termes, celles qui contiennent des anthocyanes renferment un taux plus élevé de polyphénols que

les variétés non colorées. Comme il a été mentionné dans le chapitre I, les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense des plantes contre les agressions extérieures telles que les stress oxydants, irradiations, pathogènes... La formation de radicaux libres est l'une des conséquences de ce stress. Les plantes ont la capacité de piéger ces radicaux par divers mécanismes, le processus le plus connu est le HAT. Le raisin est une source très importante de polyphénols, riches en groupements hydroxyyles. Les groupements OH subissent une coupure homolytique et libèrent un radical H• pour piéger un radical libre. En parallèle, les groupements OH entrent en compétition au sein de ce processus. Les résultats du tableau (IV.4) ont montré que la variété noire riche en anthocyanes contient un taux stilbénique plus élevé que les variétés blanches.

Nous avons calculé les BDEs des stilbènes dosés dans la pellicule de baie de raisin et les anthocyanes généralement trouvés dans les variétés noires et rouges de raisin (Decendit et al., 2013). Comme le montre les tableaux (IV.5 et IV.6), les groupements hydroxyyles en positions 3, 4' et 5' dans les anthocyanes entrent en compétition avec la position 4' et 4-OH qui sont les pharmacophores du resvératrol, du picéide et de l' -viniférine.

Tableau (IV.5): Valeurs des BDEs du resvératrol, du picéide et de cinq anthocyanes.

Composé	BDE					
	3-OH	5-OH	7-OH	3'-OH	4'-OH	5'-OH
Stilbènes						
Resvératrol	82,87	-	-	-	78,66	82,87
Picéide	84,56	-	-	-	78,04	84,56
Anthocyanes						
Cyanidine	78,81	82,57	84,49	83,96	75,42	79,77
Delphinidine	78,39	82,50	84,49	83,96	75,59	79,77
Malividine	77,37	81,94	83,42	-	77,16	-
Peonidine	78,27	82,25	84,07	-	79,41	-
Petunidine	77,77	82,13	83,76	-	77,39	78,77

Tableau (IV.6): Valeurs des BDEs de l' -viniférine.

	BDE				
	4-OH	2-OH	3-OH	3'-OH	1-OH
-viniférine	78,39	82,58	82,84	82,84	82,76

Les valeurs élevées des BDEs des stilbènes ainsi que le nombre important des groupes OH dans les anthocyanes indiquent que ces derniers ont tendance à piéger les radicaux libres plus rapidement que les stilbènes. Donc, on suppose que l'attaque radicalaire dans les variétés noires et rouges du raisin serait effectuée dans un premier stade, avec les anthocyanes. Cependant, dans les variétés blanches qui ne contiennent pas d'anthocyanes (Ivanova *et al.*, 2013), le piégeage des radicaux libres serait réalisé premièrement avec les stilbènes, ce qui diminue leur concentration dans ces variétés, ce qui n'est pas le cas des variétés noires où les stilbènes sont économisés aux dépends des anthocyanes. Cette vision nous permet de mieux comprendre la disparité dans les teneurs des métabolites secondaires en temps qu'antioxydants. La chimie computationnelle peut donc fournir des informations sur les métabolites secondaires.

IV.2 Dosage du cholestérol dans le jaune d'œuf et le lait de vache

IV.2.1 Saponification et extraction

Pour évaluer le taux de cholestérol dans les aliments, l'étape de préparation des échantillons ou le prétraitement des fractions lipidiques a fait l'objet de plusieurs recherches (Bragagnolo *et al.*, 2003). Ces investigations reposent pratiquement sur deux méthodes principales :

➤ La première consiste en l'extraction du produit par des solvants appropriés, l'extrait subit ensuite, une saponification. La fraction insaponifiable est soumise à la séparation.

➤ La deuxième consiste en la saponification directe de l'échantillon puis l'extraction de la phase insaponifiable par solvant (Cayuela *et al.*, 2003; Ryyänen *et al.*, 2004).

Bragagnolo *et al.* (2003) ainsi que Van Elswyk *et al.* (1991) ont montré que la teneur du cholestérol obtenue par la saponification directe des produits était plus élevée que celle obtenue par la saponification des extraits lipidiques. Cependant Bitman *et al.* (1980) ; Fenton *et al.* (1991) ; Maurice *et al.* (1994) ont trouvé les mêmes résultats en utilisant les deux méthodes.

Dans cette partie, la saponification directe des échantillons a été utilisée pour éviter les dégradations et les oxydations que le produit pourrait subir (Cayuela *et al.*, 2003).

IV.2.2 Effet du temps de saponification sur le rendement d'extraction

Le temps est un paramètre très important pour une évaluation précise de la capacité de saponification. Jiang *et al.* (1991) ont reporté que la durée de saponification était de 60 minutes, alors que Bragagnolo *et al.* (2003) ont effectué ce processus en 120 minutes. Dans notre cas, et comme le montre la figure (IV.12), l'effet de la durée de saponification sur le rendement d'extraction a été examiné en augmentant le temps de 10 à 120 minutes. Le rendement d'extraction augmente avec le temps jusqu'à la centième minute, puis il reste stationnaire jusqu'à 120 minutes (figure (IV.12)). C'est la raison pour laquelle, on a réalisé la saponification de tous les échantillons pendant 100 minutes.

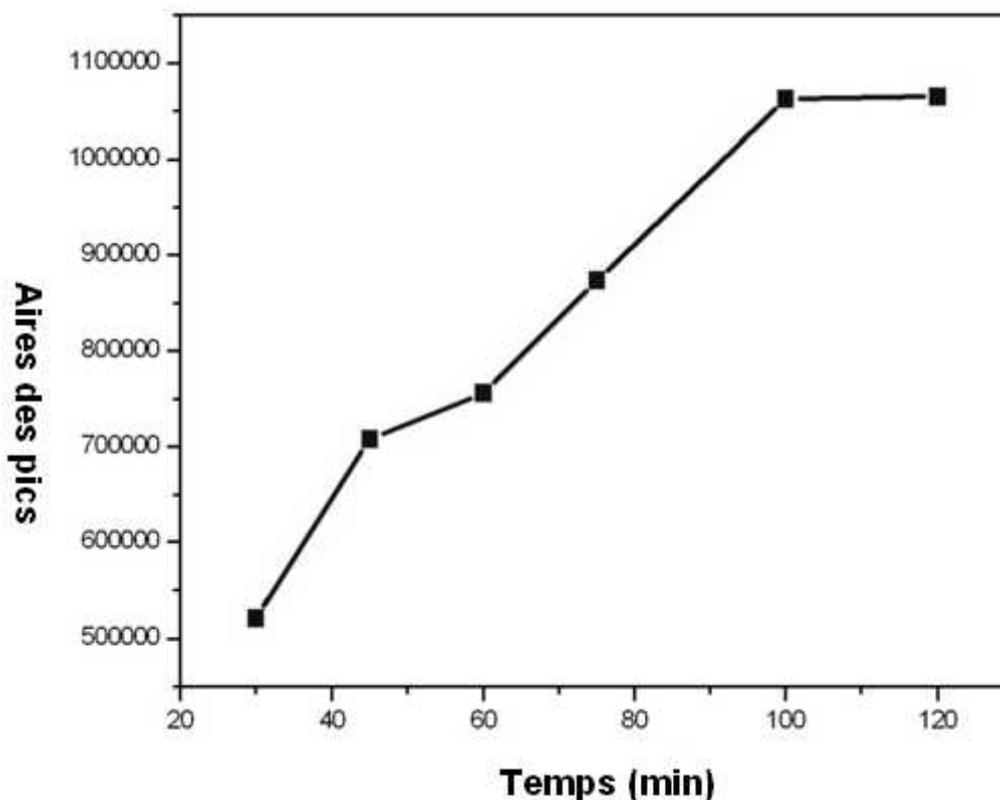


Figure (IV.12): Effet de la durée de saponification sur le rendement d'extraction.

Les solutions mères du cholestérol standard ont été préparées dans le n-hexane (1,0 mg / ml). Les courbes d'étalonnage ont été obtenues à l'aide des analyses de régression en triplicata, en utilisant quatre différentes concentrations de solutions standards.

Dans ce travail, la capacité de récupération (R) de la méthode d'extraction utilisée a été évaluée. Les échantillons du jaune d'œuf ont été dopés à quatre reprises, avec 1,0 mg de cholestérol standard avant la saponification. La capacité de récupération a été calculée à partir de l'équation :

$$R = 100 \times (SS - NS) / Cs \quad (IV .1)$$

Où:

SS : est la valeur obtenue avec dopage

NS : est la valeur obtenue sans dopage

Cs : est la quantité du cholestérol pur ajoutée.

Comme la montre le tableau (IV.7), la moyenne des valeurs de R obtenue pour le cholestérol était de 98,2%, cette valeur était légèrement inférieure à celle obtenue par

Bragagnolo *et al.*, (2003) (98,5%), mais plus élevée que celle reportée par Daneshfar *et al.*, (2009) (96%).

Les courbes d'étalonnage étaient linéaires avec un facteur de régression $R^2 > 0,99$. Le dosage du cholestérol a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-visible. La ligne de base pour tous les échantillons était linéaire et la séparation et la résolution des pics qui nous intéressaient étaient excellentes.

Les limites de détection (LOD, $S / N = 3$) et de quantification (LOQ, $S / N = 10$) étaient de $1 \mu\text{g/ml}$ et $3 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Dans la fraction lipidique insaponifiable, le cholestérol a été identifié par la comparaison de son temps de rétention et son spectre d'absorption UV à ceux du standard correspondant.

A cet effet, l'étalon de référence a été injecté à la fois individuellement et en mélange avec les échantillons. Les chromatogrammes typiques du cholestérol et des extraits de jaune d'œuf sont présentés dans les figures (IV.13 et IV.14).

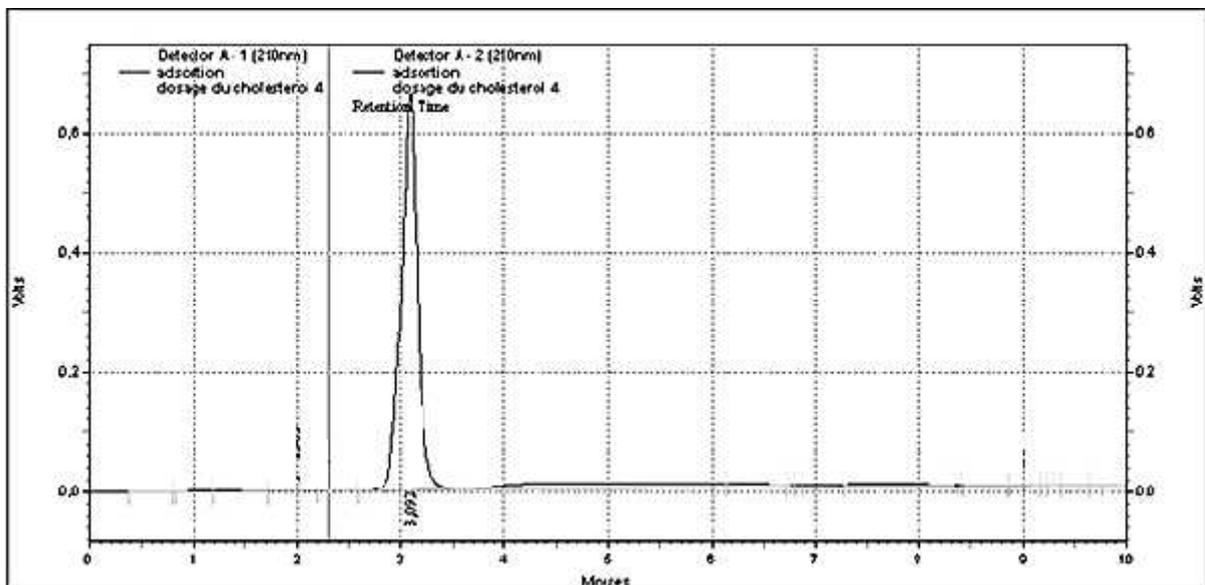


Figure (IV.13): Chromatogramme du cholestérol pur à 210 nm, $T_r = 3,09$ minutes.

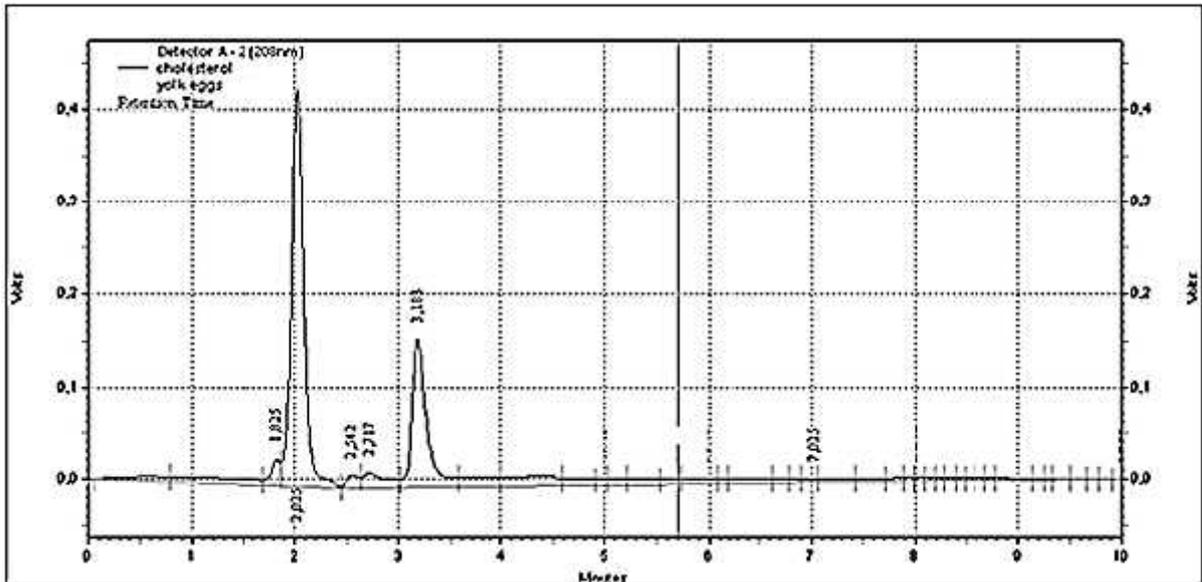


Figure (IV.14): Chromatogramme du jaune d'œuf à 210 nm, Tr=3,10 minutes.

IV.2.3 Validation de la méthode

Comme il a déjà été mentionné, la linéarité de la courbe d'étalonnage a été exprimée en termes de coefficient de régression ($R^2 = 0,996$). Dans l'intervalle de concentration de 0,06 – 0,25 (mg/ml), la teneur en cholestérol peut être déterminée par l'équation de régression :

$$Y = 49261x - 17142.$$

Où Y : Aire de surface du pic.

X : Concentration en cholestérol.

IV.2.4 Teneur en cholestérol

Avec l'utilisation de la saponification directe des jaunes d'œuf, les teneurs en cholestérol de la poule autochtone et brune, de la dinde, de l'oie et de la caille sont présentées dans le tableau (IV.7).

Tableau (IV.7): Teneur en cholestérol (mg/g) du jaune d'œuf de poules, dinde, oie et caille.

Source	Taux de cholestérol (mg/g)	Capacité de récupération ^a (%)	RSD %
		Poule Autochtone	
Œuf marron	14.25±0.33	98.5	2.77
Œuf blanc	13.39 ± 0.24	98.3	4.55
		poule de poulailler	
Œuf marron foncé	12.35±0.24	97.6	2.82
Œuf marron	11.18±0.38	98.6	1.91
Œuf blanc	11.75±0.21	98.2	3.58
		Dinde	
	11.48 ± 0.75	98.0	1.49
		Oie	
	9.03 ± 0.36	97.9	1.02
		Caille	
	13.25 ± 0.20	98.1	0.53

^a: 1mg de cholestérol ajouté.

Comme le montre le tableau (IV.7), les teneurs du cholestérol dans le jaune d'œuf de deux variétés autochtones algériennes sont (13,39 et 14,25 mg/g) légèrement supérieures à celle obtenue pour le jaune d'œuf de la variété marron. Ce résultat est en accord avec celui trouvée par d'autres auteurs (Tableau (IV.8)).

Tableau (IV.8): Comparaison des teneurs en cholestérol (mg/g) dans les œufs des races de poules autochtones de différents pays.

Autochtone	origine	Système d'élevage	Age (semaines)	Cholestérol content (mg/g jaune d'œuf)	Référence
Villafranquina	Espagne	Cages	30	14,5	(Campo <i>et al.</i> 1995)
Buffprat	Espagne	Cages	30	14,6	
Vasca	Espagne	Cages	30	19,1	
Castellana	Espagne	Cages	30	15,7	
Denizli	Turquie	Cages	44	13,2	(Onbas_ilar <i>et al.</i> 2001)
Hrvatica	Croatie	Libre	20- 35	12,6	Mikec <i>et al.</i> 2007)
Araucana	Amérique du Sud	Libre	pas connue	14,1	(Millet <i>et al.</i> 2006)
Poule Styrienne	Slovénie	Cages	35-65	13,1	(Sim i <i>et al.</i> 2009)
Poule Styrienne	Slovénie	Libre	pas connue	13,6	(Sim i <i>et al.</i> 2009)
Poule algérienne	Algérie	Libre	pas connue	13,39	Le présent travail
Poule algérienne	Algérie	Libre	pas connue	14,25	Le présent travail

La valeur moyenne de la teneur en cholestérol dans la variété marron, obtenue dans ce travail est de 11,38 mg/g, cette valeur se situe dans la même gamme reportée par Beyer *et al.* (1989 a, 1989 b) qui étaient de 11, 0 mg/g et 11,7 mg/g, respectivement. Jiang *et al.* (1991) ont trouvé 11,7 mg/g, cependant, Bragagnolo *et al.* (2003) ont montré que la teneur moyenne en cholestérol dans le jaune d'œuf et de 12,0 mg/g.

En revanche, les jaunes d'œufs de caille ont montré une valeur moyenne de cholestérol de 13,25 mg/g, cette valeur était supérieure à celle obtenue par Bragagnolo *et al.* (2003) (12,1 mg/g).

En Algérie, les œufs de dinde et d'oie sont beaucoup moins consommés que ceux de la caille. La teneur en cholestérol dans le jaune d'œuf de la dinde est de 11,48 mg/g, cette valeur est proche de celle obtenue dans la variété des poules marron. Tandis que les cinq

(05) variétés d’oies ont montré une valeur inférieure à celle des dindes (9,06 mg/g). Ces variétés d’œufs peuvent être consommées

D’autre part, et comme le montre le tableau (IV.9), il n’y a pas une grande différence entre les teneurs en cholestérol dans les œufs bouillis et crus.

Tableau (IV.9): Teneur de cholestérol dans les œufs bouillis et crus.

	Cholestérol (mg/g)	RSD %	Capacité de récupération (%) ^a
Algérien autochtones poule			
Œuf brun			
Cru	13,41±0,15	1,26	98,1
Bouilli	13,30±0,24	4,55	98,3
Œuf blanc			
Cru	14,25±0,33	3,55	99,1
Bouilli	13,95±1,15	2,68	99,5
Poule de cage			
Œuf brun			
Cru	11,18±0,38	1,91	98,6
Bouilli	11,25±0,35	2,82	97,6
Œufs marron foncé			
Cru	12,35±0,28	2,82	99,2
Bouilli	12,66±0,39	3,53	98,7
Œufs blancs			
Cru	11,41±0,15	4,25	97,8
Bouilli	11,75±0,21	2,35	99,6

^a: 1mg de cholestérol ajouté.

IV.2.5 Dosage du cholestérol dans le lait de vache

Dans cette partie, un produit alimentaire largement consommé en Algérie, riche en matière lipidique a fait l’objet de notre investigation.

Les courbes d’étalonnage ont été calculées en représentant les aires des pics par rapport à la concentration (µg injectés) pour cinq concentrations différentes, chaque point

étant la valeur moyenne de trois mesures de surface indépendantes. Les courbes d'étalonnage étaient linéaires et un facteur de régression $R^2 > 0,99$ a été trouvé.

Comme le montre les figures (IV.15 et IV.16), les lignes de base pour tous les échantillons de lait de vache et de lait fermenté étaient linéaires et la séparation et la résolution des pics qui nous intéressaient étaient acceptables.

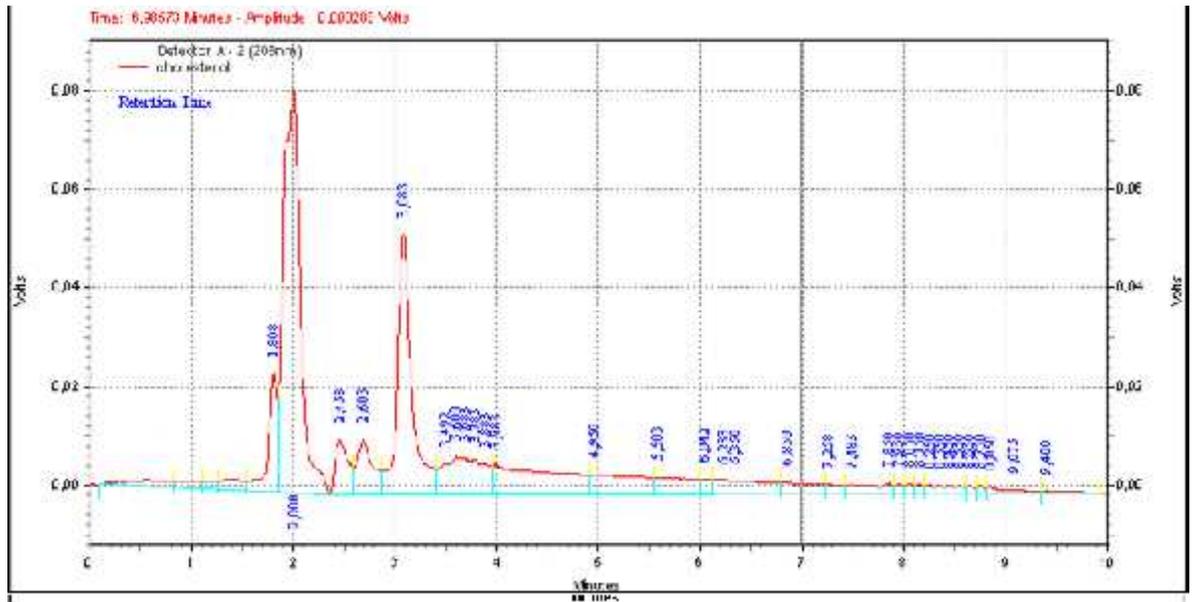


Figure (IV.15): Chromatogramme du lait de vache à 210 nm, cholestérol : Tr=3,10 minutes

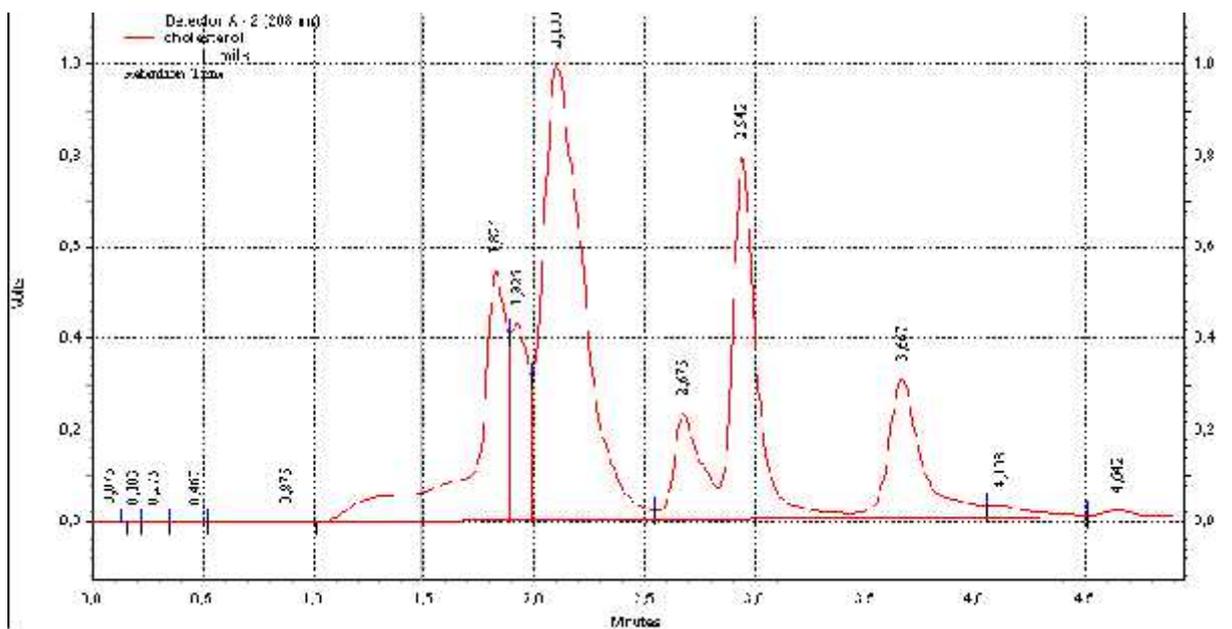


Figure (IV.16): Chromatogramme du lait de vache fermenté à 210 nm, cholestérol Tr=3,10 minutes

Comme la montre le tableau (IV.10), les valeurs de R^2 obtenues varient de 96,4 à 98,7%. En outre les valeurs du RSD (relative standard deviation) étaient de $1,54 \pm 0,14$ à $5,22 \pm 0,35\%$.

La teneur en cholestérol dans les variétés de lait de vaches étudiées varie de $152,16 \pm 0,18$ à $180,04 \pm 0,25$ mg/kg (tableau (IV.10)).

Ces résultats sont en accord avec les teneurs obtenues pour le lait de vache (121,7 mg/kg) et le lait du yak (123,2–161,7 mg /kg), mais inférieur à celle obtenues dans le lait de brebis (Sieber, 2005; Goudjil *et al.* 2003; Fletouris *et al.*,1998).

Tableau (IV.10): Concentration en cholestérol du lait de diverses sources.

Sources	Concentration du Cholestérol (mg/kg)	Capacité de récupération (%) ^a	RSD %
S1	$170,16 \pm 0,57$	98,7	$5,22 \pm 0,35$
S2	$166,14 \pm 0,26$	98,5	$3,21 \pm 0,32$
S3	$178,24 \pm 0,44$	97,3	$1,54 \pm 0,14$
S4	$165,58 \pm 0,31$	98,1	$4,25 \pm 0,25$
S5	$152,16 \pm 0,18$	96,4	$2,55 \pm 0,33$
S6	$160,52 \pm 0,29$	98	$4,11 \pm 0,29$
S7	$171,81 \pm 0,45$	96,8	$1,85 \pm 0,44$
S8	$180,03 \pm 0,25$	98,5	$4,24 \pm 0,21$

^a: 1mg de cholestérol ajouté.

En revanche, les taux de cholestérol ont diminué de 15,18 à 19,79 % après la fermentation dans toutes les variétés de lait de vaches (tableau (IV.11)). Ceci peut-être expliqué par la transformation du cholestérol catalysée par les acides organiques produits lors de la fermentation. Comme le montre la figure (IV.14), il y a de nouveaux produits qui apparaissent sur le chromatogramme HPLC du lait fermenté.

Dans un premier temps, on peut conclure que la fermentation traditionnelle a un impact nutritionnel sur la santé parce qu'elle diminue la teneur du cholestérol dans le lait.

Tableau (IV.11): Concentration en cholestérol dans le lait de vache fermenté de diverses sources.

Source	Concentration du cholestérol (mg/kg)	Capacité de récupération (%) ^a	RSD %	Taux de diminution du cholestérol après fermentation
S1	141,75±0,23	97,6	4,15±0,55	16,69 %
S2	133,26±0,36	98,0	1,85±0,42	19,79 %
S3	150,25±0,25	96,9	2,56±0,27	15,70 %
S4	137,86±0,22	97,5	3,17±0,38	16,74 %
S5	128,89±0,44	98,9	5,23±0,24	15,28 %
S6	136,16±0,13	99,1	3,68±0,45	15,18 %
S7	144,98±0,28	98,5	2,48±0,29	15,61 %
S8	152,29±0,33	98,1	3,64±0,42	15,40 %

^a : 1mg de cholestérol ajouté.

IV.3. Etude par DFT de la relation quantitative structure activité antioxydante

Les méthodes de chimie quantique se basent généralement sur l'étude d'un modèle afin de déterminer une caractéristique précise d'un système plus complexe. Dans le cas de l'étude des stilbènes, le composé le plus représentatif est le resvératrol puisqu'il intervient dans la majorité des processus biologiques associés à ce type de substances. Les stilbènes présentent plusieurs fonctions hydroxyles susceptibles de réagir avec des espèces oxydantes, radicalaires et acido-basiques lors de processus chimiques et biochimiques. Le resvératrol comporte trois fonctions hydroxyles susceptibles d'être déshydrogénées au cours des mécanismes biologiques, abstraction de H[•], déprotonées, ou oxydées. Le nombre relativement important de ces fonctions oxygénées est à l'origine d'un grand nombre de formes activées différentes, telles que les semiquinones, les quinones, ...etc. Aucune étude théorique ne s'est attachée à décrire systématiquement les propriétés électroniques, structurales et énergétiques des différentes formes activées du resvératrol et de ses dérivés. Seules les propriétés des formes semiquinones ont été décrites à l'aide de méthodes de chimie quantique.

IV.3.1 Effet du nombre et de la position des groupes hydroxyles sur l'activité antioxydante du resvératrol et de ses analogues

Dans cette partie notre étude se focalise sur le resvératrol et sept (07) analogues hydroxylés qui diffèrent par le nombre et la position des groupes hydroxyles (figure (IV.17)).

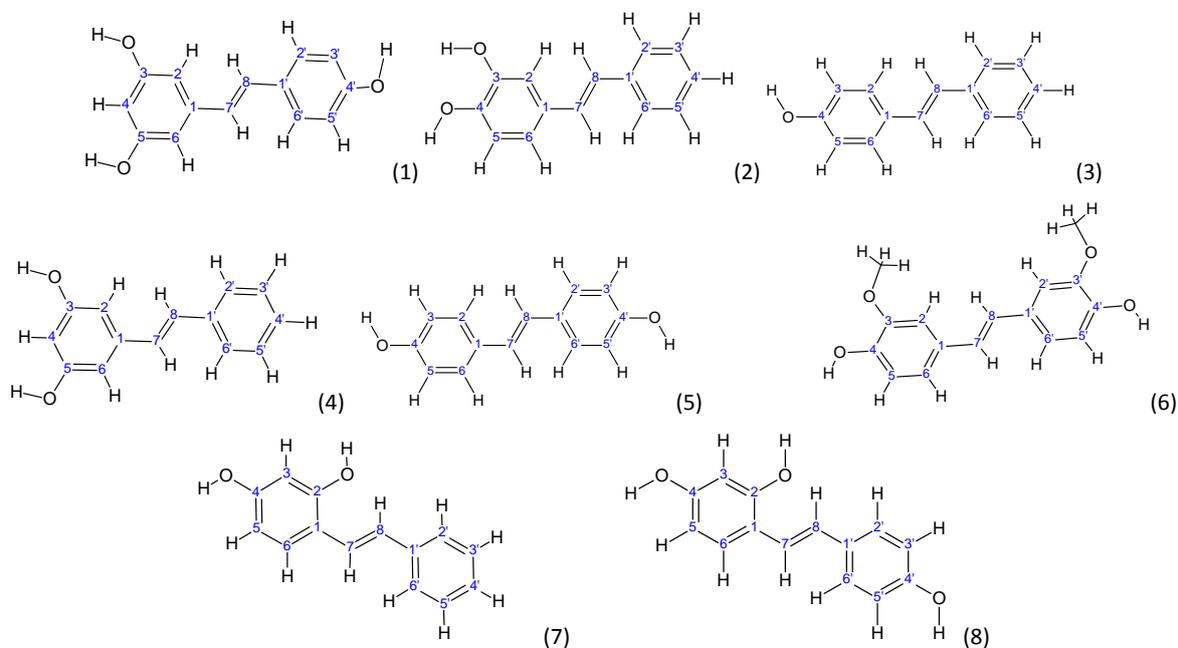


Figure (IV.17): Structures moléculaires du RSV (1) ; 3,4-DHS (2) ; 4-HS (3) ; 3,5-DHS (4) ; 4,4'-DHS (5) ; 3,3'-DM-4,4'-DHS (6) ; 2,4-DHS (7) et le 2,4,4'-THS (8).

IV.3.1.1 Propriétés structurales et énergétiques

Les méthodes DFT reproduisent avec une grande précision les longueurs de liaison du resvératrol obtenues par spectroscopie RX. L'existence d'une double liaison entre les atomes de carbone 7 et 8 assure la conjugaison entre les cycles A et B et de là, dans toute la molécule. Le nuage électronique est délocalisé sur l'ensemble de la molécule du resvératrol, ce qui prouve que sa structure est pratiquement plane, ceci est en accord avec les études théoriques de Mukilski *et al.*, (2010).

Dans un premier temps, une pré-optimisation du resvératrol et de ses analogues a été effectuée avec la méthode semi-empirique AM1, les structures des molécules ont ensuite été soumises à une optimisation totale avec la méthode DFT/B3LYP/6-31G** (figure (IV.18)).

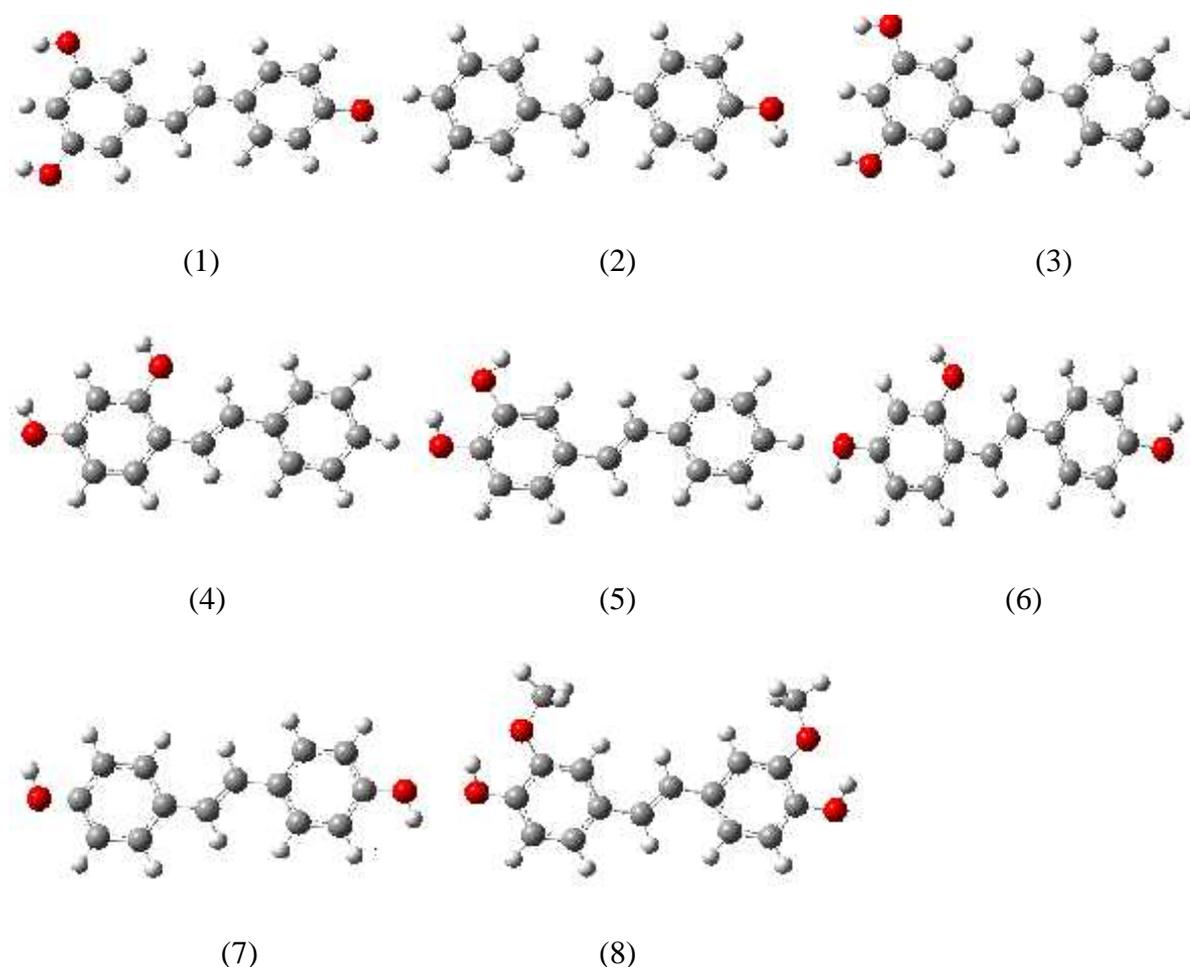


Figure (IV.18): Structures chimiques du RSV et ses analogues optimisées par la méthode B3LYP/6-31G**.

Dans ce travail, les longueurs des liaisons de la structure optimisée du resvératrol avec la méthode B3LYP/6-31G** ne diffèrent que de 0,02 Å, au maximum, de celles relevées de la structure du resvératrol cristallisé (Ferenc *et al.*, 2007). La prédiction de la planéité de la molécule dépend de la méthode employée.

Comme le montre le tableau (IV.12), les valeurs des angles de dièdre (C₆-C₁-C₈-C₇) et (C₈-C₇-C₁-C₂) indiquent que tous les analogues du resvératrol étudiés sont strictement plans. La structure plane du resvératrol laisse supposer une délocalisation des électrons sur l'ensemble de la molécule.

En revanche, les atomes d'hydrogène de tous les groupements OH se situent pratiquement dans le plan des cycles phényles de tous les composés, ce qui facilite le transfert d'électrons après la rupture de la liaison O-H. Les longueurs des liaisons hydroxyles sont en accord avec celles tirées de la littérature (Cai *et al.*, 2003) (absence de valeurs expérimentales, autant qu'on le sache).

Tableau (IV.12): Valeurs optimisées par la B3LYP/6-31G ** des angles de dièdre [°] et [°] et des longueurs des liaisons O-H (Å) des antioxydants étudiés.

Composé			4'-OH	3-OH	5-OH	4-OH	2- OH	C=C mère	C=C radical 4-OH
RSV	0,02	0,02	0,9628 ^a 0,9663 ^b	0,9622 ^a 0,9661 ^b	0,9622 ^a 0,9661 ^b	-	-	1,349	1,365
Trans-4,4'-DHS	0,00	0,00	0,9627 ^a 0,9662	-	-	0,9627 ^a 0,9662	-	1,349	1,368
Trans-4HS	0,00	0,00	0,9663	-	-	-	-	1,348	1,366
Trans-3,4-DHS	0,01	0,01	-	0,9662	-	0,9660	-	1,349	1,362
Trans-3,5-DHS	0,01	0,01	-	0,9658	0,9658	-	-	1,347	1,348
Trans-2,4-DHS	0,00	0,00	-	-	-	0,9661	0,9663	1,351	1,371
Trans-2, 4,4'- DHS	0,01	0,01	0,9662	-	-	0,9662	0,9663	1,351	1,372
33'DM44'DHS	0,00	0,00	0,9699	-	-	0,9699	-	1,349	1,363

^a: D'après (Mikulski *et al.*, 2010).

^b: D'après (Cai *et al.*, 2003).

La formation des liaisons hydrogène intramoléculaires dans les composés 3,4-DHS et 3, 3'-DM-4,4'-DHS entre l'hydrogène porté par l'oxygène du carbone 4 et l'oxygène porté par le carbone 3 avec une longueur de 2,1201 et 2,0751 Å respectivement, explique la stabilité de

ces espèces. Cependant, les radicaux formés après rupture de la liaison O-H des hydroxyles des positions 3 et 4 incluent de fortes liaisons hydrogènes (1,9485 et 1,9717 Å) respectivement. La liaison hydrogène stabilise les radicaux en position 3 et 4, ce qui favorise le départ de l'atome d'hydrogène. Dans un premier temps, on peut dire que l'activité antioxydante élevée des composés contenant l'entité catéchol (comme le 3,4-DHS) est liée directement à la forte liaison hydrogène, après rupture de la liaison O-H.

Tableau (IV.13): Valeurs optimisées par la B3LYP/6-31G ** des liaisons [Å] C-O, C-C et C=C dans le 3,4 DHS en phase gazeuse.

Composé	C3-O	C4-O	C1-C2	C5-C6	C2-C3	C3-C4	C4-C5	C6-C1	C=C
3,4 DHS	1,3772	1,3606	1,4120	1,3939	1,3842	1,4091	1,3910	1,4052	1,349
4-Semiquinone	1,3379	1,2530	1,4369	1,3677	1,3748	1,4732	1,4423	1,4369	1,362
3,4-Quinone	1,2232	1,2183	1,3661	1,3462	1,4599	1,5546	1,4742	1,4763	1,352

L'optimisation de la géométrie des molécules a montré qu'il y a une inter-conversion entre les liaisons simple et double, ce qui confirme que tous les composés étudiés présentent une forme semi-quinone (Cao *et al.*, 2003).

Comme le montre le tableau (IV. 13), la longueur de la liaison C₄-O dans le 3,4-DHS diminue de 1,3606 à 1,2530 Å de la molécule mère à la forme semi-quinone, bien que les liaisons C₂=C₃ et C₅=C₆ diminuent de 1,3842 et 1,3939 à 1,37481 et 1,3677 Å respectivement. En revanche, les longueurs des doubles liaisons C₃=C₄, C₄=C₅, C₆=C₁ et C₁=C₂ ont montré une augmentation de 1,40910 ; 1,39102 ; 1,40525 ; et 1,41202 à 1,47328 ; 1,44239; 1,43698 et 1,43698 Å, respectivement. Donc, la structure dominante des radicaux STL-4-O[•] et STL-4'-O[•] est celle dans laquelle l'électron célibataire est distribué sur toute la molécule. La forme semi-quinone des radicaux est stabilisée par résonance. Le radical STL-5-O[•] du resvératrol et du 3,5-DHS, ont la même résonance que le radical STL-4-O[•], mais l'électron célibataire est distribué seulement sur le noyau A et pratiquement sur les atomes 5, 2, 4 et 6.

a) Orbitales HOMO et LUMO

Les frontières HOMO (acronyme de *Highest Occupied Molecular Orbital*), et LUMO (acronyme de *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) sont très souvent utilisées comme des indices pouvant expliquer la réactivité d'une molécule. Les énergies des orbitales moléculaires sont des propriétés moléculaires qui fournissent des informations utiles sur les

interactions entre sites donneurs et sites accepteurs d'électrons (Takahata *et al.*, 1991). Selon la théorie de la réactivité des électrons, la réaction chimique a lieu à une position où le chevauchement entre l'HOMO et la LUMO est maximal (Fukui, 1975). L'énergie de l'HOMO (ϵ_{HOMO}) est l'énergie du niveau le plus élevé de la molécule contenant des électrons. Une molécule avec une valeur de ϵ_{HOMO} élevée est capable de donner plus facilement des électrons, elle est donc relativement plus réactive qu'une molécule avec une valeur de ϵ_{HOMO} plus faible (Saraf *et al.*, 2003). L' ϵ_{HOMO} est directement liée au potentiel d'ionisation et caractérise la sensibilité de la molécule envers l'attaque des électrophiles.

L'énergie de la LUMO (ϵ_{LUMO}) est l'énergie du niveau le plus bas de la molécule qui ne contient pas d'électrons. Plus l' ϵ_{LUMO} est faible plus il est facile à la molécule d'accepter des électrons (Saraf *et al.*, 2003). L' ϵ_{LUMO} est directement liée à l'affinité électronique et caractérise la sensibilité de la molécule envers l'attaque des agents nucléophiles.

L'énergie de l'HOMO, décrivant la capacité des électrons donneurs, est un paramètre adéquat pour représenter le potentiel de piégeage des radicaux libres de polyphénols, depuis le processus de ralentissement de l'auto-oxydation en passant par l'abstraction d'un atome H, ainsi que le transfert d'électrons. Pour une molécule donnée, des valeurs élevées de l'HOMO indiquent que cette molécule a fort caractère donneur d'électrons.

Comme le montre la figure (IV.19), les deux orbitales HOMO et LUMO du composé 3,3'-DM-4,4'-DHS dans son état fondamental sont essentiellement localisées sur toute la molécule. Les positions 4 et 4'-OH sont facilement attaquables par les agents tant électrophiles que nucléophiles. Cette observation est valable pour tous les composés qui contiennent des OH dans ces deux positions. En parallèle, le site 2-OH des deux composés 2,4-DHS et 2,4,4'-THS peut subir les deux genres d'attaque, électrophile et nucléophile. En revanche, les positions 3 et 5-OH du resvératrol sont attaquables seulement par les agents nucléophiles car les orbitales LUMO sont absentes dans ces positions. Notons que la densité élevée des orbitales HOMO sur le pont éthylénique C7=C8 assure la délocalisation des électrons entre les deux cycles A et B, ce qui contribue à la stabilité du radical après le départ de l'atome d'hydrogène. Cette observation a été constatée pour tous les analogues du resvératrol.

Comme le montre le tableau (IV.14), la valeur de l'HOMO du composé 4-HS comme référence est de -5,2420 eV. La substitution d'un groupe hydroxyle en position 2, 3 et 4' cause l'augmentation de l'HOMO à -5,0692, -5,1698 et -5,0112 eV respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celle du resvératrol qui est de -5,2183 eV. Les composés ayant le

caractère nucléophile le plus fort sont le 3,3 -DM-44 -DHS et le 2,4,4 -THS avec des valeurs de l'HOMO de -4.8294 eV et -4.8509 eV, respectivement.

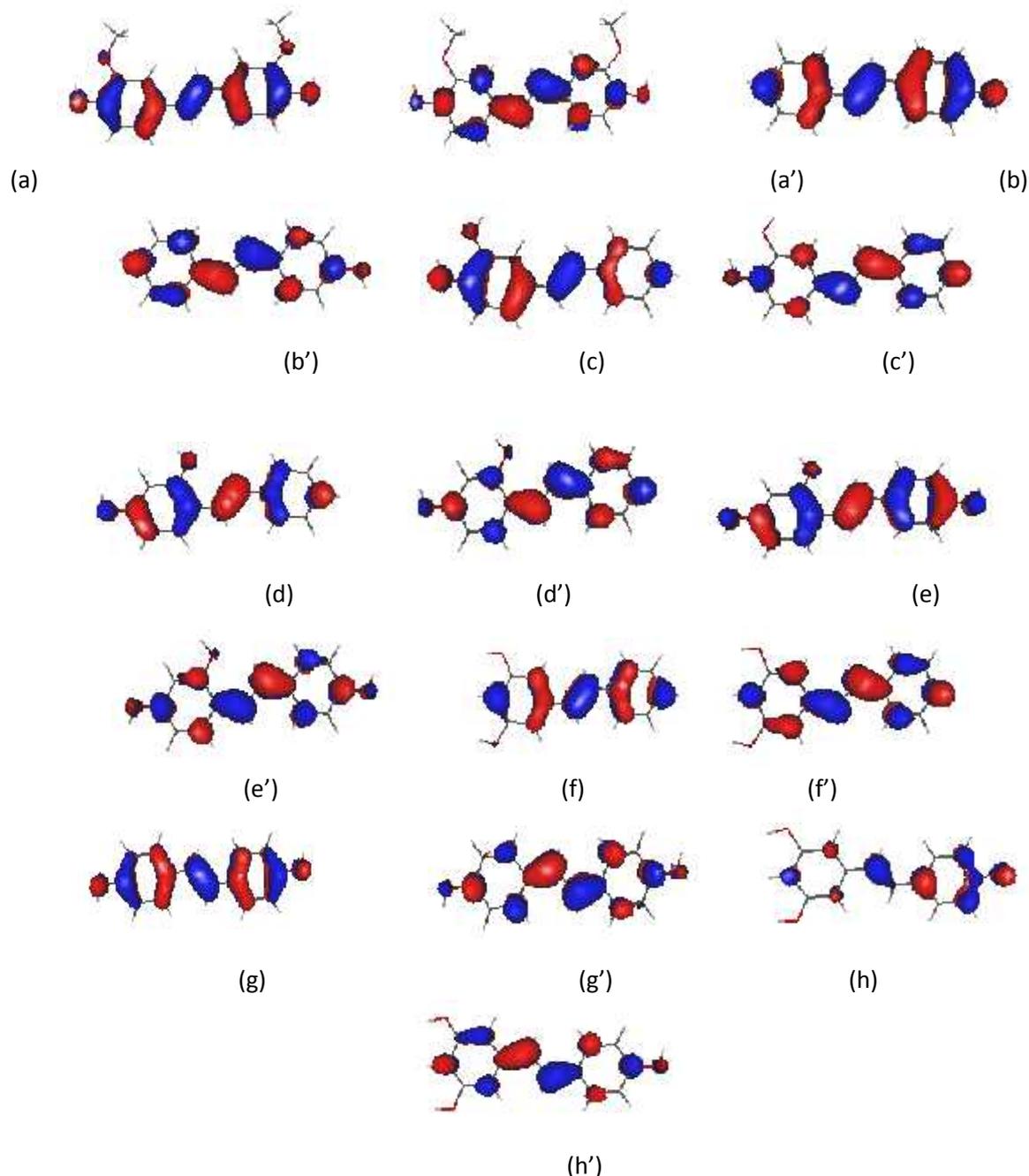


Figure (IV.19): Distribution des orbitales HOMO et LUMO des composés 3,3'-DM-4,4'-DHS (a,a') ; 4-HS (b,b') ; 3,4-DHS (c,c') ; 2,4-DHS (d,d') ; 2,4,4'-THS (e,e') ; 3,5-DHS, (f,f') ; 4,4' -DHS (g,g') et RSV(h,h').

Les résultats montrent que la substitution des groupements électro-donneurs tel que les groupes hydroxyles ou méthoxy ainsi que l'entité catéchol augmente les valeurs de l'HOMO. L'étude des orbitales HOMO et LUMO est une bonne stratégie pour mieux comprendre le comportement des antioxydants lors du piégeage des radicaux libres.

Tableau (IV.14): Propriétés théoriques du RSV et ses dérivées.

Composé	HOMO (ev)	LUMO (ev)	BDE (O-H) kJ/mol	AIP kJ/mol
33'-DM-44'-DHS	-4,8294	-1,0003		586,7466
Forme semi-quinone	= -5,0158 = -6,0014	= -1,6117 = -3,3053	350,1211	
Forme para-quinone	-5,6071	-3,4076	670,1976	
3,4-DHS	-5,1698	-1,2503		632,7136
Radical STL-4-O [•]	= -5,2569 = -6,3027	= -1,6582 = -3,4781	314,1890	
Radical STL-3-O [•]	= -5,5309 = -5,7971	= -1,7050 = -3,5562	331,7954	
Forme quinone	-6,2311	-3,4659	657,3460	
4,4'-DHS	-5,0112	-1,0547		613,6919
Forme semi-quinone	= -5,1606 = -6,1707	= -1,4857 = -3,3559	348,9055	
Forme para-quinone	-6,2039	-3,7431	665,78047	
4,-DHS	-5,2420	-1,2109		640,9185
Radical STL-4-O [•]	= -5,3927 = -6,3522	= -1,6413 = -3,4963	352,4943	
3,5-DHS	-5,4972	-0,0487	371,5491	666,76398
Radical STL-3-O [•]	= -6,0011 = -5,8256	= -1,7611 = -3,5997		
2,4-DHS	-5,0692	-1,0187		622,3615
Radical STL-4-O [•]	= -5,3181 = -6,3021	= -0,0541 = -3,4661	346,3485	
Radical STL-2-O [•]	= -5,2822 = -5,8520	= -1,3896 = -3,4577	339,3122	
2,4,4'-THS	-4,8509	-0,8484		596,5397
Radical STL-4-O [•]	= -5,0781 = -6,0545	= -1,3066 = -3,3203	345,5608	
Radical STL-2-O [•]	= -5,0278 = -5,6406	= -1,2280 = -3,3099	337,62663	
Radical STL-4'-O [•]	= -4,9848 = -6,0197	= -1,2751 = -3,1946	349,5805	
Forme para-quinone 4,4'	-6,1484	-3,6596	658,9279	
RSV	-5,2183	1,45		635,9039
Radical STL-4'-O [•]	= 5,64 =6,45	= 1,86 =3,69	352,1	
Radical STL-3-O [•]	= 5,89 =5,72	= 1,83 =3,70	374,6	

b) Potentiel d'Ionisation Adiabatique (AIP)

Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP) est défini comme étant l'énergie minimale nécessaire pour arracher un électron à partir d'une molécule (ou atome) dans son état fondamental pour former un ion en phase gazeuse (McNaught *et al.*, 1997). L'AIP représente la facilité de donner les électrons, les molécules ayant les plus petites valeurs de l'AIP sont les plus actives. Les HOMO et l'AIP sont des paramètres utiles pour évaluer la capacité d'une espèce chimique à donner des électrons. Des HOMOs élevées ou des AIPs faibles reflètent une forte capacité à donner des électrons (Cheng *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2006). Les résultats présentés dans le Tableau (IV.14), montrent que les valeurs élevées des orbitales HOMO correspondent à des valeurs basses des AIP. A titre d'exemple, le composé 3,3'-DM-4,4'-DHS possède l'AIP la plus basse et l'HOMO la plus élevée, tandis que pour le composé 3,5-DHS, c'est le contraire.

c) Enthalpie de dissociation de liaison (BDE)

L'énergie d'une molécule diatomique est directement liée à la distance entre les deux atomes, r_{A-B} . Lorsque le système est dans son état d'énergie le plus bas, les deux atomes, A et B, sont séparés par une distance connue comme étant la distance de la liaison à l'équilibre. Si nous rapprochons les atomes, il y aura une répulsion entre eux et l'énergie du système augmente. Si nous séparons les deux atomes, il y aura une force d'attraction et l'énergie du système augmentera également jusqu'à ce qu'elle atteigne un point où la liaison est rompue. La quantité d'énergie qu'il faut pour cette rupture s'appelle énergie de dissociation de la liaison ou BDE.

Il faut souligner que les molécules ayant de faibles valeurs de BDE auraient une forte activité antioxydante, car elles peuvent donner plus facilement des hydrogènes lors de réactions avec les radicaux libres. Les valeurs des BDEs calculées pour les molécules étudiées sont présentées dans le tableau (IV.14). Les radicaux formés après les ruptures des liaisons hydroxyles sont représentées dans la figure (IV.20). La BDE du 4-HS comme pharmacophore est de 352,494 kJ/ mol, la substitution d'un groupe OH sur les positions 3, 2, et 4' pour avoir les composés 3,4-DHS; 2,4-DHS; et 4,4'-DHS diminue les valeurs des BDEs jusqu'à 314,1890 ; 346,3485 et 348,9055 kJ/ mol. Ces valeurs sont plus basses que celle du resvératrol qui est de 352,1 kcal/mol. En revanche, la BDE du 4,4'-DHS est de 348,9055 kcal/mol, la substitution du proton de la position 2 par un groupement hydroxyle pour obtenir le composé 2,4,4'- THS diminue cette valeur à 345,5608 kcal/mol. Tandis que l'addition de deux groupes méthoxy sur

les positions 3 et 3', donnant lieu au composé 3,3'-DM-4,4'-DHS, augmente la BDE jusqu'à 350,1211 kcal/mol.

Comme le montre clairement le tableau (IV.14), la BDE de la forme 4-semi-quinone du 3,3'-DM-4,4'-DHS est supérieure à celle du 4,4'-DHS, bien que la densité de spin (0,3124) de l'atome d'oxygène sur le radical STL-4-O[•] du composé 4,4'-DHS est supérieure à celle du composé 3,3'-DM-4,4'-DHS (0,2788). Cette différence est liée à la formation des liaisons hydrogène entre l'hydrogène des groupes 4-OH et 4'-OH avec les atomes d'oxygène des groupes méthoxy sur le C3 et le C3' respectivement. En conséquence, les BDEs de ces sites sont plus élevées parce que la rupture de la liaison OH implique aussi la rupture de la liaison hydrogène.

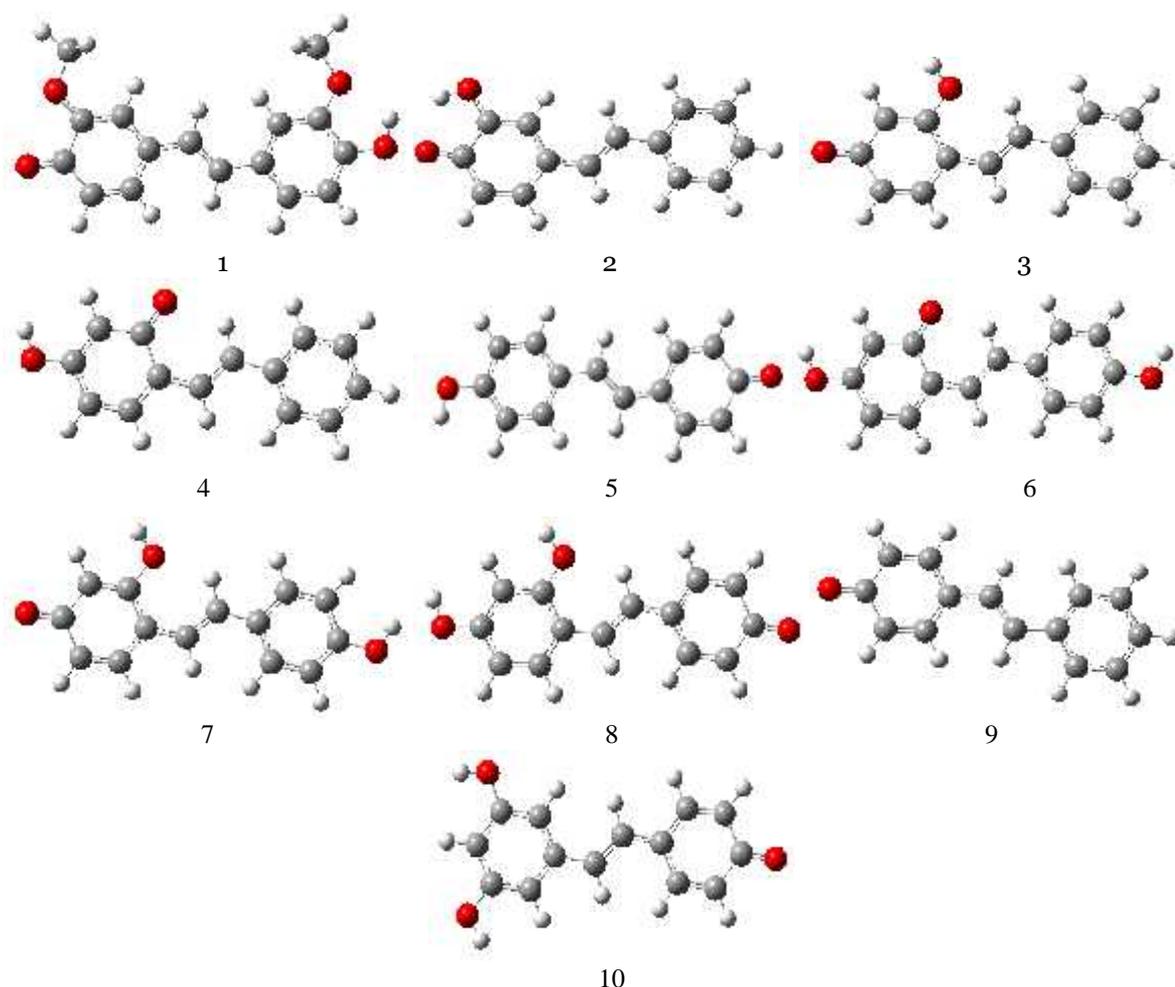


Figure (IV.20): Structures optimisées avec la méthode B3LYP/6-31** des formes semi-quinone des radicaux STL-4'-O[•] des composés 3,3'-DM4, 4'-DHS (1) ; 3,4-DHS (2) ; 2,4-DHS (3) ; 4,4'-DHS (5) ; 2,4,4'-THS (7), du radical STL-4'-O[•] du composé 2,4,4'-THS (8) et du RSV (10) et du radical STL-2-O[•] des composés 2,4-DHS (4) et 2,4,4'-THS (6).

Pour le composé 2,4-DHS, la BDE du radical STL-2-O[•] est inférieure à celle du radical STL-4-O[•], en outre, la BDE du radical STL-2-O[•] est inférieure à celles des radicaux 4 et STL-4'-O[•] pour le 2,4,4'-THS. Pour les autres analogues du resvératrol, le radical STL-4-O[•] est le plus stable. Ces résultats indiquent que le radical STL-2-O[•] est plus stable que les radicaux 4 et STL-4'-O[•] et les positions 2-OH ont tendance à donner leurs atomes d'hydrogène plus que les positions 4 et 4'-OH. Notons que la BDE minimale correspond au composé 3,4-DHS, ceci est dû à la présence d'une entité catéchol. Les BDEs des groupes OH des positions 3 et 5 du resvératrol indiquent que le cycle B contribue à l'activité antiradicalaire plus que le cycle A. Ces résultats sont en bon accord avec les résultats expérimentaux effectués par Cai *et al.* (2003).

En utilisant la méthode DFT hybride B3LYP avec la base 6-311G (d,p), Zhang *et al.* (2003) ont montré que la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire diminue considérablement les BDEs par rapport au système de référence, le catéchol présente des énergies globalement inférieures d'environ 10 kcal/mol à celle du phénol (la BDE du catéchol : 72,8 kcal/mol; la BDE du phénol : 82,8 kcal/mol). Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus par Wright *et al.* (2001).

Généralement, la substitution d'un second OH sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité antioxydante des acides phénoliques, particulièrement quand le second OH est en ortho ou para du premier: l'activité antioxydante de la position ortho = para > méta (Higdon *et al.*, 2003) ou l'activité antioxydante de la position para > ortho > méta (Thumann *et al.*, 1980). Un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant, acide gallique (Kalita *et al.*, 2012).

En revanche, plusieurs composés phénoliques contenant l'entité catéchol présentent une activité antioxydante importante, ceci est le cas de l'acide rosmarinique et la quercétine (Cao *et al.*, 2005). Dans notre étude, le composé 3,4-DHS a montré une activité antioxydante plus importante que celle des autres stilbènes.

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été l'objet de plusieurs études. Dans un premier temps, les polyphénols, plus particulièrement les stilbènes, sont capables de réduire rapidement les radicaux libres par transfert d'hydrogène. Eventuellement, le radical stilbénosyle (STL-O[•]) peut réduire un autre radical pour donner une structure quinone. Ainsi, la capacité antioxydante des stilbènes dépend non seulement du potentiel redox du couple STL-O[•]/STL-OH mais aussi de la réactivité du radical STL-O[•].

Jovanovic *et al.* (1994) ont montré que les radicaux superoxydes réagissent avec le cycle B des flavonoïdes et conduisent à la formation de quinones (Jovanovic *et al.*, 1994). Comme le montre la figure (IV.21), le 3,4-DHS libère un atome d'hydrogène de la position 4 pour intervenir dans le premier stade de l'inhibition de la peroxydation. En outre, le deuxième hydrogène sera libéré en formant la structure ortho-quinone.

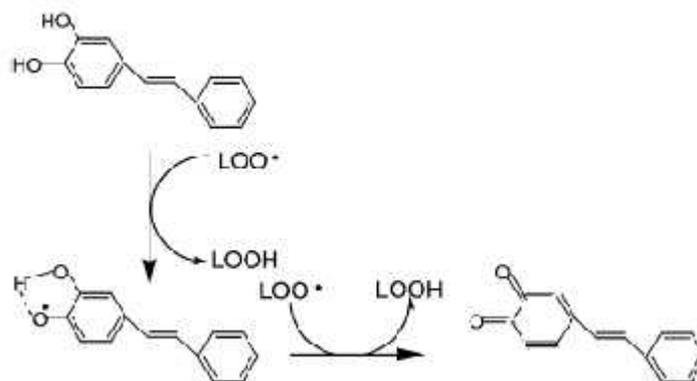


Figure (IV.21): Mécanisme d'inhibition de la peroxydation par l'antioxydant 3,4-DHS.

Avec presque la même capacité antiradicalaire le composé 4,4'-DHS inhibe la peroxydation et donne la forme para-quinone (figure (IV.22)).

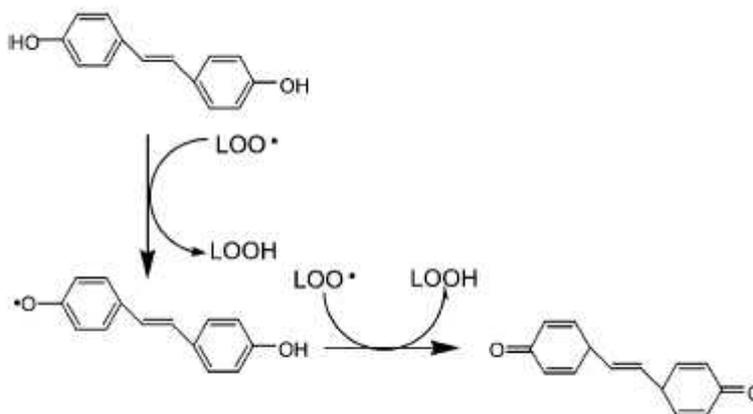


Figure (IV.22): Mécanisme d'inhibition de la peroxydation par l'antioxydant 4,4'-DHS.

Pour concrétiser le rôle des formes ortho et para-quinones dans l'activité antioxydante, leur BDEs ont été calculées et sont présentées dans le tableau (IV.14). La figure (IV.23) montre les formes ortho et para-quinone. La BDE correspondant à la formation de la 3,4-ortho-quinone du composé 3,4- DHS est de 657,3460 kcal/mol, cette valeur est inférieure de

11,3615 kcal/mol de la somme des deux BDEs des positions 3 et 4. En revanche, les BDEs de formation de la 4,4'-para-quinone des composés 3,3'-DM-4,4'-DHS ; 4,4'-DHS et le 2,4,4'-THS étaient 670,1976 ; 665,7707 et 658,9279 kJ/mol. La moitié de ces valeurs étaient 335,0988 ; 332,8853 et 329,46395 kJ/mol, respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues pour les radicaux de la forme semi-quinone (348,9055 ; 350,1211 et 345,5608 kJ/mol, respectivement) (tableau (IV.14)). Ces résultats donnent une indication sur la stabilité des formes quinones.



Figure (IV.23): Les structures 3,4 ortho-quinone et 4,4' para-quinone des composés 3,4-DHS et 4,4'-DHS.

Comme le montre le tableau (IV.13), les longueurs des liaisons C-O₃ et C-O₄ dans la molécule mère 3,4- DHS diminuent de 1,3772 et 1,3606 à 1,2232 et 1,2183 Å respectivement dans la forme quinone.

Le même changement a été observé pour les liaisons C1-C2 et C5-C6 qui ont diminué de 1,4120 et 1,3939 à 1,3661 et 1,3462 Å respectivement. Tandis que les longueurs des liaisons C2-C3, C3-C4, C4-C5 et C6-C1, ont augmenté de 1,3842; 1,4091; 1,3910 et 1,4052 à 1,4599; 1,5546; 1,4742 et 1,4763 Å respectivement.

Les valeurs de l' HOMO et l' LUMO du composé 3,4-DHS étaient de -5,1698 et -1,2503 eV respectivement. Après la formation de la semi-quinone, ces valeurs deviennent -5,2569 et -1,6582 dans le radical STL-4-O[•] alors que pour le radical STL-3-O[•], elles sont de -5,5309 et -1,7050 eV. Par contre les valeurs des orbitales HOMO et LUMO dans la forme quinone ont été -6,2311 eV et -3,4659 eV respectivement.

Tous ces résultats prouvent que les semi-quinones peuvent pratiquement fournir un électron pour continuer la rupture homolytique d'un autre groupement hydroxyle.

Comme le montre le mécanisme de la figure (IV.24), la position 4 du composé 3,4-DHS a tendance à donner son hydrogène en premier lieu ainsi, le radical formé sera stabilisé en formant une semi-quinone (figure (IV.24 b-d)), après passage par les trois structures de résonance (figure (IV.24 b et b)), l'hydrogène restant en position 3 sera libéré pour donner la forme quinone (figure (IV.24 e)).

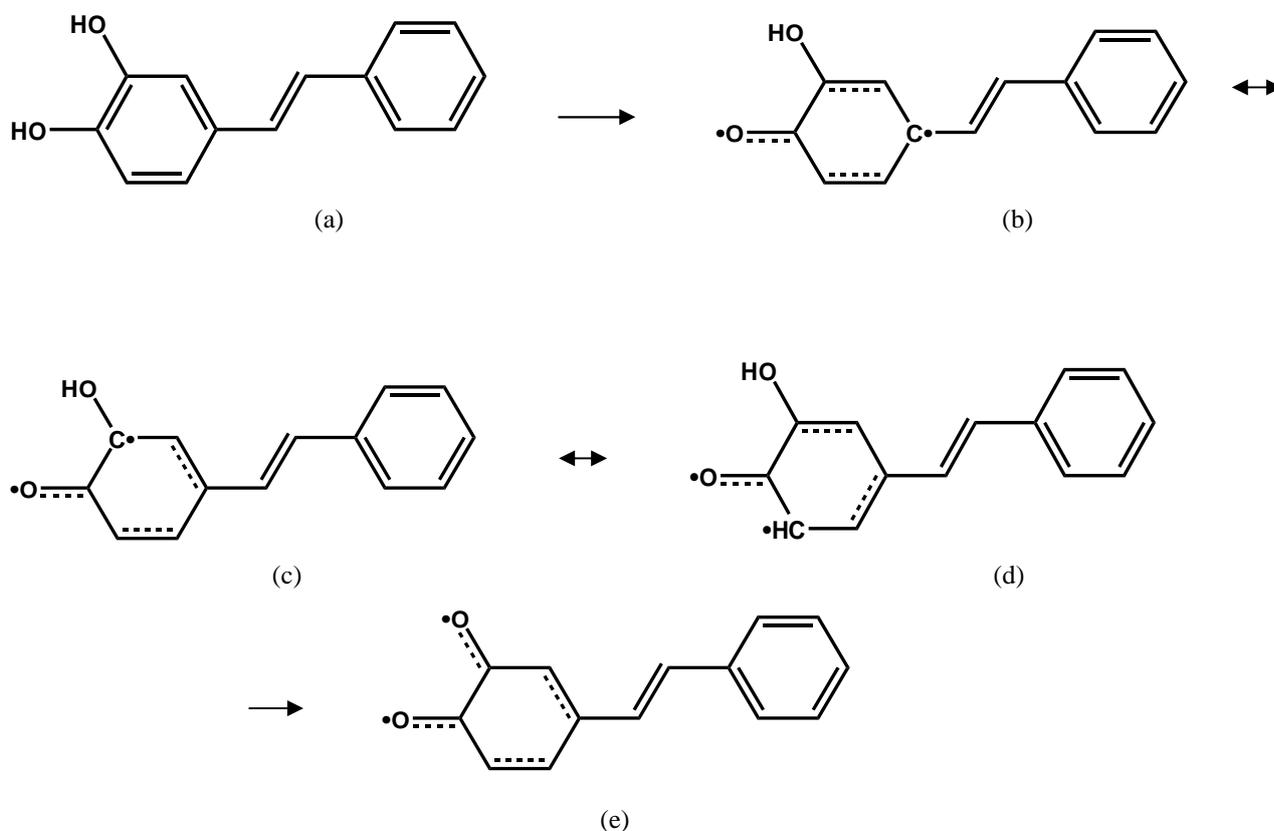


Figure (IV.24): Mécanisme de formation de la semi-quinone et la quinone du composé 3,4-DHS.

On peut déduire de ce qui précède que la forme semi-quinone ainsi que la forme quinone sont les explications appropriées pour l'activité antioxydante élevée du composé 3,4-DHS. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de Cao *et al.* (2003).

En revanche, concernant les composés qui contiennent l'entité 4,4'-DHS au sein de leurs structures, comme le 3,3-DM4,4-DHS, la première forme oxydée (semi-quinone) libère l'atome d'hydrogène du deuxième hydroxyle restant et forme la structure para-quinone. Globalement, les deux formes semi-quinone et para-quinone sont les explications appropriées pour l'activité antioxydante élevée pour les composés 4,4'-DHS ; 3,3-DM4,4'-DHS et 2,4,4'-THS.

En plus, les atomes d'oxygène des groupes hydroxyles en ortho- (4-OH de 3-méthoxy et 4'-OH du groupes 3'-méthoxy pour 3,3'-DM-4, 4'-DHS et 4-OH de 3-OH pour 3,4-DHS) contribuent à la dispersion électronique, c'est pourquoi la densité de spin a été réduite de 0,3124 dans le composé 4,4'-DHS à 0,2788 dans le 3,3'-DM-4,4'-DHS et de 0,3205 dans le

4-HS à 0,2853 dans le 3,4-DHS. L'effet inductif et la liaison hydrogène contribuent remarquablement à la stabilité du radical formé après la coupure homolytique de la liaison O-H.

d) La densité de spin

Un autre paramètre moléculaire corrélé avec l'activité antioxydante est la densité de spin, qui a été également calculée dans ce travail. La densité de spin caractérise la distribution de spin des électrons dans les radicaux formés après le départ de l'atome d'hydrogène et il est responsable de leur stabilité (Mikulski *et al.*, 2010).

Il faut souligner que plus la densité de spin est délocalisée dans le radical, plus le radical est facilement formé, et plus basse est la BDE (Parkinson *et al.*, 1999). La densité de spin sur le radical STL-4-O[•] du composé 3, 4-DHS est de 0,2853 (tableau (IV.15)), tandis qu'elle est de 0,3317 pour le radical STL-3-O[•] (figure (IV.25)). Cette différence est due à la bonne répartition de la densité de spin dans les deux cycles A et B du radical STL-4-O[•] en passant par la double liaison C7=C8, tandis que dans le radical STL-3-O[•], la densité de spin est localisée sur les atomes proches de la fonction hydroxyle impliquée dans le processus radicalaire, elle ne dépasse pas le cycle A (figure (IV.25)).

Bien que la structure la plus stable des radicaux STL-3-O[•] et STL-4-O[•] formés est la forme para, l'électron célibataire sur C1 du radical STL-4-O[•] peut être conjugué avec le pont C7=C8 et se répartit le long de la molécule, l'électron célibataire sur le C2 du radical STL-4-O[•] ne dépasse pas le cycle A et la densité de spin est essentiellement localisée sur l'atome d'oxygène duquel on a retiré l'hydrogène. On peut mentionner que les groupes hydroxyles substitués sur des carbones avec des densités de spin positives augmentent la stabilité du radical.

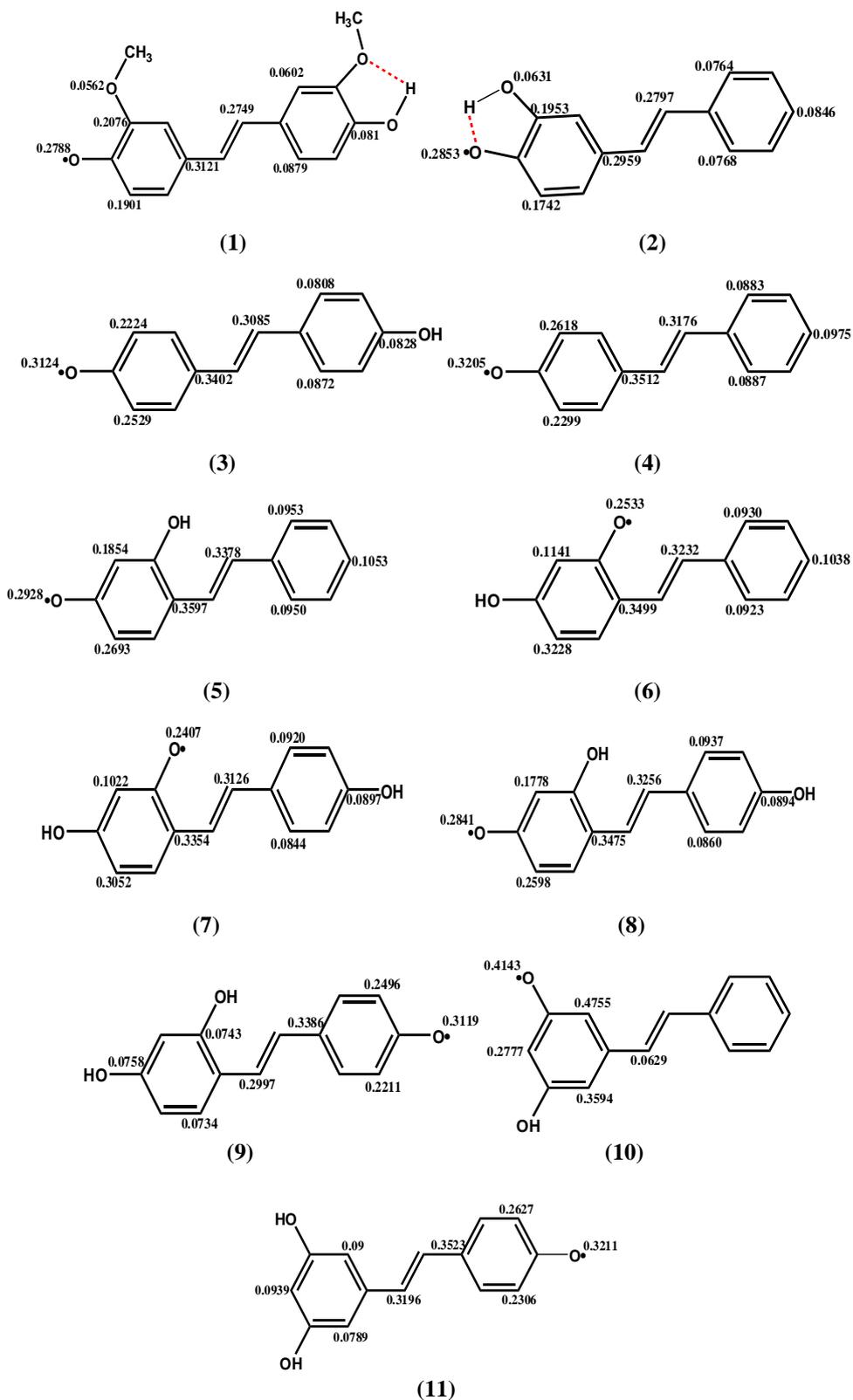


Figure (IV.25): Densité de spin calculée par la B3LYP/6-31G** pour le radical STL-4-O[•] du 3, 3'-DM 4, 4'-DHS (1), 3,4-DHS (2), 4, 4'-DHS (3), 4-HS (4), 2,4-DHS (5), and 2, 4, 4'-THS (8), le radical STL-4'-O[•] du 2, 4, 4'-THS (9) et le RSV (11), le radical STL-2-O[•] du 2,4-DHS (6) et 2,4,4'-DHS (7), le radical STL-3-O[•] du 3,5-DHS (10).

Tableau (IV.15): Densité de spin sur l'atome d'oxygène dans les radicaux phénoxyles du RSV et ces analogues.

Composés	Radical	Radical	Radical	Radical	Radical
	4-OH	2-OH	3-OH	5-OH	4'-OH
RSV	-	-	0,4415	-	0,3211
4HS	0,3205	-	-	-	-
3,5DHS	-	-	0,4143	-	-
2,4DHS	0,2928	0,2533	-	-	-
3,4DHS	0,2853	-	0,3317	-	-
2,4,4'THS	0,2841	0,2407	-	-	0,3119
4,4'DHS	0,3124	-	-	-	-
3,3'DM4,4'DHS	0,2788	-	-	-	-

Il faut noter que la densité de spin sur l'atome d'oxygène du radical STL-4-O[•] est de 0,3205, elle est délocalisée le long de la molécule comme la montre la figure (IV.26). Par substitution d'un hydroxyle en position 3 du composé 4-HS, la densité de spin diminue à 0,2853 avec la délocalisation sur C1 (0,2959), C3 (0,1953), C5 (0,1742) et C8 (0,2797). En outre, le 3-OH substitué est porté par un carbone de densité de spin positive, ceci résulte en l'augmentation de la stabilité du radical STL-4-O[•] (figure (IV.26)).

Bien que la structure la plus stable des radicaux STL-3-O[•] et STL-4-O[•] formés est la forme para, l'électron célibataire sur C1 du radical STL-4-O[•] peut être conjugué avec le pont C7=C8 et se répartit le long de la molécule, l'électron célibataire sur le C2 du radical STL-4-O[•] ne dépasse pas le cycle A et la densité de spin est essentiellement localisée sur l'atome d'oxygène duquel on a retiré l'hydrogène. On peut mentionner que les groupes hydroxyles substitués sur des carbones avec des densités de spin positives augmentent la stabilité du radical.

La substitution du 4-OH par un hydroxyle en position para, diminue la valeur de la densité de spin à 0,3124 avec la répartition suivante : 0,3402 (C1), 0,2224 (C3), 0,2529 (C5) et 0,3085 (C8). Le groupement 4-OH est porté par un carbone de densité de spin positive, cette addition contribue pratiquement à la stabilité du radical formé.

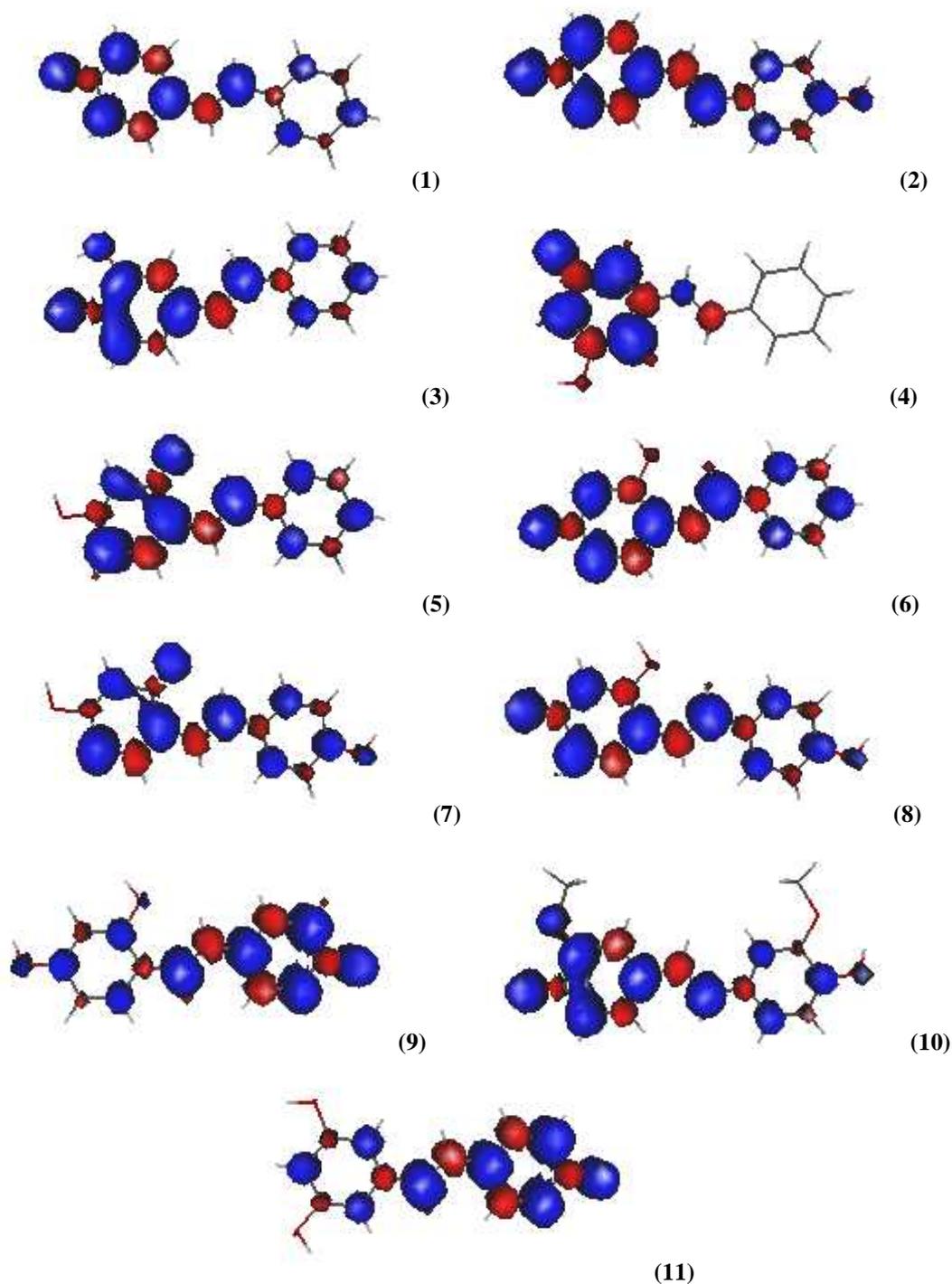


Figure (IV.26): Distribution de la densité de spin dans les radicaux formés après l'arrachement d'un hydrogène des cycles A et B de 4-HS (1), 4,4'-DHS (2), 3,4-DHS (3), 3,5-DHS (4), 2,4-DHS (5, 6), 2,4,4'-THS (7, 8, 9) et le RSV (10) calculée par la B3LYP/6-31G**.

Le composé 3,3'-DM-4,4'-DHS est le résultat de l'ajout de deux groupes méthoxy sur les positions 3 et 3' du composé 4,4'-DHS. Effectivement, la densité de spin est réduite à 0,2788 avec une délocalisation sur C1 (0.3121), C3 (0.2076), C5 (0.1901) et C8 (0.2749).

Comme le montre les tableaux (IV.14 et IV.15), les valeurs des BDEs, AIPs et densité de spin indiquent que les positions O3 et O5 ne montrent pas une grande contribution à l'activité antioxydante du resvératrol. Il en résulte que le composé 3,5-DHS n'est pas un bon antioxydant. La densité de spin est de 0,2928 sur le radical STL-4-O[•] du composé 2,4-DHS avec la répartition sur C1 (0.3597), C3 (0.1854), C5 (0.2693) et C8 (0.3378). L'addition d'un groupe OH en position 2 du composé 4-HS augmente la densité de spin en C8 comparé avec les autres composés. Le même résultat a été trouvé pour le 2,4,4'-DHS. La structure la plus stable de ces molécules est dans laquelle l'électron célibataire est localisé en position ortho du radical STL-2-O[•] en le comparant avec le radical STL-4-O[•] (figure (IV.27)).

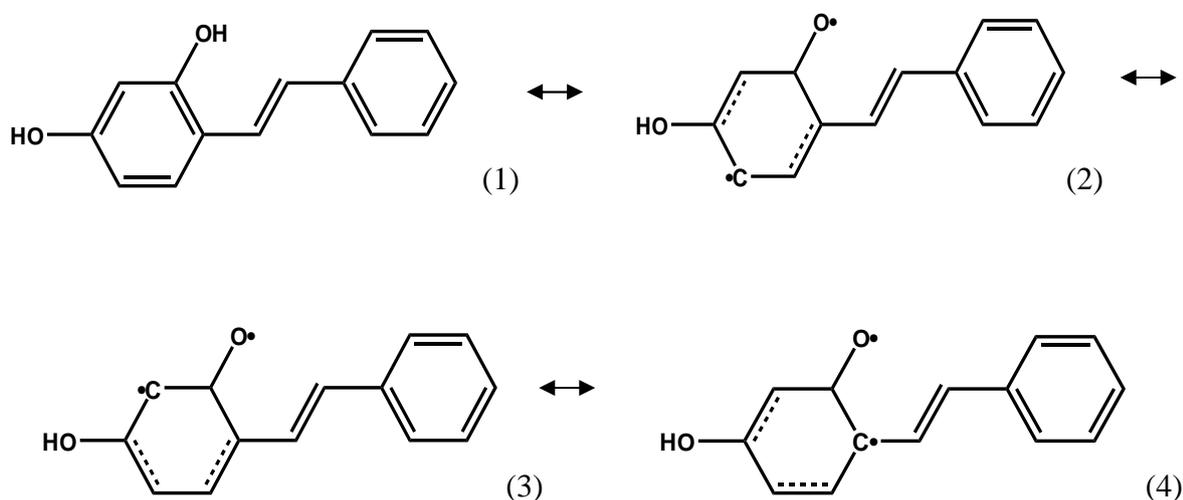


Figure (IV.27): Structures de résonance des radicaux du composé 2,4 DHS.

Il faut souligner que le 2-OH contribue à l'activité antiradicalaire mieux que le groupe 4-OH. Les résultats obtenus dans cette partie montrent que l'entité 2-HS est un nouveau pharmacophore du squelette stilbénique. Notre étude basée sur la chimie quantique est en accord avec les résultats expérimentaux effectués par Cheng *et al.* (2006) et Cai *et al.* (2003).

IV.3.2. Etude de l'effet du blocage de la rotation du pont éthylène du resvératrol sur l'activité antioxydante

Le resvératrol est le stilbène le plus connu, le plus étudié et le plus prometteur sur le plan pharmacologique. Sa grande importance provient aussi du fait qu'il est actuellement utilisé comme une référence pour générer d'autres molécules ayant un pouvoir antioxydant, et par conséquent, un potentiel pharmacologique plus prononcé. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié dans cette partie, l'effet du blocage de la rotation du pont éthylène du resvératrol sur l'activité antioxydante.

Par ailleurs, dans la nature, l'eau est l'environnement physiologique où la plupart des réactions chimiques se déroulent. C'est pour cela qu'en plus des calculs en phase gazeuse, nous avons effectué les calculs en tenant compte de la solvation dans l'eau. En outre, il faut souligner que les membranes lipidiques de nature apolaire constituent un environnement approprié aux antioxydants pour piéger les radicaux libres. C'est pour cette raison que nous avons également réalisé les calculs dans le benzène, en tant que milieu apolaire.

De plus, vu l'importance des mécanismes SET-PT et SPLET en phase aqueuse, l'estimation de l'effet des solvants sur ces processus a été étudié.

L'enthalpie du proton et de l'électron en phase gazeuse sont de 6,197 et 3,145 kJ/ mol, respectivement (Bartmess *et al.*, 1994). En revanche, les calculs des valeurs de l'AIP et de l'ETE nécessitent les valeurs de l'enthalpie de solvation de l'électron ${}_{\text{sol}}H(e^-)$, pour cette raison nous avons utilisé des valeurs tirées de la littérature et qui sont -105 kJ/ mol pour l'eau et -7 kJ/ mol, pour le benzène. En outre, pour le calcul de la PDE et de la PA, nous avons utilisé des valeurs tirées de la littérature pour l'enthalpie de solvation du proton ${}_{\text{sol}}H(H^+)$ (-1090 kJ/ mol dans l'eau et -894 kJ/mol dans le benzène) (Klein *et al.*, 2007 ; Rimarik *et al.*, 2010).

Cette partie porte sur le resvératrol et cinq (05) phénanthrènes obtenus par cyclisation du pont éthylène situé entre les deux cycles du squelette stilbénique (figure (IV.28)).

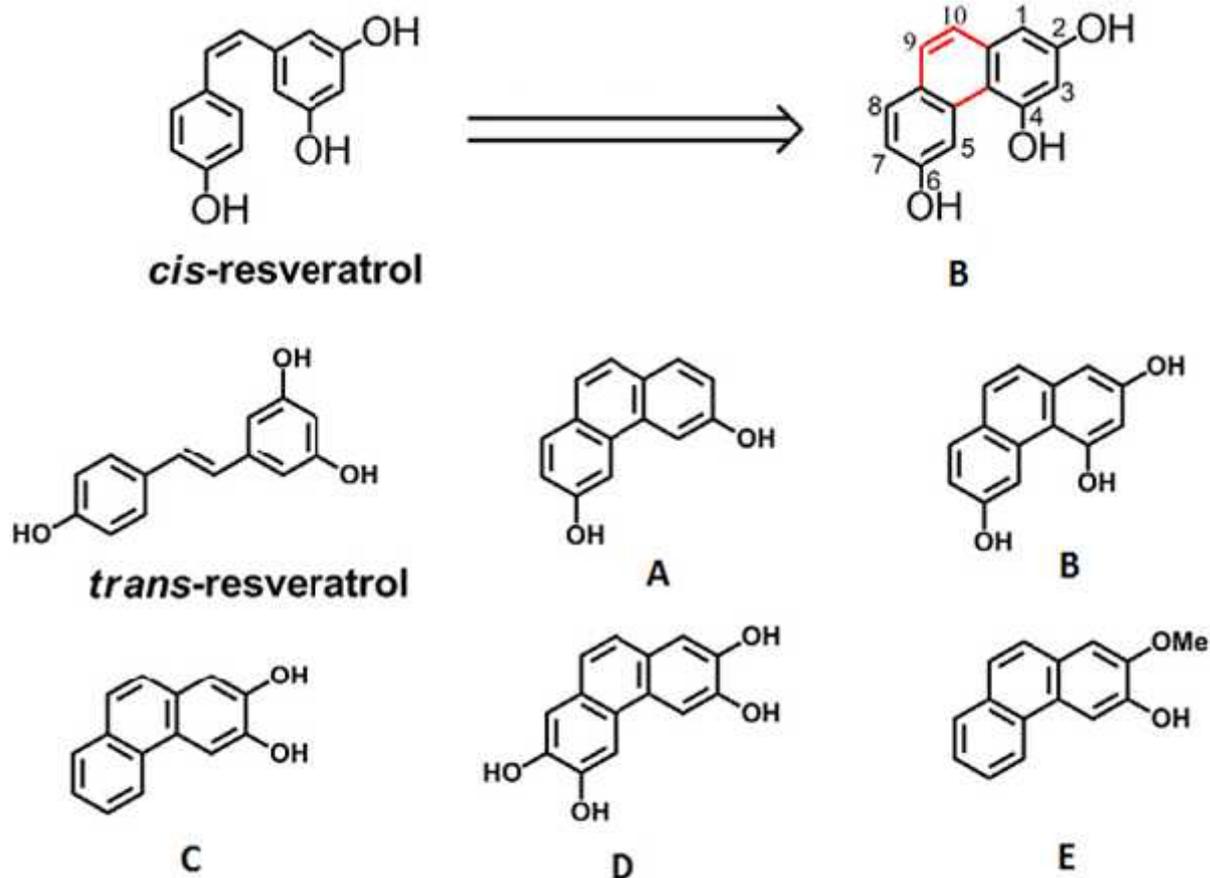


Figure (IV.28): Structures moléculaires du RSV et ses analogues phénanthréniques (D'après Ding *et al.*, 2012).

IV.3.2.1 Propriétés structurales et énergétiques

Après une pré-optimisation de la géométrie du resvératrol avec la méthode semi-empirique AM1, le niveau de calcul B3LYP/6-311G (d,p) de la DFT (figure (IV.29)) nous offre une optimisation complète de la structure de cette molécule avec une prédiction proche de celle obtenue par le niveau B3LYP/6-31G** utilisé dans la partie précédente. Il faut noter que les structures optimisées par les deux méthodes sont toutes les deux proches de la structure cristallisée du resvératrol.

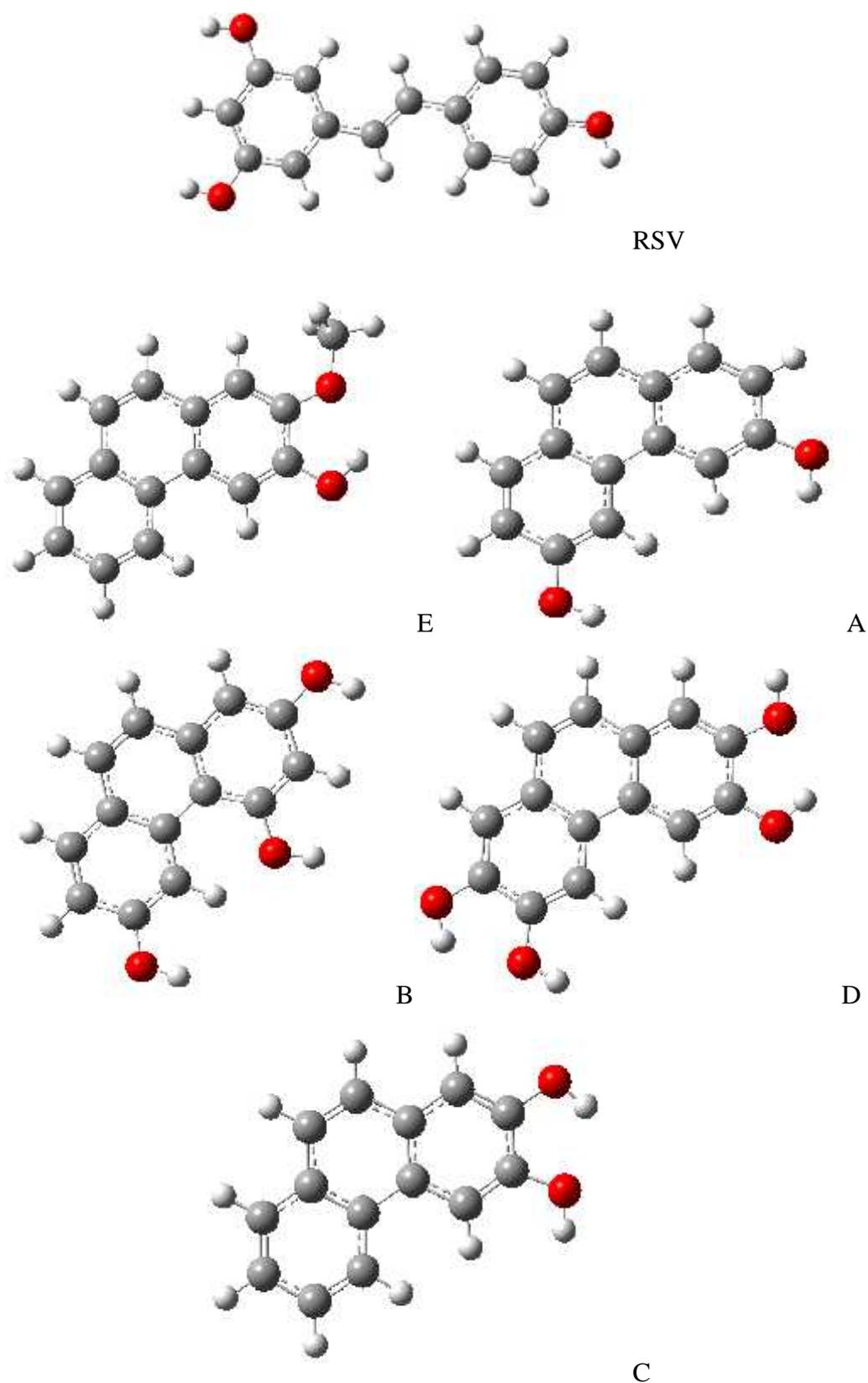


Figure (IV.29): Structures chimiques optimisées par la méthode B3LYP/6-311G (d, p) du RSV et ses analogues phénanthréniqes.

Les valeurs des angles de dièdre ($C_6-C_1-C_8-C_7$) et ($C_8-C_7-C_1-C_2$) indiquent que tous les analogues phénanthréniques du resvératrol étudiés ont des structures strictement planes, ce qui laisse supposer que la délocalisation des électrons aura lieu sur l'ensemble de la molécule.

D'autre part, les atomes d'hydrogène de tous les groupements OH se situent pratiquement sur le plan des cycles phényles de tous les composés, ceci facilite le transfert d'électrons après la rupture de la liaison O-H.

Pour les composés C et D, la formation des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les hydrogènes portés par les oxygènes des carbones 3 et 4 avec des longueurs de 2,1137 et 2,1142 Å respectivement, explique la stabilité de ces composés. Cependant, le radical formé après la rupture de la liaison O-H de l'hydroxyle sur les positions 3 et 4 inclut de fortes liaisons hydrogène (de 2,0105 et 2,0140 Å pour le composé C et 2,0057 et 2,0145 Å pour le composé D, respectivement). La liaison hydrogène stabilise les radicaux en position 3 et 4, ce qui favorise le départ de l'atome d'hydrogène.

a) Orbitales HOMO et LUMO

Comme il a déjà été mentionné dans la partie précédente, les orbitales HOMO et LUMO sont des paramètres importants pour la prédiction de l'activité antiradicalaire. Ces deux orbitales jouent un rôle particulier dans les mécanismes de piégeage des radicaux libres. La densité de ces orbitales peut fournir plus d'informations sur les sites mis en jeu au sein de ce processus.

Comme la montre la figure (IV.30), les deux orbitales HOMO et LUMO du composé A, dans son état fondamental, sont distribuées sur toute la molécule, à l'exception des groupements hydroxyles sur les positions 3 et 6 pour les orbitales LUMO.

Le composé A peut être attaqué par les agents électrophiles, seulement. En revanche, les orbitales HOMO sont essentiellement réparties sur les trois (03) positions hydroxyles du composé B tandis que ces orbitales sont absentes sur les positions 3 et 5 du resvératrol. Par confrontation avec le resvératrol, tous les groupes hydroxyles du composé B peuvent facilement subir des attaques électrophiles. Dans les composés C et D, les orbitales HOMO et LUMO sont distribuées le long des molécules à l'exception des sites 2-OH et 2-OCH₃ pour les orbitales LUMO.

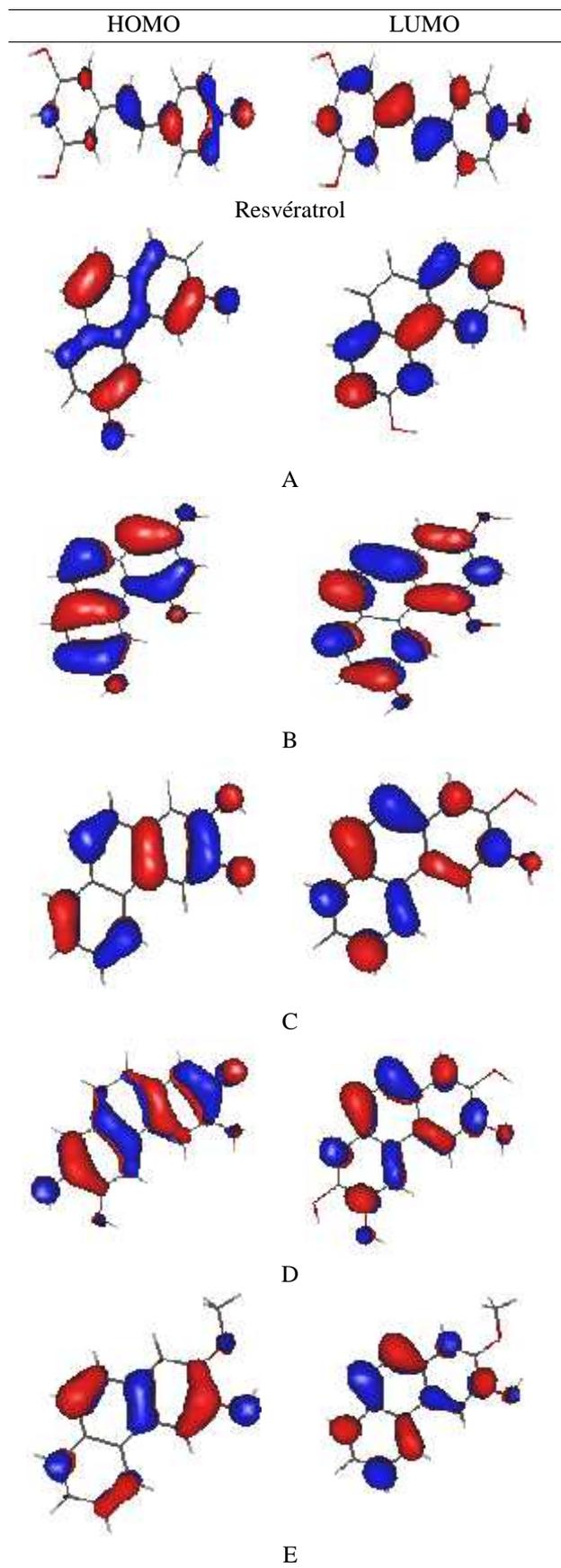


Figure (IV.30): Distribution des orbitales HOMO et LUMO des composés étudiés.

Il faut souligner que la densité élevée des orbitales HOMO au niveau du pont éthylénique C7=C8 du resvératrol et C9=C10 des phénanthrènes assure la délocalisation des électrons entre les deux cycles A et B, ce qui contribue à la stabilité du radical après le départ de l'atome d'hydrogène. Cette observation a été constatée pour tous les analogues phénanthréniques du resvératrol.

b) Enthalpie de dissociation de liaisons (BDE)

Le resvératrol et ses analogues peuvent protéger les dommages cellulaires soit par un don d'un atome d'hydrogène ou d'un électron. Les molécules ayant des valeurs faibles de BDE pourraient présenter une forte activité antioxydante.

En particulier, les faibles valeurs de la BDE (comparées avec celle de la rupture de la liaison O-H de l'eau; 498 kJ/mol) indiquent que l'antioxydant peut donner facilement un atome d'hydrogène lors d'une réaction avec les radicaux libres.

Il a été souligné que les valeurs de la BDE en phase gazeuse et en solution ne varient pas toujours dans le même sens. Les valeurs de BDEs calculées en phase condensée sont généralement plus faibles que celles obtenues en phase gazeuse. Les BDEs calculées en phase gazeuse, dans l'eau et dans le benzène sont reportées dans le tableau (IV. 16).

La position 4'-OH du resvératrol présente la plus faible valeur de la BDE dans tous les milieux étudiés, c'est donc le premier site qui peut donner son atome d'hydrogène, suivi de la position 3-OH.

Pour le composé B, l'analogue phénanthrénique du resvératrol, obtenu par le blocage de la rotation du pont oléfinique, les valeurs de BDEs des positions 2-OH, 4-OH et 6-OH (confrontés avec le 5-OH, 3 - OH et 4'-OH du resvératrol) en phase gazeuse, sont 87,63; 81,89 et 88,21 kcal/mol, respectivement.

Notons que la valeur de la BDE en position 6-OH est presque la même pour le resvératrol que pour le composé B (avec une différence de 0,7 kcal / mol). En revanche, une diminution de la valeur de la BDE en position 4-OH de 7,71 kcal / mol a été constatée. Par conséquent, le site 4-OH du composé B représente le premier site qui peut donner son atome d'hydrogène parmi tous les composés étudiés, en phase gazeuse.

Tableau (IV.16): Les valeurs des BDEs [kcal/ mol] obtenues au niveau B3LYP/6-311G (d,p) de la DFT.

Composé	BDE ^a (phase gazeuse)	BDE ^b (phase gazeuse)	BDE ^b (eau)	BDE ^b (benzène)
<i>Trans</i> RSV				
Radical 4'-OH	78,6620	85,2472	84,4685	84,7634
Radical 3ou 5-OH	82,8758	89,6047	90,0063	89,5965
A				
Radical 3ou 6-OH	80,2804	86,7683	86,3228	86,3629
B				
Radical 2-OH	84,4263	85,9494	88,0905	88,1288
Radical 4-OH	71,1307	76,7457	83,6088	82,4203
Radical 6-OH	79,4458	91,1822	86,9930	87,6054
C				
Radical 2-OH	74,9591	80,0891	82,7993	81,7031
Radical 3-OH	73,8722	81,1640	81,5688	80,5698
D				
Radical 2-OH	73,8591	80,0565	81,2977	80,4361
Radical 3-OH	72,7603	79,6222	80,8446	79,9981
E				
Radical 3-OH	82,5469	89,2150	86,7100	88,1037

^a BDEs : calculées avec correction. ^b BDEs : calculées sans correction.

L'introduction d'une simple liaison entre les deux cycles A et B dans le resvératrol, pour obtenir la forme phénanthrénique, crée un nouveau pharmacophore sur la position 4-OH (3-OH du resvératrol). Cette observation est valable pour tous les milieux étudiés. Dans le benzène et les milieux aqueux, l'arrachement de l'atome d'hydrogène le plus facile dans tous les phénanthrènes étudiés est la position 3-OH, qui est le site opposé à la position 4'-OH du resvératrol.

D'après les valeurs calculées des BDEs, les piègeurs des radicaux les plus efficaces dans tous les milieux étudiés, sont pratiquement les composés qui incluent un groupement catéchol. L'activité antiradicalaire de la molécule C (avec un seul groupement catéchol) est plus faible que celle du composé D (avec deux groupes catéchols) mais supérieure à celle du composé B.

La présence d'un groupement méthoxy en position C-2 dans le composé E a mené à une augmentation de la valeur de la BDE de 5 kcal/mol. La formation de la liaison hydrogène intramoléculaire entre le groupe hydroxyle et le groupe méthoxy explique les valeurs élevées des BDEs dans le composé E.

Les BDEs en phase gazeuse suivent la séquence: $D < C < B < RSV < A < E$.

Néanmoins, les composés C et D peuvent donner un second atome d'hydrogène pour former une quinone, comme il est illustré sur la figure (IV.31). Les valeurs des BDEs pour la formation des quinones pour les composés C et D sont 165,0380 et 150,3549 kcal / mol, respectivement. La BDE de formation de l'ortho-quinone des composés C et D est inférieure à la somme des BDEs de l'arrachement simultané des deux atomes d'hydrogènes des positions 2 et 3-OH. Ceci est en accord avec le résultat obtenu par Ding *et al.* (2012). Ces résultats expliquent la valeur élevée de la constante k (la constante de vitesse de second ordre) et les grandes valeurs de n des deux composés (n est le facteur stœchiométrique, c'est le nombre des radicaux DPPH[•] réduits par une seule molécule d'antioxydant, n est calculé par l'équation, $n = 1 / (EC_{50} \times 2)$) trouvés expérimentalement. L'hypothèse de la contribution des phénolates au piégeage des radicaux DPPH[•] pourrait être proposée.



Figure (IV.31): Formes quinones des composés C et D.

Il faut souligner que dans l'eau et le benzène, les BDEs suivaient la séquence $D < C < B < RSV < A < E$, et ceci est en parfait accord avec les résultats obtenus par Ding *et al.* (2012). Il faut noter que, dans tous les milieux étudiés, il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs des BDEs.

d) La densité de spin

La propriété la plus importante des radicaux formés après l'arrachement de l'atome d'hydrogène est la densité de spin qui caractérise la distribution du spin électronique dans les radicaux libres et assure leur stabilité. Il faut souligner que le radical est d'autant plus facilement formé que sa densité de spin est mieux répartie sur le radical (Parkinson *et al.*, 1999). Comme le montre le tableau (IV.17), les valeurs de la densité de spin, en phase

gazeuse, sur les atomes d'oxygène en position 4'-OH, 3-OH et 5-OH des radicaux du resvératrol sont de 0,3050 ; 0,3939 et 0,3939, respectivement. Tandis que pour le composé B, ces valeurs sont de 0,3422; 0,2733 et 0,3828, respectivement. La cyclisation a pour effet la réduction des valeurs de la densité de spin, surtout en position 3-OH. Ces résultats sont en accord avec les valeurs des BDEs calculées en solution.

Tableau (IV.17): La densité de spin sur l'atome d'oxygène des radicaux du RSV et ces analogues phénanthréniques.

Composé	densité de spin (dans le vide)	densité de spin (dans l'eau)	densité de spin (dans le benzène)
<i>Trans</i> RSV			
Radical 4'-OH	0,3050	0,2730	0,2914
Radical 3ou 5-OH	0,3939	0,3604	0,3794
A			
Radical 3ou 6-OH	0,3532	0,3149	0,3365
B			
Radical 2-OH	0,3828	0,3150	0,3384
Radical 4-OH	0,2733	0,2568	0,2660
Radical 6-OH	0,3422	0,3267	0,3457
C			
Radical 2-OH	0,3404	0,3244	0,3329
Radical 3-OH	0,3242	0,3073	0,3168
D			
Radical 2-OH	0,3314	0,3117	0,3228
Radical 3-OH	0,3190	0,3003	0,3107
E			
Radical 3-OH	0,3466	0,3190	0,3345

D'autre part, il faut noter que dans le radical STL-4'-O[•] du resvératrol, l'électron célibataire est réparti sur toute la molécule. Bien que le radical STL-3-O[•] a la même structure de résonance que le radical STL-4'-O[•], l'électron célibataire est distribué principalement sur le noyau A dans le radical STL-3-O[•] (Figure (IV.32)). Par contre pour le composé B, les électrons non appariés des radicaux formés en position 2-OH, 4-OH et 6-OH sont pratiquement distribués sur toute la molécule. De plus, les formes semi-quinones sont plus stables après l'arrachement de l'atome d'hydrogène, et par conséquent, l'activité

antioxydante du composé B augmente, suggérant l'importance de la construction d'un noyau phénanthrénique.

Les valeurs calculées en phase gazeuse de la densité de spin sur l'atome d'oxygène du groupe 3-OH dans les composés A, C, D et E sont 0,3532 ; 0,3242 ; 0,3314 et 0,3466, alors que sur la position 2-OH de C et D elles sont de 0,3404 ; 0,3314. Ces valeurs sont en excellent accord avec les valeurs des BDEs et ceci est valable pour tous les milieux étudiés.

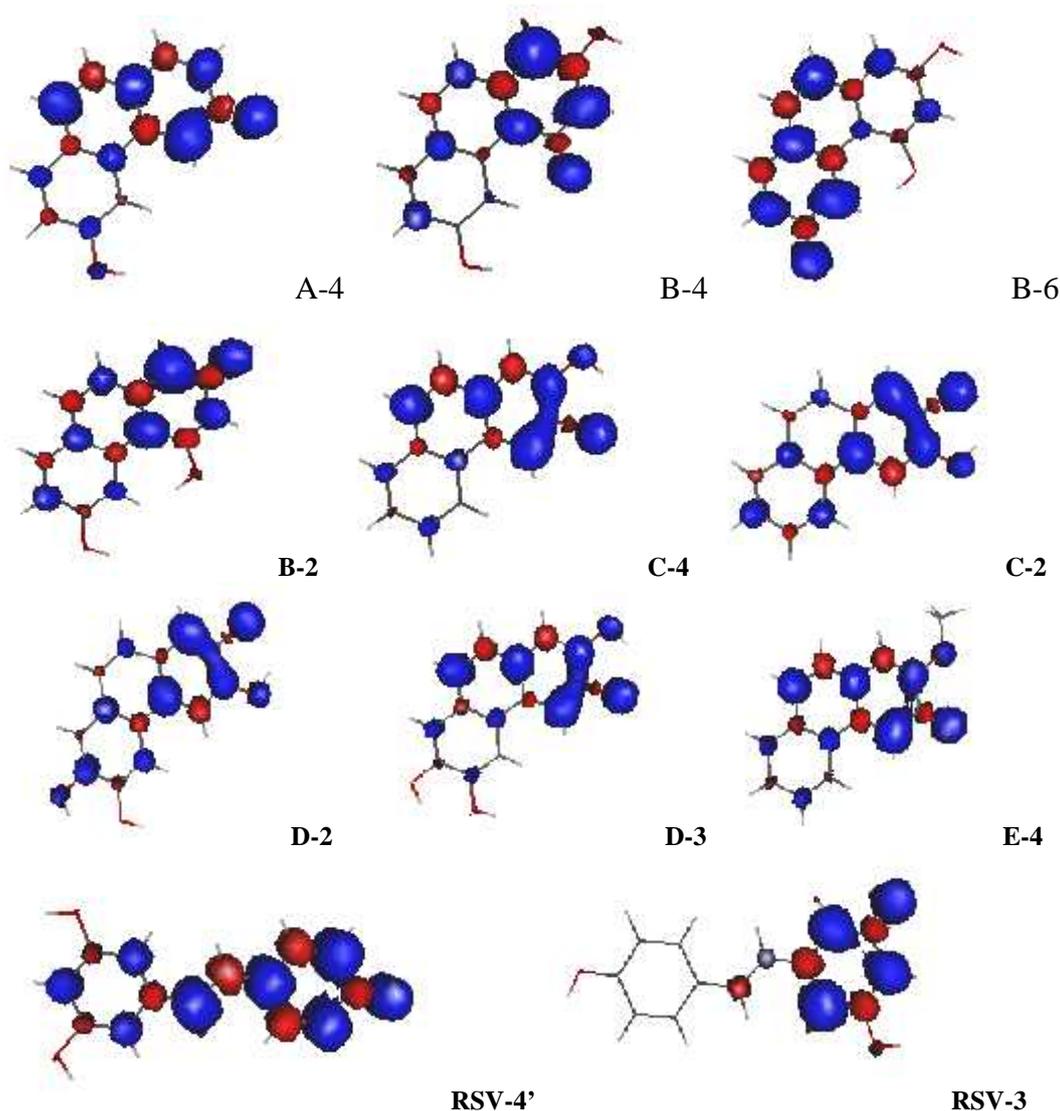


Figure (IV.32): Distribution de la densité de spin dans les antioxydants étudiés.

IV.3.2.2. Le mécanisme SET-PT

a) Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP)

L'AIP représente l'enthalpie de réaction de la première étape du mécanisme SET-PT (équation (I.2)). Le tableau (IV.18) résume les valeurs de l'AIP calculées dans le benzène,

dans l'eau et en phase gazeuse. Les valeurs du potentiel d'ionisation des molécules étudiées étaient plus élevées en phase gazeuse qu'en solution. Notons qu'avec l'augmentation de la polarité du solvant, les valeurs de l'AIP ont diminué remarquablement. Il faut souligner que les solvants influent sur les valeurs de l'AIP, parce que des espèces solvatées et chargées sont mises en jeu.

Comme le montre le tableau (IV.18), les valeurs de l'AIP calculées diminuent avec l'augmentation de la polarité du solvant, elles diminuent suivant la séquence: Phase gazeuse > benzène > eau. La moyenne de la différence entre les valeurs de l'AIP en phase gazeuse et en phase aqueuse est de 61,4651 kcal/mol.

Tableau (IV.18): Valeurs des PDEs et AIPs [kcal/mol] obtenues au niveau B3LYP/6-311G (d,p).

Composé	PDE (phase gazeuse)	PDE (eau)	PDE (benzène)	AIP (phase gazeuse)	AIP (eau)	AIP (benzène)
<i>Trans</i> RSV				157,6898	98,5814	135,8287
Radical 4'-OH	240,8462	14,2381	48,0853			
Radical 3 ou5-OH	245,2037	19,7759	52,9184			
A				162,0943	99,6714	142,8342
Radical 3 ou6-OH	234,9194	15,0024	42,1146			
B				162,2700	99,5258	137,0643
Radical 2-OH	242,1402	16,9157	49,1327			
Radical 4-OH	227,7037	12,4340	44,5132			
Radical 6-OH	236,9074	15,8182	45,7265			
C				166,6280	104,2679	143,0369
Radical 2-OH	227,7896	6,8825	37,2520			
Radical 3-OH	226,7147	5,6519	36,6834			
D				160,1189	99,8534	137,528
Radical 2-OH	236,1073	9,7954	41,4940			
Radical 3-OH	232,7740	9,3461	41,0560			
E				161,7529	102,2197	139,5925
Radical 3-OH	240,7352	12,8413	47,0970			

La moyenne de la différence entre les valeurs de l'AIP dans le benzène et dans l'eau a atteint 38,8784 kcal /mol. Il faut souligner que la polarité des solvants a plus d'influence sur les valeurs de l'AIP que sur les valeurs des BDEs.

b) Enthalpies de dissociation du Proton

L'enthalpie de dissociation du proton est directement liée à la deuxième étape du mécanisme SET-PT. L'équation (I.3) peut déterminer le cation radicalaire le plus thermodynamiquement préféré pour subir la première déprotonation formé dans la première étape. Les valeurs des PDEs sont reportées dans le tableau (IV.18).

Comme le montre le tableau (IV. 19), les valeurs des PDEs du phénol étaient de 6 kJ/mol dans l'eau et 862 kJ/mol, dans le vide, avec la méthode B3LYP/6-311++ G ** (Klein *et al.*, 2007). D'autre part, la PDE de l'indole-3- carbinol en phase aqueuse est inférieure de 878 kJ/mol de celle en phase gazeuse (Najafi *et al.*, 2012), tandis que la PDE de la structure de base de la chromane dans l'eau est inférieure de 864,5 kJ /mol, à celle obtenue en phase gazeuse (Najafi *et al.*, 2011). Ces études sont en accord avec celle d'Urbaniak *et al.* (2013), qui ont étudié l'activité antioxydante de l'acide ferulique. De façon générale, les valeurs des PDEs calculées dans l'eau sont significativement inférieures à celles obtenues en phase gazeuse, en raison de la large enthalpie d'hydratation du proton.

Tableau (IV.19): Valeurs des PDEs du phénol, obtenues en phase gazeuse et dans l'eau (Klein *et al.* 2007).

Base de calcul	PDE (phase gazeuse)	PDE (eau)
6-311++G**	862	6
6-311++G(2d,2p)	867	10
6-311++G(2df,2pd)	868	12

Récemment Mikulski *et al.* (2010) ont calculé les PDEs du resvératrol, les valeurs étaient de 322,582 et 281,161kcal/mol en phase gazeuse et dans l'eau, respectivement. D'autre part, Lu *et al.* (2013) ont trouvé 233,58 et 266,12 kcal/mol pour le même paramètre, calculé avec la même méthode B3LYP/6-311G (d,p). Bien que ces auteurs aient utilisé la même méthode de calcul, leurs résultats étaient différents et contradictoires. En plus, l'effet de l'hydratation sur l'enthalpie de déprotonation n'a pas été étudié. C'est la raison pour laquelle nous avons pris ce paramètre en compte dans nos calculs.

Dans notre travail, les enthalpies de solvation du proton, $H_{\text{solv}}(\text{H}^+)$, -1090 kJ / mol pour l'eau et -894 kJ / mol pour le benzène, ont été utilisées. Comme il est montré sur le tableau (IV.18), les valeurs des PDEs de tous les composés ont diminué significativement pour des calculs en solution par rapport à ceux effectués en phase gazeuse.

Cependant, les valeurs de l'AIP sont inférieures à celles du PA en phase gazeuse. On peut supposer que la première étape du mécanisme SET-PT est possible sous vide, ce résultat est en accord avec ceux d'Urbaniak *et al.* (2013).

IV.3.2.3. Le mécanisme SPLET

a) L'affinité du proton

Ding *et al.* (2012) ont étudié l'effet de l'addition de l'acide acétique sur la capacité du composé B à piéger le radical DPPH[•] dans le méthanol. La constante k ($1.74 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) diminue avec l'augmentation de la concentration de l'acide acétique pour atteindre une valeur limite de $1.46 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ces auteurs ont supposé que la réaction se déroule selon le mécanisme SPLET et l'espèce donneuse d'électron est l'anion phénolate formée après déprotonation du composé B.

L'affinité du proton représente l'enthalpie de la réaction de la première étape du mécanisme SPLET (Equation (I.4)). Celle-ci correspond à l'affinité du proton de l'anion phénoxyde ArO^- . Plusieurs études expérimentales ont confirmé que les anions phénoxydes formés après la déprotonation des flavonoïdes sont de meilleurs donneurs d'électrons et piègeurs de radicaux libres que leurs molécules mères neutres (Musialik *et al.*, 2009). Comme le montre le tableau (IV.20), l'eau en tant que milieu de solvation a considérablement changé l'enthalpie de formation des anions, ce qui n'était pas le cas pour les deux autres environnements.

A titre d'exemple, la valeur du PA calculée en phase aqueuse pour le resvératrol est inférieure de 1263,0834 kJ /mol à celle calculée en phase gazeuse. Il faut souligner que la valeur de l'enthalpie d'hydratation du proton en phase aqueuse est la raison principale pour que les valeurs des PAs effectuées dans l'eau soient significativement inférieures à celles obtenues sous vide. Les groupes donneurs d'électron augmentent légèrement les valeurs des PAs. Ce dernier résultat est en bon accord avec ceux de l'étude sur le phénol substitué en phase aqueuse (Klein *et al.*, 2007).

Tableau (IV.20): Valeurs des PAs et ETEs [kcal/mol] obtenues au niveau B3LYP/6-311G (d, p) de la DFT.

Composé	PA (phase gazeuse)	PA (eau)	PA (benzène)	ETE (phase gazeuse)	ETE (eau)	ETE (benzène)
<i>Trans</i> RSV						
Radical 4'-OH	345,2838	43,3996	128,0844	53,1598	69,4152	55,2649
Radical 3ou 5-OH	352,4061	46,5141	115,4766	50,3950	71,8385	72,7058
A						
Radical 3ou 6-OH	348,6906	45,1552	112,3080	49,2865	72,5940	72,6409
B						
Radical 2-OH	348,1538	44,2748	110,7792	54,2372	72,1620	75,4122
Radical 4-OH	335,9308	40,4323	106,1026	52,0237	75,2063	72,5940
Radical 6-OH	342,6766	46,5574	115,6436	54,4257	68,7819	66,5768
C						
Radical 2-OH	337,7255	37,4248	102,6575	53,6553	72,5940	76,4106
Radical 3-OH	337,6426	37,3211	102,7450	54,6472	73,7208	77,6314
D						
Radical 2-OH	338,8695	38,4827	103,3777	52,9939	71,1613	75,2063
Radical 3-OH	338,8695	38,1300	103,5219	52,3957	71,0647	75,0621
E						
Radical 3-OH	353,2672	46,6752	116,0362	47,1565	68,3810	70,6533

Nous devons noter que les valeurs des PDEs obtenues dans cette étude sont inférieures à celles des PAs. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le processus de déprotonation se passe mieux sur le cation radicalaire formé que sur la molécule mère neutre. En revanche, dans l'eau et le benzène, les valeurs des PAs obtenues sont inférieures à celle des BDEs et AIPs.

Comme il est mentionné dans la section IV .3.2.1 b (BDE), l'arrachement de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant se déroule partiellement, en parallèle avec le don d'électron de l'anion formé. L'hypothèse stipulant que la cinétique du piégeage du radical DPPH[•] est gouvernée par le mécanisme SPLET peut être proposée.

Les résultats de calculs indiquent également que le mécanisme SPLET est le processus le plus thermodynamiquement favorisé en phase aqueuse, parce que les valeurs des PAs dans l'eau, pour toutes les molécules étudiées sont très inférieures à celles des AIPs et BDEs.

b) Enthalpie de transfert de l'électron (ETE)

L'enthalpie de transfert de l'électron représente l'enthalpie de la réaction de la deuxième étape du mécanisme SPLET (Equation (I.5)). Les résultats ont révélé que les valeurs des ETEs (tableau (IV.20)) en phase liquide sont plus élevées que celles obtenues en phase gazeuse. La comparaison entre les ETEs et les PAs a révélé que la valeur de la PA la plus élevée lui correspond une faible valeur de l'ETE, et vice versa.

Les groupes attracteurs d'électrons ont la capacité de stabiliser les anions ArO^- , tandis que les groupes donneurs d'électrons ont un effet inverse. Par conséquent, les groupes donneurs d'électrons diminuent l'ETE (Brinck *et al.*, 1997), ce qui explique la faible valeur de l'ETE du composé E.

❖ Mécanisme le plus thermodynamiquement favorisé

Nous pouvons conclure que les enthalpies des réactions étudiées suivent les séquences:

Phase gazeuse: $\text{BDE} < \text{AIP} < \text{PA}$.

Benzène: $\text{BDE} < \text{PA} < \text{AIP}$.

Eau: $\text{PA} < \text{BDE} < \text{AIP}$.

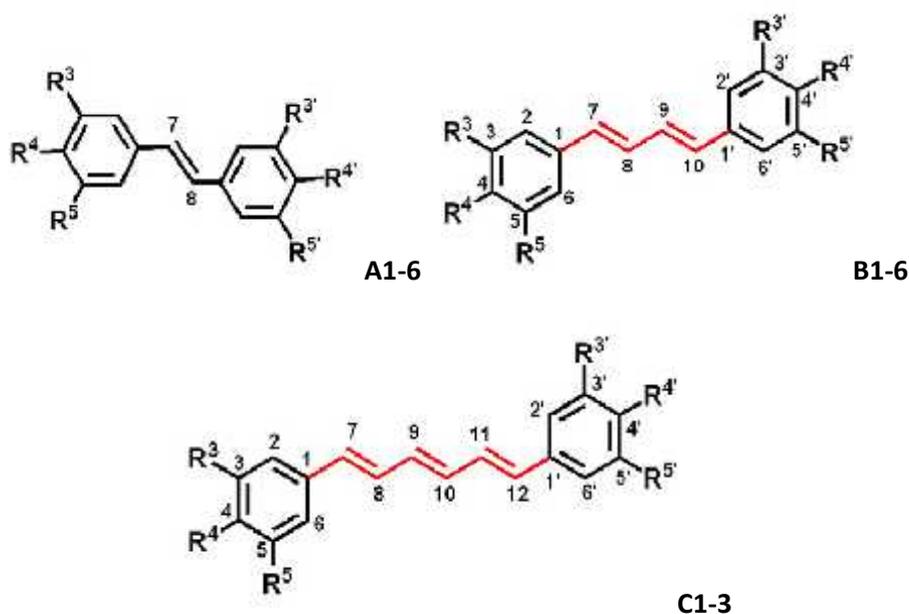
Il est bien clair que le mécanisme HAT est le processus dominant en phase gazeuse et dans le benzène, parce que les valeurs des BDEs des groupes OH sont nettement inférieures à celles des valeurs de l'AIP et de la PA correspondantes. D'autre part, en phase aqueuse, les valeurs de la PA des groupes OH des composés étudiés sont significativement inférieures à celles des BDEs correspondantes.

Ainsi, le mécanisme SPLET représente la voie réactionnelle la plus thermodynamiquement probable dans les solvants polaires. Le mécanisme SET-PT n'est préféré dans aucun des milieux étudiés, parce que les valeurs des AIPs sont toujours plus élevées que celles des BDEs et PAs. En raison de la grande enthalpie de solvation du proton dans les solvants étudiés, les valeurs des PAs sont significativement inférieures à celles obtenues en phase gazeuse. En revanche, il n'y a pas une grande différence entre les valeurs des BDEs dans tous les milieux étudiés.

IV.3.3. Effet de l'élongation du pont oléfinique du resvératrol et ses dérivés sur l'activité antioxydante

L'amélioration du pouvoir antioxydant des stilbènes, a connu une grande importance lors de cette dernière décennie. L'élongation du pont oléfinique du resvératrol est une stratégie qui a été testée expérimentalement et a fait l'objet de plusieurs recherches. L'objet de cette partie de thèse est d'établir au moyen de la DFT, les fondements théoriques de cette approche et de déterminer le mécanisme possible du processus de piégeage des radicaux libres par les molécules ayant subi une élongation du pont éthylénique par rapport au stilbène d'origine.

Cette étude porte sur quinze (15) stilbènes distribués en trois groupes. Le groupe A contient le resvératrol et quatre analogues qui diffèrent par le nombre et la position des groupements donneurs d'électrons tel que les groupements hydroxyles et les groupements méthoxy. Les composés classés dans le groupe B sont les analogues des composés du groupe A obtenus par l'ajout d'une double liaison au pont oléfinique (C7=C8). Alors que le groupe C contient trois composés avec trois liaisons doubles conjuguées (figure (IV.33))



	R3	R4	R5	R3'	R4'	R5'
1	OH	H	OH	H	OH	H
2	H	OH	H	H	H	H
3	H	OH	H	H	OH	H
4	OH	OH	H	H	H	H
5	H	OH	H	H	OCH3	H
6	OCH3	OH	H	H	H	H

Figure (IV.33): Structures moléculaires du resvératrol et ses analogues.

IV.3.3.1 Propriétés structurales et énergétiques

Dans un premier temps, toutes les espèces étudiées ; molécules neutres, radicaux, cations radicalaires et anions ont fait l'objet d'une première optimisation avec la méthode semi-empirique PM6, ces composés ont été soumis à une optimisation totale avec la méthode DFT au niveau de calcul B3LYP/6-31G** (figure (IV.34)). Comme il a déjà été mentionné dans la section précédente, cette méthode nous offre une approche très satisfaisante en comparant les résultats actuels avec ceux obtenus par RX (Billes *et al.*, 2007).

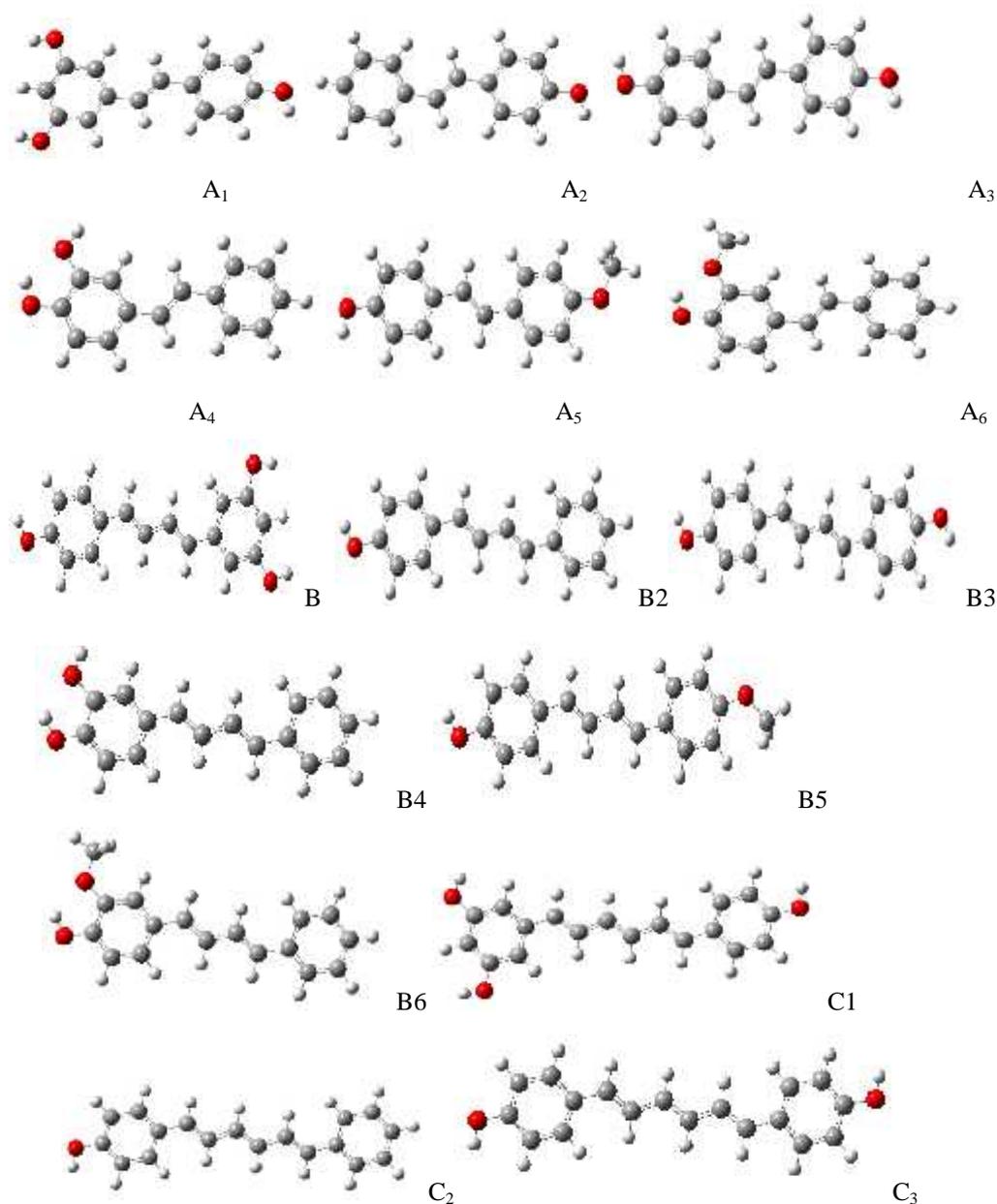


Figure (IV.34): Structures chimiques optimisées avec la méthode B3LYP/6-31G** du RSV et ses analogues.

Les valeurs des angles de dièdre ($C_6-C_1-C_7-C_8$) et ($C_2-C_1-C_7-C_8$), ($C_2-C_1-C_9-C_{10}$) et ($C_2-C_1-C_{11}-C_{12}$) pour les groupes de composés A, B et C respectivement, indiquent que tous les analogues du resvératrol étudiés possèdent une structure strictement plane, ceci laisse supposer que les électrons sont délocalisés sur l'ensemble de la molécule.

En revanche, les atomes d'hydrogène de tous les groupes OH se situent pratiquement dans le plan des cycles phényles de tous les composés, ce qui facilite le transfert d'électrons après la rupture de la liaison O-H. L'élongation n'a pas un effet remarquable sur la planéité des composés optimisés.

La formation des liaisons hydrogène intramoléculaires dans les composés A4 et B4 entre l'hydrogène porté par l'oxygène du carbone 4 et celui porté par le carbone 3 avec des longueurs de 2,1201 et 2,0751 Å respectivement, explique la stabilité de ces espèces. Cependant, les radicaux formés après rupture des liaisons O-H des positions 3 et 4 incluent de plus fortes liaisons hydrogène (de 1,9485 et 1,9717 Å respectivement). Ces liaisons hydrogène stabilisent les radicaux, ce qui favorise le départ de l'atome d'hydrogène. Dans un premier temps, on peut dire que l'activité antioxydante est élevée au sein des composés qui contiennent l'entité catéchol.

a) Orbitales HOMO et LUMO

L'énergie des orbitales HOMO est l'un des paramètres les plus appropriés caractérisant l'aptitude des antioxydants, tel que les composés phénoliques, à donner des électrons pour piéger les radicaux libres, car ce processus est aussi gouverné par le transfert d'électron. La molécule est considérée comme un bon donneur d'électrons lorsqu'elle présente des valeurs HOMO élevées. En revanche, LUMO représente l'aptitude d'une molécule à recevoir des électrons. La distribution des orbitales HOMO sur la molécule indique qualitativement les sites actifs responsables du piégeage des radicaux libres.

Comme le montre la figure (IV.35) les groupes hydroxyles des positions 4 et 4' sont facilement attaquables par des agents électrophiles ou des agents nucléophiles.

Les orbitales HOMO sont délocalisées sur toutes les molécules étudiées, en particulier sur les positions 4 et 4'-OH. Une contribution significative de la densité des HOMO sur toutes les doubles liaisons entre les cycles A et B du resvératrol et ses analogues a été observée. Ces doubles liaisons contribuent à l'activité antioxydante, car elles assurent la délocalisation des électrons entre les cycles A et B et améliorent la stabilisation du STL-O[•] après l'arrachement d'hydrogène. Il faut souligner que les orbitales HOMO sont absentes sur les positions 3 et 5-OH des composés A1, B1 et C1.

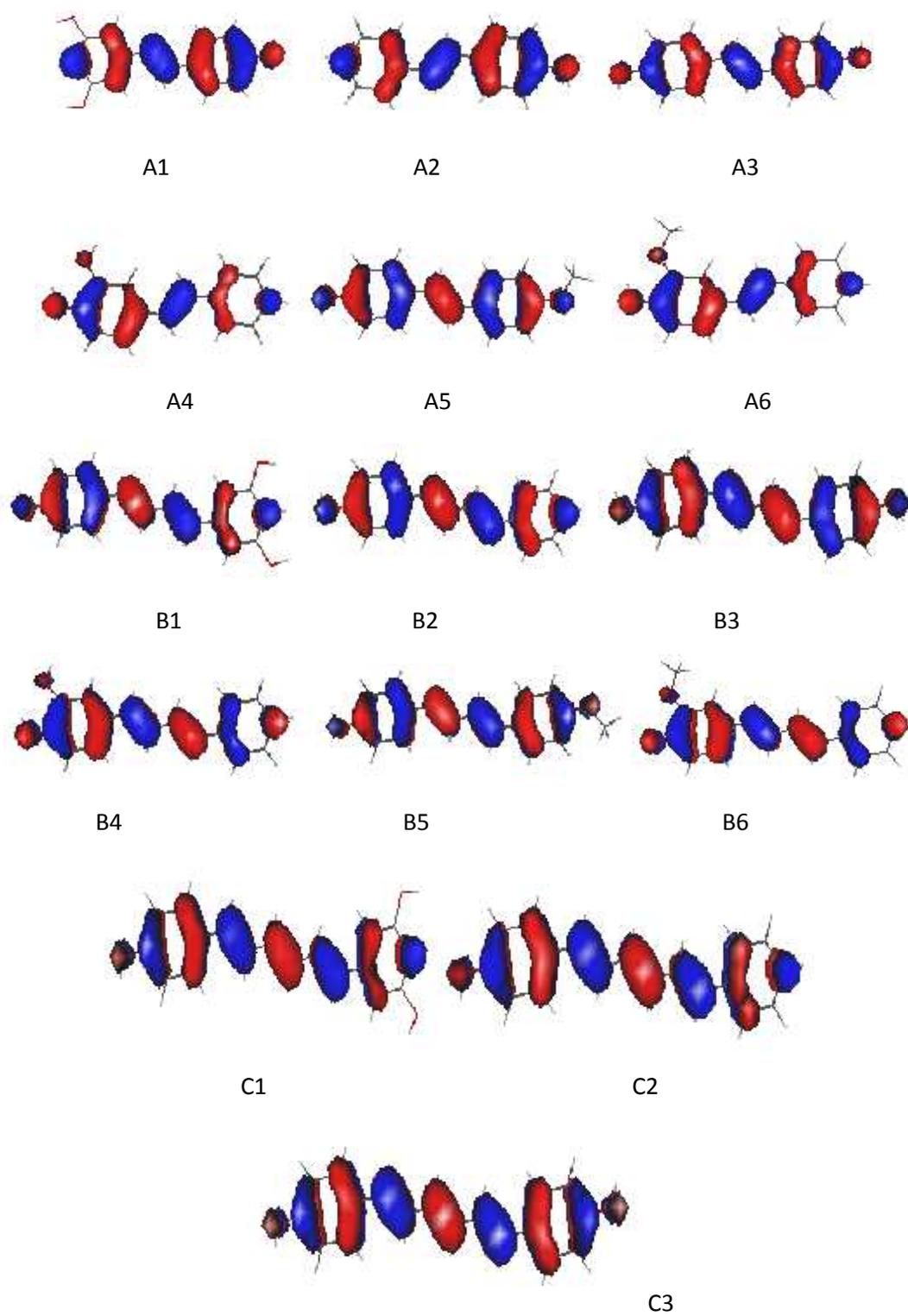


Figure (IV.35): Distributions des orbitales HOMO des composés étudiés.

Les calculs ont montré que les énergies des orbitales HOMO suivent la séquence: triène > diène > ène. La valeur de l'HOMO du composé A1 est de -5,2183 eV, alors que les composés B1 et C1 ont des valeurs de -5,0087 et -4,8858 eV respectivement. Il faut souligner que l'élongation du pont oléfinique du resvératrol et de ses dérivés augmente les valeurs des énergies des orbitales HOMO. Dans le groupe B, la valeur de l'HOMO du composé B2 est de -5,0259 eV, l'ajout des groupes hydroxyles (composés B1, B3 et B4) augmente cette valeur à -5,0087, -4,8392 et -4,9761 eV, respectivement. Le groupement méthoxy améliore la valeur de l'HOMO à -4,8074 et -4,9190 eV dans les composés B5 et B6, respectivement. Le composé C3 possède le caractère nucléophile le plus important avec une valeur de l'HOMO de -4,7260 eV.

b) Enthalpie de dissociation de liaison (BDE)

La BDE est un paramètre thermodynamique très important pour évaluer la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres. Les BDEs calculées en phase gazeuse et dans l'eau sont reportées dans le tableau (IV.21).

Comme le montre le tableau (IV.21), les valeurs des BDEs de tous les composés étudiés suivent la tendance: ène > diène > triène dans les deux phases gazeuse et aqueuse, à l'exception des composés A4 et B4 qui ont montré les valeurs les plus basses des BDEs. Les composés contenant l'entité catéchol (A4 et B4) présentent une activité antiradicalaire très importante en raison de la stabilité du radical formé après l'arrachement de l'atome d'hydrogène, qui diminue par la suite la valeur de la BDE.

La BDE du composé A2 est de 78,2385 kcal/mol, l'addition des groupements hydroxyles diminue cette valeur pour A3 (77,4421kcal/mol), A4 (68,8999 kcal/mol) et A1 (77,7364 kcal/mol). Le même changement a été observé pour l'ajout d'un groupe méthoxy sur la position 4' du composé A5 (76,6985kcal /mol). En revanche, cette dernière valeur augmente à 77,4265 kcal/mol pour A6 à cause de la liaison hydrogène formée entre l'hydrogène du groupe 4-OH et l'atome d'oxygène du groupe méthoxy en position C3. Par conséquent, la BDE sur ce site est élevée parce que l'arrachement de l'atome d'hydrogène implique aussi la rupture de la liaison hydrogène.

Tableau (IV.21): BDEs [kcal/ mol] obtenues au niveau B3LYP/6-31** de la DFT.

Composé	BDE (phase gazeuse)	BDE (eau)	k ₂
A1	77,7364	76,9696	15,7
A2	78,2385	76,7713	9,7
A3	77,4421	75,6029	109
A4	68,8999	69,1345	1,47×10 ³
A5	76,6985	75,5395	33
A6	77,4265	Défavorable	101
B1	76,3340	75,3494	90,8±3,3
B2	76,3158	75,1593	68,0±4,2
B3	75,6908	74,1967	274±5
B4	67,6950	68,4317	(3,36±0,12)×10 ³
B5	75,5653	74,1264	171±7
B6	75,5632	73,8064	282±4
C1	75,3030	74,0097	142±1
C2	75,3155	73,9130	-
C3	74,8185	73,1807	441±13

La formation des liaisons hydrogène intramoléculaires dans les composés A6 et B6, entre l'hydrogène porté par l'oxygène du carbone 4 et l'oxygène du groupe méthoxy en position 3 avec des longueurs de 2,0757 et 2,0836 Å, respectivement, explique les valeurs élevées des BDEs. Il faut souligner que la rupture homolytique du groupe O-H en position C-6 est défavorable en phase aqueuse. Les BDEs des composés étudiés suivent la séquence (à l'exception de A6 dans l'eau): 4 < 5 < 6 < 3 < 1 < 2.

D'autre part, les résultats expérimentaux ont montré que les composés 6 et 3 présentent une capacité de piégeage des radicaux galvinoxyl (GO[•]) plus élevée que celle du composé 5

(Tang *et al.*, 2011). Comme le montre le tableau (IV.21), les BDEs sont caractérisées par les constantes de vitesse du second ordre (k_2). Notons que les composés A3, B3 et C3 peuvent donner un deuxième atome d'hydrogène en formant une structure quinone (Benayahoum *et al.*, 2013). Les BDEs des para-quinones des composés A3, B3 et C3 sont inférieures à la somme des BDEs, correspondant à un arrachement simultané des atomes d'hydrogène en positions 4 et 4' (Benayahoum *et al.*, 2013).

La tendance des BDEs devient $3 < 5$ conformément à celle obtenue avec les valeurs de k_2 . L'allongement du pont oléfinique a diminué les BDEs par augmentation du nombre de structures de résonance pour les radicaux semi-quinones. D'autre part, les composés portant le fragment 3,4ortho-di-hydroxy tels que les composés A4 et B4 ont montré une activité antioxydante importante en raison de l'arrachement des deux atomes d'hydrogène des groupes hydroxyles en position ortho. Cette abstraction peut se produire en continu pour former une structure semi-quinone, ou même une structure quinone (figure (IV.36)).

Les BDEs de formation des quinones à partir des composés A4 et B4 après le don de deux atomes d'hydrogène ont été 157,1094 et 155,0253 kcal/mol respectivement. Les écarts entre ces valeurs et la somme des BDEs correspondant à la perte de deux hydrogènes en position 4-OH et 3-OH sont seulement de 2,7155 et 2,7027 kcal / mol, respectivement. D'autre part, les valeurs de l'HOMO et de la LUMO des molécules mères, des formes semi-quinone et quinone des composé A4 et B4 montrent que la forme semi-quinone peut fournir à nouveau, un autre électron permettant l'arrachement d'un autre atome d'hydrogène de manière à former une quinone.

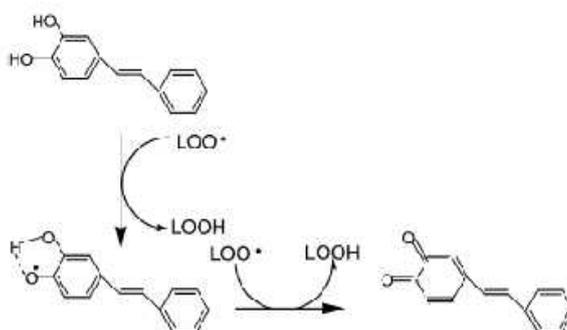


Figure (IV.36): Formation de la forme quinone après arrachement de deux atomes d'hydrogènes.

En revanche, les BDEs des formes para-quinone des composés A3, B3 et C3 sont de 159,1253 ; 158,0582 et 157, 1852 kcal/mol respectivement. Notons que les moitiés de ces

valeurs sont inférieures à celles obtenues pour les formes semi-quinone en positions 4 et 4'-OH.

Ces résultats montrent que les structures semi-quinones et ortho et para-quinones des antioxydants, sont les explications appropriées pour l'activité antioxydante des composés précédents.

Il faut souligner que les BDEs calculées dans l'eau comme milieu de solvation, étaient inférieures à celles obtenues sous vide, à l'exception des molécules A4 et B4.

c) La densité de spin

Un autre paramètre moléculaire corrélé avec l'activité antioxydante est la densité de spin, qui a également été calculée. La densité de spin caractérise la distribution de l'électron dans les radicaux et influe sur leur stabilité. Il faut souligner que plus la densité de spin est délocalisée dans le radical, plus la formation du radical est facile.

La densité de spin est délocalisée dans tous les radicaux formés (figure (IV.37)). Elle est directement liée à la présence des liaisons vinyliques entre les deux cycles A et B.

Tableau (IV.22) : Valeurs de la densité de spin sur l'atome d'oxygène dans les radicaux phénoxy du RSV et ses analogues.

Antioxydant	Densité de spin (dans l'eau)	Densité de spin (phase gazeuse)
A1	0,2871	0,3224
A2	0,2845	0,3203
A3	0,2700	0,3124
A4	0,2853	0,2679
A5	0,2690	0,3109
A6	0,5435	0,3241
B1	0,2489	0,2869
B2	0,2465	0,2856
B3	0,2356	0,2799
B4	0,2673	0,2467
B5	0,2349	0,2786
B6	0,2528	0,2754
C1	0,2201	0,2600
C2	0,2182	0,2592
C3	0,2097	0,2547

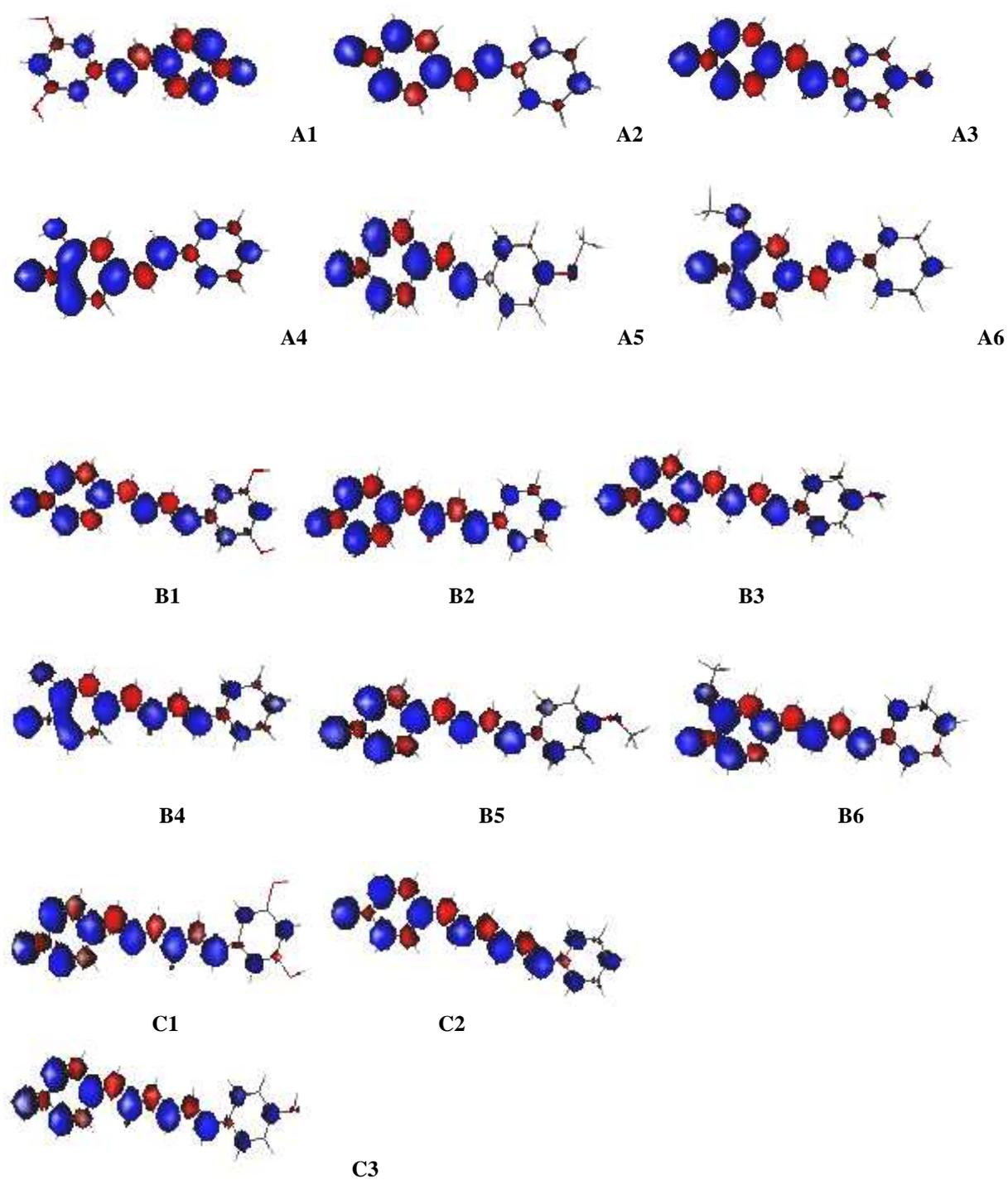


Figure (IV. 37) : Distribution de la densité de spin dans les radicaux formés après arrachement d'un hydrogène.

IV.3.3.2 Le mécanisme SET-PT

a) Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP)

Le potentiel d'ionisation adiabatique représente un paramètre important et largement utilisé pour évaluer la tendance d'une molécule à donner des électrons. L'AIP représente l'enthalpie de la réaction de la première étape du mécanisme SET-PT (équation (I.2)). Par conséquent, les molécules ayant l'AIP le plus bas sont les plus actives (Queiroz *et al.*, 2009). Comme le montre le tableau (IV.23) résumant les valeurs de l'AIP calculées dans l'eau et en phase gazeuse, les valeurs de l'AIP obtenues suivent la séquence: ène > diène > triène, et ceci dans les deux phases étudiés. A titre d'exemple, les valeurs de l'AIP des composés A1, B1 et C1 étaient de 153,4657 ; 146,4872 et 140,7643 kcal/ mol, respectivement.

Dans le même groupe de molécules, les valeurs de l'AIP diminuent avec l'addition d'un groupe hydroxyle en position ortho tel que le composé A4 (151,22 kcal / mol) ou en position para comme le A3 (148,1569 kcal / mol), le même changement a été obtenu par l'introduction de groupes méthoxy sur ces sites pour obtenir A6 (151,1546 kcal / mol) et A5 (140,876 kcal / mole). En revanche, l'AIP du composé A2 était la plus élevée (154,6642 kcal / mol). Par conséquent, l'ajout des groupes donneurs d'électrons sur les deux positions ortho et para augmente la capacité de donner les électrons. L'effet inductif et la résonance sont aussi responsables de la stabilité des cations radicalaires. Plus le composé possède des structures de résonance plus faible est son AIP (ex, C3, AIP = 137,2377 kcal / mol).

Comme le montre le tableau (IV.23), les AIPs obtenus en phase gazeuse ont été plus élevés que ceux de la phase aqueuse. Les solvants provoquent un grand changement des valeurs du potentiel d'ionisation, parce qu'ils contiennent des espèces chargées et solvatées. L'AIP dépend de l'énergie de l'HOMO du composé neutre, et pour un système conjugué, l'abstraction des électrons devient très facile. Ces résultats montrent une bonne correspondance avec les valeurs de la BDE et l'HOMO.

Tableau (IV.23): Valeurs des PDEs et AIPs [kcal/mol] obtenues au niveau B3LYP/6-31G** de la DFT.

Composé	AIP (phase gazeuse)	PDE (phase gazeuse)	AIP (eau)	PDE (eau)	capacité de réduction
A1	153,4657	239,2693	93,8946	9,7740	1,53±0,05
A2	154,6642	237,7125	93,5563	9,9140	1,29±0,02
A3	148,1569	243,3011	88,4607	13,5761	2,15±0,11
A4	153,2668	230,8688	92,6509	4,5688	4,07±0,30
A5	146,9315	245,0029	88,257	13,9815	1,79±0,12
A6	151,1546	241,5076	91,2973	défavorable	1,51±0,11
B1	146,4872	245,0826	88,8463	13,2021	1,67±0,05
B2	147,5527	243,9988	88,4503	13,4079	1,78±0,03
B3	142,323	248,6035	84,5936	16,3020	2,56±0,02
B4	145,9739	236,9569	87,3741	7,7566	4,65±0,15
B5	140,876	249,9250	84,3451	16,4802	2,25±0,17
B6	144,2175	247,9377	86,8389	13,6665	2,03±0,11
C1	140,7643	249,7744	84,9996	15,7090	1,70±0,04
C2	141,6303	248,9210	84,674	15,9381	-
C3	137,2377	252,8166	81,6249	18,2548	2,82±0,11

L'eau en tant que milieu de solvatation a une influence plus importante sur les valeurs de l'AIP que sur des BDEs. Par conséquent, les valeurs les plus élevées des potentiels d'ionisation ont été trouvées dans la phase gazeuse. La différence moyenne entre les valeurs de l'AIP dans la phase gazeuse et l'eau atteint 60,0204 ; 57,8304 et 56,1113 kcal/mol pour les ènes, diènes et les triènes, respectivement. Il faut noter que l'effet du solvant diminue avec l'allongement du pont éthylène.

Les valeurs très élevées de l'AIP sous vide indiquent que le mécanisme SET-PT n'est pas le processus favorisé en phase gazeuse (Tsimidou *et al.*, 2006).

b) Enthalpies de dissociation du Proton

L'enthalpie de dissociation du proton est directement liée à la deuxième étape du mécanisme SET-PT. L'équation (I.3) peut déterminer le groupe hydroxyle le plus thermodynamiquement préféré pour subir la première déprotonation dans le cation radicalaire formé lors la première étape (équation (I.2)). Néanmoins, il est très important d'étudier les PDEs de toutes les positions concernées ainsi que l'effet de l'élongation du pont éthylène sur ce paramètre. Les valeurs des PDEs sont reportées dans le tableau (IV.23)

Dans cette partie, la valeur de l'enthalpie de solvation du proton $H_{\text{sol}}(H^+)$ qui est de -1090 kJ/mol pour l'eau a été utilisée pour les calculs des PDEs. Comme le montre le tableau (IV.23), les valeurs des PDEs en phase gazeuse sont plus élevées, mais que celles en solution. En outre, la différence entre les moyennes des valeurs des PDEs en phase aqueuse et sous vide de tous les composés étudiés étaient de 229,2475 ; 231,9482 et 233,8701 kcal/mol dans les groupes A, B et C, respectivement. Ces résultats sont en parfait accord avec la littérature (Klein *et al.*, 2007 ; Najafi *et al.*, 2011 ; Urbaniak *et al.*, 2013).

Cependant, les valeurs de l'AIP sont inférieures à celles du PA en phase gazeuse. On peut supposer que la première étape du mécanisme SET-PT est possible sous vide, ce résultat est en accord avec celui reporté par Urbaniak *et al.* (2013).

IV.3.3.3 Le mécanisme SPLET

a) L'affinité du proton

L'affinité du proton représente l'enthalpie de la réaction de la première étape du mécanisme SPLET (équation (I.4)). L'enthalpie de la réaction de la première étape correspond à l'affinité du proton de l'anion phénoxyde ArO^- . La déprotonation des groupements hydroxyles a été étudiée par le calcul des PAs (tableau (IV.24)).

Comme le montre le tableau (IV.24), l'eau a considérablement changé l'enthalpie de formation des anions. Parmi les composés étudiés, ceux incluant l'entité catéchol (A4 et B4), ont montré les valeurs les plus basses de la PA en phases gazeuse et aqueuse. Les valeurs des PAs suivent la séquence: ène > diène > triène, dans les deux phases étudiées. Comme il a déjà été montré pour les valeurs des PDEs, les PAs ont diminué significativement dans l'eau par rapport à la phase gazeuse. Ceci est dû à la valeur élevée de l'enthalpie d'hydratation du proton. Par conséquent, la différence entre les moyennes des valeurs de la PA en phase aqueuse et dans le vide par famille de composés étudiés étaient de 301,4746 ; 299,4128 et

296,6979 kcal/mol pour les groupes A, B, et C, respectivement. L'élongation du pont oléfinique diminue la capacité de déprotonation des molécules neutres. Notons que les PDEs sont inférieures aux PAs dans les deux environnements étudiés. Ce résultat est expliqué par le fait que les cations radicalaires peuvent libérer un proton plus facilement que les systèmes neutres.

Les résultats indiquent que le mécanisme SPLET est le processus le plus thermodynamiquement favorisé dans l'eau, parce que les valeurs de la PA dans l'eau sont inférieures à celles des AIPs et BDEs ; et ceci pour toutes les molécules étudiées.

Tableau (IV.24): Valeurs des PAs et ETEs [kcal/mol] obtenues au niveau B3LYP/6-31G**

Composés	PA (phase gazeuse)	ETE (phase gazeuse)	PA (eau)	ETE (eau)
A1	342,1056	45,1875	40,2804	63,3834
A2	342,4362	45,3588	40,4793	62,9862
A3	344,3188	42,6800	40,8565	61,4407
A4	332,6095	45,8470	34,4032	62,8118
A5	343,7164	42,5388	41,3999	60,8339
A6	343,2865	43,6966	42,5489	défavorable
B1	338,6260	47,2646	38,9658	63,0778
B2	338,3574	47,5150	39,7382	62,1152
B3	340,0843	45,1631	40,4523	60,4385
B4	330,0109	47,2407	33,6809	61,4450
B5	340,0831	45,0388	40,3984	60,4222
B6	342,5969	43,8792	41,8693	58,6313
C1	335,8160	49,0436	39,2915	61,4124
C2	335,5437	49,3285	39,1785	61,4287
C3	337,1300	47,2451	39,9259	59,9491

b) Enthalpie de transfert de l'électron (ETE)

L'enthalpie de transfert de l'électron représente l'enthalpie de la réaction de la deuxième étape du mécanisme SPLET (équation(I.5)). Les résultats de calculs basés sur la B3LYP/6-31G** et reportés dans le tableau (IV.24) ont révélé que les valeurs des ETEs en phase aqueuse sont plus élevées que celles obtenues en phase gazeuse. Elles peuvent être arrangées selon la séquence :ène > diène > triène dans les deux milieux étudiés. En outre, les valeurs de l'ETE dans le vide sont inférieures aux AIPs. Ces résultats révèlent que les composés anioniques peuvent donner plus facilement un électron que leurs molécules mères. Les groupements donneurs d'électrons diminuent les valeurs de l'ETE (Brinck *et al.*, 1997), ce qui explique les faibles valeurs de l'ETE pour les composés A5 et B5.

➤ Mécanisme le plus thermodynamiquement favorisé

Les résultats de cette investigation ont montré que les processus responsables de l'activité antiradicalaire suivent les séquences:

Phase gazeuse: BDE < AIP < PA.

Eau: PA < BDE < AIP.

Il faut souligner que le mécanisme HAT est le processus préféré en phase gazeuse parce que les valeurs des BDEs des groupes OH sont inférieures à celles des valeurs de l'AIP et de la PA correspondantes. D'autre part, en phase aqueuse les valeurs de la PA des groupes OH des antioxydants étudiés sont significativement inférieures à celles des BDEs et des AIPs correspondantes. Ainsi, le mécanisme SPLET représente la voie réactionnelle la plus thermodynamiquement probable dans les solvants polaires. Alors que le mécanisme SET-PT n'est préféré dans aucun des milieux, parce que les valeurs des AIPs sont toujours plus élevées que celles des BDEs et PAs. En raison de la grande enthalpie de solvation du proton, les valeurs des PAs dans l'eau, sont significativement inférieures à celles obtenues en phase gazeuse.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Le travail entrepris dans cette thèse a pour thème l'analyse qualitative et quantitative de molécules à intérêt thérapeutique dans les aliments, suivie d'une étude de relation quantitative structure/activité antioxydante de stilbènes et leurs dérivés.

La première partie de ce travail, concerne le dosage de stilbènes, le *trans* resvératrol, le *trans* picéide et la *trans* -viniférine dans diverses variétés de raisin de table algérien au moyen d'une technique HPLC à polarité de phases inversée, couplée à un détecteur UV-visible. La *trans* -viniférine, un dimère du *trans* resvératrol ayant prouvé diverses activités biologiques, a été trouvée dans les sarments et les rafles de vigne, mais c'est la première fois qu'elle soit détectée et quantifiée dans la pellicule de raisin. Le *trans* resvératrol était présent dans toutes les variétés de raisin étudiées. La *trans* -viniférine et le *trans* picéide ont été trouvés dans cinq et quatre variétés respectivement. Les concentrations moyennes en *trans* resvératrol, *trans* -viniférine et picéide étaient de 1,3516 mg/Kg, 0,5221mg/Kg et 0,8578 mg/Kg (poids sec), respectivement.

Pour cette partie de l'étude, l'effet du TFA (Trifluoro- Acetic acid) sur la résolution a été étudié. La méthode d'extraction a été optimisée en prenant en considération les effets de la température, de la composition du solvant et du temps de contact. L'optimisation des conditions d'extraction nous a permis de réduire le temps d'extraction à huit (08) minutes.

En outre, les variétés de raisin à peau noire ont montré un taux de stilbènes plus élevé que les variétés à peau blanche. Ceci a été expliqué pour la première fois par la chimie computationnelle qui nous a permis de trouver une corrélation entre la composition polyphénolique (stilbènes/anthocyanes) et l'activité antioxydante. En effet, nous stipulons que si le taux de stilbènes est élevé, c'est par ce que les anthocyanes sont plus consommées par le piégeage des radicaux libres lors du processus antiradicalaire.

Comme perspective, nous rechercherons d'autres polyphénols notamment des stilbènes dans d'autres variétés de raisin, car l'allure chromatographique montre des composés ayant des maximums d'absorption correspondant bien à cette famille de molécules.

L'objectif de la deuxième partie de cette thèse, est la préparation d'une base de données pour le taux de cholestérol (exogène) dans les aliments du marché algérien. On a entamé ce grand projet dans cette étude, par la détermination de la teneur dans le jaune d'œuf des poules autochtones et de cage, de caille, de dinde et d'oie. Ceci a été effectué au moyen d'une technique HPLC en phase normale et une détection UV-visible. L'optimisation de la méthode a été réalisée en jouant sur le temps de saponification. Le temps de rétention a été réduit à 3 minutes. Cette méthode est très pratique et peut être utilisée par le secteur agroalimentaire pour l'étiquetage des aliments.

Les résultats ont révélé que le taux de cholestérol dans les œufs varie selon l'espèce, la race, l'âge, l'alimentation de la poule et le poids du jaune d'œuf.

La teneur en cholestérol dans le jaune d'œuf de la caille et la dinde a été légèrement inférieure à celui obtenu dans le jaune d'œuf de la poule, en revanche, les oies ont présenté une quantité inférieure. La différence entre les teneurs de cholestérol des œufs crus et bouillis n'était pas significative.

La plupart des Algériens pensent que les œufs des poules autochtones contiennent un taux de cholestérol plus faible que celui des poules de cages ; cette étude a montré que le contraire est vrai. D'autre part, la teneur du cholestérol dans le lait de vache a été étudiée et les résultats ont montré que la fermentation traditionnelle a un effet réducteur sur le cholestérol, ceci peut être dû à l'hydrolyse de la fonction alcool en position 3 catalysée par les acides organiques formés lors de la fermentation.

Comme perspectives, nous envisageons de continuer ce grand projet de contrôle du taux de cholestérol dans tous les aliments qui constituent une source exogène de l'hypercholestérolémie.

Dans la troisième partie, nous avons étudié l'activité antioxydante des stilbènes et l'effet des différentes transformations structurales sur cette activité. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante est fonction de (i) la géométrie des composés neutres et de leurs radicaux phénoxy, (ii) le nombre et la position des groupes hydroxyles, (iii) la forme semiquinone, et (iv) les structures ortho et para quinone.

L'effet inductif des deux groupements hydroxyle et méthoxy, et l'effet des liaisons hydrogène intramoléculaires, après abstraction de l'atome d'hydrogène contribuent fortement à l'activité antioxydante.

Les résultats ont révélé qu'il existe des antioxydants plus puissants que le trans-resvératrol, parmi lesquels, le *trans* 3,4-dihydroxy-stilbène; *trans* 3, 3 -diméthoxy 4, 4 -dihydroxy-stilbène et le 4, 4 - dihydroxy-stilbène.

Les résultats de cette partie ont révélé que le 2-hydroxy-stilbène est un nouveau pharmacophore de la famille des stilbènes.

Dans la deuxième section de cette étude théorique, les mécanismes du Transfert d'Atome d'Hydrogène (HAT), Transfert d'un Seul Electron suivi d'un Transfert de Proton (SET-PT) et perte de proton-transfert d'électron séquentiel (SPLET) ont été étudiés en phase gazeuse, aqueuse et dans le benzène pour l'évaluation de l'activité antioxydante du trans-resvératrol et ses analogues phénanthréniques avec la méthode DFT/B3LYP et la base 6-311G (d, p). Les résultats ont montré que la position 4'-OH du resvératrol est le site le plus favorable pour les coupures homolytique et hétérolytique dans tous les milieux étudiés. D'autre part, le site 3-OH est préférable pour ces coupures, dans tous les phénanthrènes étudiés, à l'exception du composé B, l'analogue phénanthrénique du RSV. L'introduction de la liaison simple entre les deux noyaux A et B du resvératrol, crée un nouveau pharmacophore sur la position 4-OH (3-OH dans RSV). Suggérant l'importance de la construction d'un noyau phénanthrénique.

Il est bien clair que le mécanisme HAT est le processus dominant aussi bien en phase gazeuse que dans le benzène. Ainsi, le mécanisme SPLET représente la voie réactionnelle la plus thermodynamiquement probable dans les solvants polaires alors que le mécanisme SET-PT n'est préféré ni en phase gazeuse ni en phase condensée.

Enfin, notre investigation indique que les calculs doivent être faits, aussi bien en phase gazeuse qu'en phase liquide (solvants polaires et apolaires) pour parvenir à de plus amples explications des mécanismes responsables du piégeage des radicaux libres.

La troisième stratégie pour l'amélioration de l'activité antioxydante de molécules ayant le stilbène comme squelette de base consiste en l'élongation du pont éthylénique entre les deux cycles aromatiques du squelette stilbénique ainsi que la variation du nombre et de la position des groupements attachés à ces cycles. Les calculs ont été effectués en phase aqueuse et sous vide. Les valeurs des BDEs, AIPs, PAs ainsi que les densités de spin diminuent avec l'élongation de la liaison éthylénique indiquant que la capacité

antiradicalaire augmente. En conclusion, l'élongation de la liaison oléfinique (C7=C8) est une stratégie réussie pour promouvoir l'activité antioxydante des stilbènes.

Les résultats computationnels obtenus ont pu expliquer avec une ample satisfaction les observations expérimentales publiées.

Enfin, ce travail contribue à la compréhension des activités pharmacologiques des composés étudiés. Ces résultats pourraient être utiles pour des applications industrielles dans les secteurs alimentaires et pharmaceutiques.

Comme perspectives, nous envisageons dans le futur proche d'appliquer une quatrième stratégie pour l'amélioration de l'activité antioxydante de molécules ayant le stilbène comme squelette de base, en introduisant des hétéroatomes. Nous comptons aussi tenter la synthèse des dérivés du 2-hydroxy-stilbène dont le potentiel antioxydant a été démontré par notre étude computationnelle par DFT pour mettre à l'épreuve cette capacité antioxydante, par une étude expérimentale.

Références

VI. Références

- Addy, M. E., (1992). Some secondary plant metabolites in *Desmodium adscendens* and their effects on arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes Essential and Fatty Acids*. 47, 85 - 91
- Ahsan, H., Ali, A., Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*. 131, 398-404.
- Al-Awwadi, N.A., Araiz, C., Bornet, A., et al. (2005). Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension and cardiac hypertrophy in high fructosefed rats. *J Agric Food Chem*. 53, 151-7.
- Amira-Guebailia H., polyphénols des sarments et des rafles de vigne et du vin, purification, dosage et activités biologiques, Université Badji Mokhtar Annaba, 2007.
- Amr, S.R., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J.H., Bobzin S.C. (2006). *J. Agric. Food Chem*, 54 , 7175–7179.
- Anitschkow, N., Chalатов, S. (1913). On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes. *Centralblatt fur Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. 24, 1–9.
- Baderschneider, B., Winterhalter, P. (2000) Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J Agric Food Chem*. 48, 2681-2686
- Bala, A.E., Kollmann, A., Ducrot, P.H., Majira, A., Kerhoas, L., Delorme, R., Einhorn, J. (2000). Cis e-viniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalarioides* roots. *Journal of Phytopathology*. 148, 29-32.
- Bartmess, J.E. (1994). The thermodynamics of the electron and the proton. *J. Phys. Chem*. 98, 6420–6724
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*. 78, 547-581.
- Benayahoum, A., Amira-Guebailia, H., Houache, O. (2013). A DFT method for the study of the antioxidant action mechanism of resveratrol derivatives, *J. Mol. Model*. 19, 2285–2298.
- Berlette, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 272, 20313-20316.
- Berger, M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20, 48-53.
- Berthier, G. J. (1954). *Chim. Phys*. 51, 363.
- Beyer, R. S., & Jensen, L. S. (1989a). Overestimation of the cholesterol content of eggs. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 917–920.
- Beyer, R. S., & Jensen, L. S. (1989b). Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia. *Poultry Science*, 68, 1703–1706.

- Billes, F., Mohammed-Ziegler, I., Mikosch, H., Tyihák, E. (2007). Vibrational spectroscopy of resveratrol. *Spectrochimica Acta Part A*. 68, 669–679.
- Bitman, J., & Wood, D. L. (1980). Cholesterol and cholesteryl esters of eggs from various avian species. *Poultry Science*, 59, 2014–2023.
- Bourzeix M., Weyland D., Heredia N., Desfieux C. (1986). *Bulletin de l'O.I.V.*, 59, 1171-1253.
- Born, D; Oppenheimer, J.R. (1927). *Ann. Phys. Rev.* 84, 457.
- Bragagnolo, N., & Rodriguez-Amaya, D.B. (2003) Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *J. Food Compos. Anal.*, 16, 147–153.
- Brinck, T., Haeblerline, M., Jonsson, M. (1997). A computational analysis of substituent effects on the O–H bond dissociation energy in phenols: polar versus radical effects. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 4239–4244.
- Cai, Y.J., Fang, J.G., Ma, L.P., Yang, L., Liu, Z.L. (2003). Inhibition of free radical induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1637, 31–38.
- Campo, J. L. (1995). Comparative yolk cholesterol content in four Spanish breeds of hens, an F2 Cross, and a White Leghorn population. *Poultry Science*, 74, 1061–1066
- Cao, H., Pan, X., Li, C., Zhou, C., Deng, F., Li, T. (2003). Density functional theory calculations for resveratrol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 1869–1871.
- Caruso, F., Tanski, J., Villegas-Estrada, A., Rossi, M. (2004). Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure, *J Agric Food Chem.* 52, 7304–7310.
- Cassady, A., Hanley, B., Lamuela-Raventos, R. M. (2000). Isoflavones, lignans, and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of Science and Food Agriculture.* 80, 1044–1062.
- Cayuela, J. M., Garrido, M. D., Bañón, S.J., Ros, J. M. (2003). Simultaneous HPLC analysis of alpha-tocopherol and cholesterol in fresh pig meat. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1120-1124.
- Chang, T.Y., Chang, C.C., Ohgami, N., Yamauchi, Y. (2006). Cholesterol sensing, trafficking and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22, 129-157.
- Chen, D., Daniel, K.G., Kuhn, D.J., Kazi, A., et al. (2004) Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci* 9, 2618-2631.
- Cheng, J.C., Fang, J.G., Chen, W.F., Zhou, B., Yang, L. (2006). Structure– activity relationship studies of resveratrol and its analogues by the reaction kinetics of low density lipoprotein peroxidation. *Bioorg Chem.* 34, 142–157

- Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C., Teissédre, P-L. (2008) Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 6, 75–82.
- Chung E.Y., Kim B.H., Lee M.K., Yun Y.P., Lee S.H., Min K.R., Kim Y. (2003). Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilbene alpha-Viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Planta Med.* 69, 710-714.
- Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations, *Oléagineux, OLC*. 13, 24-29.
- Conroy, R.M., Pyörälä, K., Fitzgerald, A.P. (2003). The SCORE project group, Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe : the SCORE project. *Eur Heart J.* 24,987-1003.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. 1, 569-590.
- Counet, C., Callemien, D., Collin, S. (2006) Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*. 98, 649–657.
- Daneshfar, A., Khezeli, T., & Lotfi, H. J. (2009). Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC–UV. *J. Chromatogr. B*, 877, 456–460.
- Davies, M.J. (1996). Stability and instability: Two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 94, 2013-2020.
- De la Lastra, C. A., Villegas, I. (2005). Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implication. *Mol Nutr Food Res*. 49, 405-430.
- De Lima, M. T. R., Waffo-Teguo, P., Teissédre, P. L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J. C., & Merillon, J. M. (1999). Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *J Agric Food Chem*. 47, 2666– 2670.
- Deak, M., Falk, H. (2003) On the chemistry of resveratrol diastereomers, *Monat fur Chem* 134, 883–888.
- Décorde, K., Teissédre, P.L., Auger, C., et al. (2008) Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. *Mol Nutr Food Res*. 52, 400-407.
- Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005) IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), pp: 703-861.
- Ding, D.J., Cao, X.Y., Dai, F., Li, X.Z., Liu, G.Y., Lin, D., Fu, X., Jin, X.L., Zhou, B. (2012). Synthesis and antioxidant activity of hydroxylated phenanthrenes as cisrestricted resveratrol analogues. *Food Chem*. 135, 1011–1019.
- Doucet, J.P.; Weber, J. Computer-aided molecular design: Theory and applications, Academic Press, London, 1996, 266

- Epifano, F., Genovese, S., Menghini L., Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyphenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*. 68, 939 - 953.
- Esna-Ashari, M., Gholami, M., Zolfigol, M.A., Shiri, M., Mahmoodi-Pour, A., Hesari, M. (2008). Analysis of *trans*-Resveratrol in Iranian Grape Cultivars by LC. 67, 1017-1020.
- Feng, L.L., Wu, X.F., Liu, H.L., Guo, W.J., Luo, Q., Tao, F.F., Ge, H.M., Shen, Y., Tan, R.X., Xu, Q., Sun, Y. (2013). Vaticaflinol, a resveratrol tetramer, exerts more preferable immunosuppressive activity than its precursor in vitro and in vivo through multiple aspects against activated T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 267, 167-173.
- Frankel, E.N., Kannerm J., German, J.B., et al. (1993) Inhibition of in vitro oxidation of human low-density lipoprotein with phenolic substances in red wine. *Lancet*. 341, 454-457.
- Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.
- Feltgen, K. (1993). Le Cholestérol, Essai historique sur l'intérêt qu'il a suscité en médecine depuis sa découverte au milieu du XVIII^e jusqu'à l'aube du XX^e siècle ; Thèse Médecine ; Rouen ; 1758-1913.
- Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A., Psomas, I.E., Mantis, A.I. (1998). Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 81, 2833–2840.
- Flora, S.D., Quaglia, A., Bennicelli, C., Vercelli, M. (2005). The epidemiological revolution of the 20th century. *FASEB J*. 19, 892–897.
- Fock, V.Z. (1930). *Phys*. 61, 126-148.
- Fukui, K. (1982) Role of frontier orbitals in chemical reactions, *Science* 218, 747–754.
- Goudable, J., Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 11, 115-20.
- Goudjil, H., Torrado, S., Fontecha, J., Martinez-Castro, I., Fraga, J., Juarez, M., 2003. Composition of cholesterol and its precursor in ovine milk. *Lait*. 83, 153–160.
- Halliwell, A., Gutteridge, J.M.C. (1990). The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 280, 1-8.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. 142, 31-22.
- Hanai, T. (1999). Health Research Foundation HPLC: A Practical Guide, Kyoto, Japan.
- Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 91, 7-11.

- Hartmann, T., (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Photochemistry* 68, 2831 - 2846.
- Hartree, D.R. (1928). *Proc. Cambridge Philos.* 24, 89. (b) Hartree, D.R. *Proc. Cambridge Philos.* 24, 426.
- Heber, D. (2004). Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases, *J Postgrad Med.* 50, 145–149.
- Higdon, J.V., Frei B. (2003). *Crit .Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 89-143.
- Honenberg, P.; Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* 136, B864-B871.
- Huang, K.S., Lin M., Cheng G.F. (2001). Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochemistry* 58, 357–362.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani. L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21, 589– 598.
- Ibern-Gomez, M., Roig-Perez, S., Lamuela-Raventos, R. M., de la Torre-Boronat, M. C. (2000). Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. *J Agric Food Chem.* 48, 6352–6354.
- Jang, M., Cai L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997) .Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220.
- Jayaprakasham, G.K., Tamil, S., Sakariah, K.K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Intern.* 36, 117-2
- Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 41–46.
- Jenner, P. (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Movement Disorders.* 13, 24–34.
- Jiang, Z., & Sim, J. S. (1991). Egg cholesterol values in relation to the age of laying hens and to egg and yolk weights. *Poultry Science*, 70, 1838–1841.
- Jon, G., Keevil, Hashim, E., Osman-Jess, D., Reed and John D. (2000). Folts ; Grape Juice, But Not Orange Juice or Grapefruit Juice, Inhibits Human Platelet Aggregation, *J. Nutr.* 130, 53–56.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic. B., Simic, M.J. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc.* 116, 4846–4851.
- Jung, T., Bader, N., Grune, T. (2007) Oxidized proteins : intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 462, 231-237.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace

from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/ MS. *J Agric Food Chem.* 52, 4360–4367.

Klein, E., Lukes, V. (2006). DFT/B3LYP study of O–H bond dissociation enthalpies of para and meta substituted phenols: Correlation with the phenolic C–O bond length. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM.* 767, 43–50

Klein, E., Lukeš, V., Il in, M. (2007). DFT/B3LYP study of tocopherols and chromans antioxidant action energetic, *Chem. Phys.* 336, 51–57.

Koehler-Ramonatxo, C. (2006) Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique.* 20, 165-177.

Kohen, R., Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology.* 30, 620-650.

Kohn, W., Sham, L.J. (1956). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* 140, A1133-A1138.

Langcake, P., Pryce, R.J. (1976). Production of resveratrol by *V. vinifera* and other members of Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9, 77.

Langcake, P., Pryce, R.J., (1977). Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes *in vitro*: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *J.Chem. Soc.: Chem. Comm.*, 208-210.

Langcake, P., McCarthy, W.V. (1979). *Vitis* 18, 244.

Langcake, P. (1981). *Physiol. Plant Pathol.* 18, 213

Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., et al. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 42, 1673-1681.

Leach, A.R. *Molecular Modeling. Principles and applications.* Addison Wesley Longman: Essex, England, 1996.

Lee, E.O., Kwon, B.M., Song, G.Y., Chae, C.H., Kime, H.M., Shima, I.S., Ahne, K.S., Kima, S.H. (2004). Heyneanol A induces apoptosis via cytochrome c release and caspase activation in human leukemic U937 cells. *Life Sciences.* 74, 2313–2326.

Lee, E-O., Lee, H.J., Hwang, H.S., Ahn, K.S., Chae, C., Kang, K.S., Lu, J., Kim. S.H. (2006). Potent binding inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of *Vitis amurensis* through apoptotic and anti-angiogenic activities. *carcinogenesis.* 1, 27(10), 2059 – 2069.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.* 30, 1076-1081.

- Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., Wang, H. (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *J Food Drug Anal.* 16, 67-73.
- Li, W.W., Ding, L.S., Li, B.G., Chen, Y.Z. (1996). Oligostibenes from *vitis heyneana*. *Phytochemistry.* 42, 163–1165.
- Liao, E., Andalibi, A., Qiao, J.H., Allayee, H., Fogelman, A.M., Lusic, A.J. (1994). Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J. Clin. Invest.* 94, 877-884.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 78 (3), 517S-20S.
- Lu, L., Zhu, S., Zhang, H., Zhang, S. (2013). Improvement of antioxidative activity of resveratrol by elongating conjugated chain: a DFT theoretical study. *Comp. Theor. Chem.* 1019, 39–47.
- Lu, K. T., Chiou, R. Y. Y., Chen, L. G., Chen, M. H., Tseng, W. T., Hsieh, H. T., Yang, Y. L. (2006). Neuroprotective Effects of Resveratrol on Cerebral Ischemia-Induced Neuron Loss Mediated by Free Radical Scavenging and Cerebral Blood Flow Elevation. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3126-3131.
- Marambaud, P., Zhao, H., Davies, P. (2005). Resveratrol promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- Peptides. *J.Biol. Chem.* 280, 37377-37382.
- Marier, J.F., Chen, K., Prince, P., Scott, G., del Castillo, J. R. E., Vachon P. (2005). Production of ex-vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependant manner. *The Canadian J. Vet. Res.* 69, 151-154
- Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77, 147-161.
- Maurice, D. V., Lightsey, S. F., Hsen, K. T., Gaylord, T. G., & Reddy, R. V. (1994). Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC. *Food Chem.*, 50, 367–372.
- McNaught, A.D., Wilkinson, A. (1997). *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed.
- McWeeny, R.; Sutcliffe, B.T. *Methods of Molecular Quantum Mechanics*. Academic Press: London and New York, 1969.
- Mikec, M., & Dinarina-Sabli, M. (2007). Cholesterol content in chicken eggs dependant on various breeds, age and housing types. In *Proceedings of the 7th symposium of poultry days 2007 with international participation* (pp. 112–118). Zagreb: Croatian Veterinary Institute.
- Mikulski, D., Szelag, M., Molski, M., Gorniak, R. (2010). Quantum-chemical study on the antioxidation mechanisms of trans-resveratrol reactions with free radicals in the gas phase, water and ethanol environment, *J. Mol. Struct.* 951, 37–48.

- Millet, S., De Ceulaer, K., Van Paemel, M., Raes, K., De Smet, S., & Janssens, G. P. J. (2006). Lipid profile in eggs of Araucana hens compared with Lohmann selected Leghorn and ISA Brown hens given diets with different fat sources. *British Poultry Science*, 47(3), 294–300.
- Mishima, S., Matsumoto, K., Futamura, Y., Araki, Y., Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., Nozawa, Y., Akao, Y. (2003). Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model. *J Exp Ther Oncol*. 3, 283-288.
- Moran, B.W., Anderson, F.P., Devery, A., Cloonan, S., Butler, W.E., Varughese, S., Draper, S.M., Kenny, P.T. (2009). Synthesis, structural characterisation and biological evaluation of fluorinated analogues of resveratrol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17, 4510–4522.
- Musialik, M., Kuzmich, R., Pawlowski, T.S., Litwinienko, G. (2009). Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J. Org. Chem.* 74, 2699–2709.
- Najafi, M., Mood, K.H., Zahedi, M., Klein, E. (2011). DFT/B3LYP study of the substituent effect on the reaction enthalpies of the individual steps of single electron transfer–proton transfer and sequential proton loss electron transfer mechanisms of chroman derivatives antioxidant action, *Comp. Theor. Chem.* 969, 1–12.
- Najafi, M., Najafi, M., Najafi, H. (2012). DFT/B3LYP study of the substituent effects on the reaction enthalpies of the antioxidant mechanisms of Indole-3-Carbinol derivatives in the gas-phase and water. *Comp. Theor. Chem.* 999, 34–42.
- Neuzil, J., Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*. 331, 281-284.
- Onbasilar, E. E., Atasoy, F., & Yalçın, S. (2001). The egg cholesterol levels of denizli and hyline Brown chickens. In *Proceedings of IX European symposium on the quality of eggs and egg products* (pp. 85–89). Izmir: WPSA Turkish Branch Ege University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science.
- Orallo, F. (2006). Comparative Studies of the Antioxidant Effects of *Cis*- and *Trans*-Resveratrol. *Curr. Med. Chem.* 13, 87-98.
- Orgogozo, J.M., Dartigues, J.F., Lafont, S., et al. (1997) Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris)* 153, 185-192.
- Oshima, Y., Namao, K., Kamijou, A., Matsuoka, S., Nakano, M., Terao, K., Ohizumi, Y. (1995). Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). 15, 63-66.
- Pal Yu, B. (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*. 74, 139-155.
- Parker, T.L., Wang, X.H., Pazmino, J., Engeseth, N.J. (1941). Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Grapes, Sun-Dried Raisins, and Golden Raisins and Their Effect on ex Vivo Serum Antioxidant Capacity *J. Agric. Food Chem.* 55, 8472–8477.

- Parkinson, C.J., Mayer, P.M., Radom, L. (1999). An assessment of theoretical procedures for the calculation of reliable radical stabilization energies. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2305–2313.
- Pauli, W. (1940). The connection between spin and statistics, *Phys. Rev.* 58 ,719-722
- Pervaiz, S. (2003).Resveratrol: from grapevines to mammalian biology, *FASEB. J.* 17, 1975–1985.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products.* 63, 1035-1042.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002). Physiological action of antioxidant aaaaadefences. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 16, 233-239.
- Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., Lucas, D. (2003). Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by -viniferin ,the dimmer of resveratrol :comparison with resveratrol and Polyphenols from alcoholised beverages. *Life Sci.* 73, 1199-1213..
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry.* 36, 781-784.
- Prior, R.L. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* 78, 570S-8S.
- Pople, J.A., Nesbet, R.K. (1954). Self-Consistent Orbitals for Radicals. *J. Chem. Phys.* 22, 571-572.
- Queiroz, A.N., Gomes, B.A., Moraes, W.M., Jr–Borges, R.S. (2009) A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur J Med Chem.* 44,1644–1649
- Rayne, S., Karacabey, E., Mazza, G. (2008). Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *industrial crops and products.* 27, 335–340.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown M.S., Goldstein J.L., Mangelsdorf D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c. gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14, 2819-2830.
- Revilla, E., Alonso, E., Kovac, V. The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological and technological practices. In: *Wine: nutritional and therapeutic benefits.* Tom R. Watkins Ed. 1997, American Chemistry Society, Washington, DC.
- Rimar ik, J., Lukeš, V., Klein, E., Il in, M. (2010). Study of the solvent effect on the enthalpies of homolytic and heterolytic N–H bond cleavage in pphenylenediamine and tetracyano-p-phenylenediamine, *J. Mol. Struct.* 952, 25–30.
- Rivail, J.L. *Éléments de chimie quantique à l'usage des chimistes*, Deuxième édition, Savoirs Actuels, Inter-Editions / CNRS Editions, 1994.

- Rivière, C., Papastamoulis, Y., Fortin, P.Y., Delchier, N., Andriamanarivo, S., Waffo-Teguo, P., Kapche, G.D., Amira_Guebailia, H., Delaunay, J.C., Mérillon, J.M., Richard, T., Monti J.P. (2009). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20, 3441-3453.
- Rapport FAO (2000) Fruit production and consumption, data from World fruit program.
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventos, R. M., Waterhouse, A. L., de la Torre-Boronat, M.C. (1996). Levels of cis and transresveratrol and their glucosides in white and rose vitis vinifera wines from Spain. *J Agric Food Chem*. 44, 2124–2128.
- Romero-Pérez, A. I., Ibern-Go´mez, M., Lamuela-Ravento´s, R. M., & de la Torre-Boronat, M. C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. . *J Agric Food Chem*. 47, 1533–1536.
- Roothaan, C.C.J. (1951). *New Developments in Molecular Orbital Theory*. *Rev. Mod. Phys*. 23, 69-89.
- Rouaiguia-Bouakkaz , S., Amira-Guebailia, H., Rivière, C., Delaunay,J.C.,Waffo-Téguo, P., Mérillon, J.M. (2013). Identification and quantification of furanocoumarins in stem bark and wood of eight Algerian varieties of *Ficus carica* by RP HPLC-DAD and RP-HPLC-DAD-MS. *Natural product communications*. 8, 485-496.
- Ryynänen,M., Lampi, A.M., Salo-Väänänen,P., Ollilainene, V., & Piironene,V.(2004). A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *J. Food Comp. Anal*. 17, 749-765.
- Sachdev, S., Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*. 44, 215–223.
- Saint-Cricq De Gaulejac, N., Provost C., Vivas N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J Agric Food Chem*. 47,425-431.
- Sanders, T. H., McMichael, R. W., Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. . *J Agric Food Chem*.48, 1243–1246.
- Schrödinger, E., (1926). Quantising als Eigenwertprolem, *Ann. Phys*. 79, 361-376.
- Sieber, R., 2005. Oxidised cholesterol in milk and dairy products. *International Dairy Journal* 15, 191–206.
- Sim i , M., Stibilj,V., & Holcman, A.(2009). The cholesterol content of eggs produced by the Slovenian autochthonous Styrian hen. *Food Chem*. 114, 1- 4.
- Slater, J.C. (1972). Statistical Exchange-Correlation in the Self-Consistent Field. *Adv. Quantum Chem*. 6,1-91.
- Sobolev, S. V., Cole, R. J. (1999). Trans-resveratrol content in commercial peanuts products. *J Agric Food Chem*. 47, 1435–1439.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free radical biology & medicine*. 33, 575-586.

- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Golberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*.30, 91–113.
- Sorg, O.(2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327, 649-662.
- Spaath, E., Kromp, K. (1941). Natural stilbenes. III. Synthesis of resveratrol, *Ber Dtsch Chem Ges* 74B, 867-869.
- Stanley, F., Wainapel, M.D., MPH, Avital-Fast, M.D. (2003) Antioxidants and the Free Radical Theory of Degenerative Disease. In: *Alternative Medicine and Rehabilitation*, Demos Medical Publishing, New York.
- Sun, B., Ribes, A.M., Conceic, M., Leandro, ~ao., Belchior, A.P., Spranger,M.I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins,contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta*. 563, 382–390.
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem*. 113, 1226-1233.
- Takaoka, M. (1940). Phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). II. Synthesis of resveratrol and its derivatives, *Proc Imperial Acad (Tokyo)*. 16, 405–407.
- Teguo, P.W., Decendit, S., Krisa, S., Deffieux, G., Vercauteren, J., Merillon, J.M. (2001). The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J Nat Prod*. 59, 1189–1191.
- Thumann, V.F., Herrman, K. (1980). *Deut Lebensm-Rundsch*.76, 344-347.
- Tsimidou, M., Nenadis, N., Zhang H.Y. (2006). Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids and phenolic acids. In D. Boskou, I. Gerothanassis, & P. Kefalas (Eds.), *Natural antioxidant phenols. Sources, structure–activity relationship, current trends in analysis and characterization* (pp. 33–51). Kerala, India: Research Signpost Ch.3.
- Urbaniak, A., Szelag, M., Molski, M. (2013). Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Comp. Theor. Chem*. 1012, 33–40.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160, 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007) . Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*. 39, 44-84.
- Van Elswyk, M. E., Schake, L. S., & Hargis, P. S. (1991). Evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol. *Poultry Science*, 70, 1258–1260.

- Vastano, B. C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.-T., Zhou, Z., Rosen, R. T. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem.* 48, 253–256.
- Vinson, JA., Teufel, K., Wu, N. (2001). Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis.* 156, 67-72.
- Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R., van Breemen, R. B. (2002). An LC-MS method for analysing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem.* 50, 431–435.
- Waterhouse, A.L., German, J.B., Frankel, E.N., et al. (1996) The phenolic phytochemicals in wine fruit and tea: Potential nutritional effects and dietary levels. In: Finley JW, Armstrong DJ, Nagy S, Robinson S (eds) *Hypernutritious Foods*, Agscience, Auburndale FL, États-Unis, pp. 219-238.
- Waterhouse, A.L., Teissedre, P-L. Levels of phenolics in california varietal wines. In: *Wine: nutritional and therapeutic benefits*. Tom R. Watkins Ed. 1997, American Chemistry Society, Washington, DC.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1173–1183.
- Yankner, B.A. (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron.* 16, 921–932.
- Yoshiaki, T., Ke-Xu, Y., Terashima, K., Yue-Hua, H., Masatake, N. (2002). Biogenic reactions on stilbenetetramers from Vitaceaeous plants. *Tetrahedron*, 58, 9265–9271, DC.
- Young, S.G., Parthasarathy, S. (1994). Why are low-density lipoproteins atherogenic ? *West. J. Med.* 160:153-164.
- Zhang, L., Jope, R. S. (1999). Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells, *Neurobiol. Aging.* 20, 271-278.
- Zelko, IN., Marian, TJ., Folz, RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 33, 337-349.
- Zweier, J.L., Talukder, M.A.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research.* 70,181-190.

Annexes

A DFT method for the study of the antioxidant action mechanism of resveratrol derivatives

Ali Benayahoum · Habiba Amira-Guebailia · Omar Houache

Received: 20 November 2012 / Accepted: 14 January 2013 / Published online: 3 February 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Quantum-chemical calculations using DFT, have been performed to explain the molecular structure antioxidant activity relationship of resveratrol (RSV) (1) analogues: 3,4-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,4-DHS) (2); 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (4,4'-DHS) (3); 4-hydroxy-*trans*-stilbene (4-HS) (4); 3,5-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,5-DHS) (5); 3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,3'-DM-4,4'-DHS) (6); 2,4-dihydroxy-*trans*-stilbene (2,4-DHS) (7) and 2,4,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene (2,4,4'-THS) (8). It was found that all compounds studied were effective antioxidants with the exception of 3, 5-DHS. The high antioxidant activity of both 3, 3'-DM-4, 4'-DHS and 3, 4-DHS may be due to the abstraction of the two hydrogen atoms of the para and ortho-position hydroxyls respectively, to form a quinone structure. Our results revealed that the antioxidant pharmacophore of 2,4-DHS and 2,4,4'-THS, exhibiting higher antioxidant activity than resveratrol, is the 2-hydroxystilbene, rather than 4-hydroxystilbene. Experimental observations were satisfactorily explained and commented.

Keywords AIP · Antioxidant activity · DFT method · HOMO and LUMO · Spin density · *Trans*-resveratrol

A. Benayahoum · H. Amira-Guebailia (✉)
Laboratory of Applied Chemistry,
8 Mai 1945 Guelma University, Guelma 24000, Algeria
e-mail: amira_h_g@yahoo.co.uk

O. Houache
Petroleum & Chemical Engineering Department,
Sultan Qaboos University, P.O. Box 33, AlKhoud 123,
Muscat, Sultanate of Oman

Introduction

Polyphenols play an important role in the protection of living cells since they have a wide range of biological activities including anti-inflammatory and chemopreventive. Resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxy-stilbene) is a naturally occurring phytoalexin present in grapes and many other plants. Many studies reported on the biological activities of resveratrol [1], but the most striking biological action, intensely investigated for the last decade is its antioxidant behavior in biological systems [2, 3]. Resveratrol has been reported to possess a potent antioxidant activity against the peroxidation of low-density lipoproteins (LDL) [4, 5] and liposomes [6], and to be a potent inhibitor of lipoxygenase [7]. Moreover, this powerful antioxidant has shown a broad range of biological effects such as neuroprotection, anti-inflammation, and anti-cancer [8, 9]. Resveratrol is able to attenuate neurodegeneration in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases associated with the neuronal accumulation of β -amyloid and α -synuclein, respectively [10, 11].

Besides resveratrol, Murias et al. [12] studied the antioxidative features of many polyhydroxylated stilbenes.

The antioxidant activity of resveratrol is related to its hydroxyl (OH) groups which can scavenge free radicals produced in vivo [13, 14]. Indeed, Stivala et al. [15] reported that the deletion of all resveratrol hydroxyls as well as the substitution of these hydroxyls by OCH₃ decreased the antioxidant activity. When the 4'-hydroxyl of resveratrol was substituted by OCH₃, the EC₅₀ value of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), used to express the antioxidant activity, was 48.6. Moreover, the EC₅₀ value is 30.1

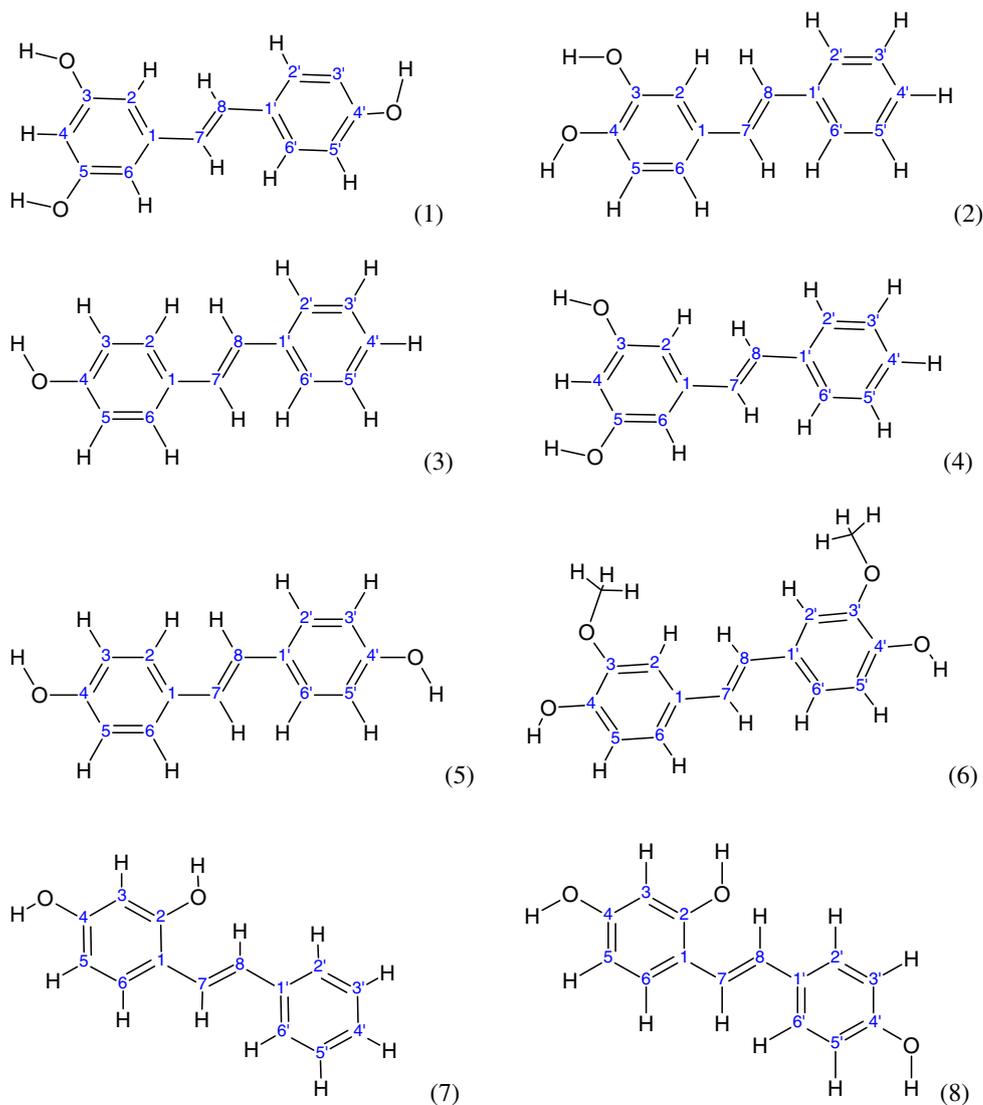
while the 3- or 5-hydroxyl is replaced by OCH_3 . These results have shown that the hydroxyl group in the 4'-position is required for the antioxidant activity, but acts synergistically with the 3 and 5-OH groups. It was also found that some resveratrol derivatives bearing orthodiphenoxyl functionality possess much higher antioxidative activity against free radical-induced peroxidation in membrane mimetic systems than those that do not possess such functionalities [14].

To find more efficient antioxidants by structural modification Cai et al. [3] synthesized resveratrol and related *trans*-stilbene analogues: 3, 4-dihydroxy-*trans*-stilbene (3, 4-DHS); 4, 4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (4,4'-DHS); 4-hydroxy-*trans*-stilbene (4-HS) and 3,5-dihydroxy-*trans*-stilbene (3, 5-DHS) (Fig. 1) and studied in vitro, their antioxidant activity for the free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes. They found that resveratrol and its analogues 3, 4-DHS; 4, 4'-DHS; 4-HS and 3, 5-

DHS, are effective antioxidants against both AAPH (a compound used extensively as a free radical generator and it is often used in the study of lipid peroxidation and the characterization of antioxidants) and iron-induced peroxidation of rat liver microsomes with an activity sequence of 3,4-DHS > 4,4'-DHS > resveratrol > 4-HS > 3,5-DHS. On the other hand, a kinetic analysis of the antioxidation process demonstrated that *trans*-stilbene derivatives are effective antioxidants against AAPH with the activity sequence of 3,3'-DM-4,4'-DHS > 3,4-DHS > 2,4,4'-THS > resveratrol > 3,5-DHS > 4,4'-DHS > 2,4-DHS, while the following sequence 3,4-DHS > 3,3'-DM-4,4'-DHS > 4,4'-DHS > resveratrol > 2,4-DHS > 2,4,4'-THS > 3,5-DHS was obtained for Cu^{2+} -induced low density lipoprotein peroxidation [16].

Recently, Mikulski et al. [17] studied by DFT the antioxidant activity of *trans* and *cis* resveratrol, *trans*-4,4'-dihydroxystilbene (*trans*-4,4'-DHS), *trans*-3,4-dihydroxystilbene

Fig. 1 Molecular structure of RSV (1); 3,4-DHS (2); 4-HS (3); 3,5-DHS (4); 4, 4'-DHS (5); 3,3'-DM-4,4'-DHS (6); 2,4-DHS (7) and 2,4,4'-THS (8)



(*trans*-3,4-DHS), *trans*-3,4,4'-trihydroxystilbene (*trans*-3,4,4'-THS), *trans*-3,4,5-trihydroxystilbene (*trans*-3,4,5-THS) and α , β -dihydro-3,4',5-trihydroxystilbene (α , β -dihydro-3,4',5-THS) and found that *trans*-3,4-DHS, *trans*-3,4,4'-THS, *trans*-3,4,5-THS and *trans*-4,4'-DHS exhibit higher antioxidant activity than *trans* resveratrol.

We report herein a DFT study on the antioxidative effect of resveratrol and related *trans*-stilbene analogues, 3,4-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,4-DHS) (2); 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (4,4'-DHS) (3); 4-hydroxy-*trans*-stilbene (4-HS) (4); 3,5-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,5-DHS) (5); 3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,3'-DM-4,4'-DHS) (6); 2,4-dihydroxy-*trans*-stilbene (2,4-DHS) (7) and 2,4,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene (2,4,4'-THS) (8).

Resveratrol is taken as a reference for stilbenes antioxidant activity, whereas 3,4-DHS and 4,4'-DHS, already reported to be more potent antioxidant than resveratrol by Mikulski et al. [17], are studied here, to illustrate the contribution of ortho- and para-quinone structures, generated from the original structures after H-abstraction, to the antioxidant activity. Mikulski et al. [17], for the same purpose, focused on the contribution of semiquinone structure of the phenoxy free radicals.

3,5-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,5-DHS); 3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene (3,3'-DM-4,4'-DHS) (6); 2,4-

dihydroxy-*trans*-stilbene (2,4-DHS) (7) and 2,4,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene (2,4,4'-THS) are theoretically evaluated here, for the first time, for their antioxidant action mechanism.

This study includes the determination of bond dissociation energy (BDE), adiabatic ionisation potential (AIP), the highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), and the single electron density distribution of the radicals. It also, aims to provide a theoretical explanation of the relationship between the antioxidant activity of some stilbenes and their molecular structures. Our calculations were based on 4-HS as a pharmacophore of resveratrol antioxidant activity [18]. We further investigated the influence of the number and position of hydroxyl and methoxy groups, on the antioxidant activity of the stilbene derivatives.

Methods

All calculations were performed using GAUSSIAN 03 program package [19]. Firstly, the original structures of RSV, its analogues and the corresponding free radicals were optimized by AM1 methods [20], then all structures were fully optimized using B3LYP method at 6-31G** basis set (Fig. 2). Our analysis includes the frontier orbitals HOMO

Fig. 2 Geometries of resveratrol and its analogues ground state molecules optimized by B3LYP/6-31G**. (1) RSV; (2) 4-HS; (3) 3,5-DHS; (4) 2,4-DHS; (5) 3,4-DHS; (6) 2,4,4'-THS; (7) 4,4'-DHS and (8) 3,3'-DM4,4'-DHS

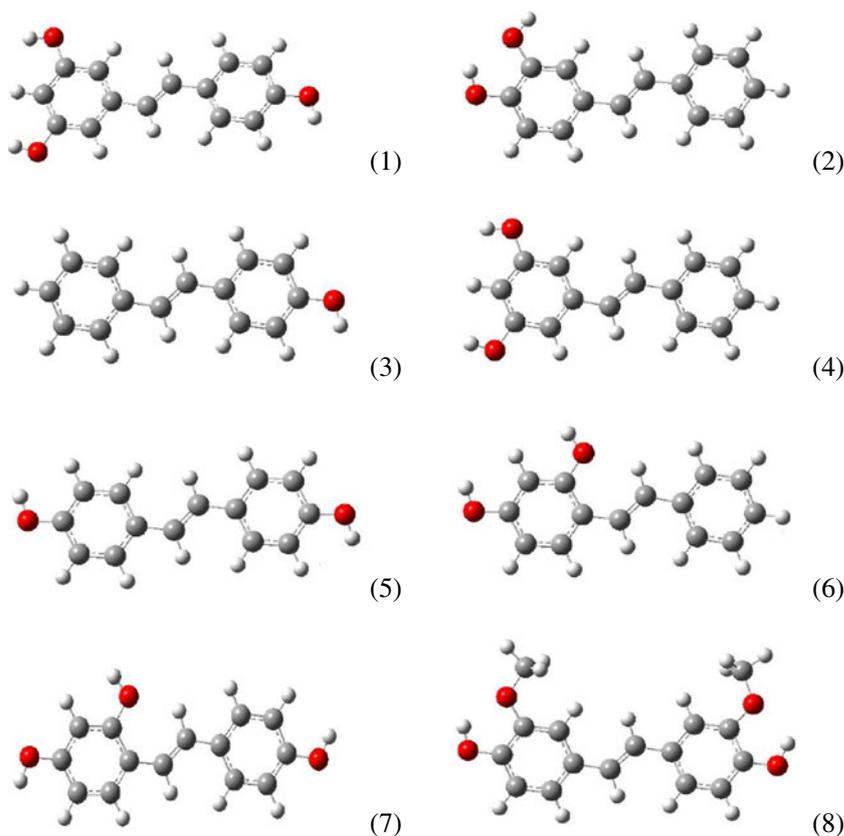


Table 1 The B3LYP/6-31G** optimized values of the dihedral angles α [°] and θ [°] and hydroxyl bond lengths [Å] of the antioxidants, studied in the gas phase

Compounds	α	θ	4'-OH	3-OH	5-OH	4-OH	2-OH	C=C parent	C=C 4-O-radical
<i>Trans</i> -resveratrol	0.02	0.02	0.963 ^a 0.9663 ^b	0.962 ^a 0.9661 ^b	0.962 ^a 0.9661 ^b	–	–	1.349	1.365
<i>Trans</i> -4,4'-DHS	0.00	0.00	0.962 ^a 0.9662	–	–	0.962 ^a 0.9662	–	1.349	1.368
<i>Trans</i> -4-HS	0.00	0.00	0.9663	–	–	–	–	1.348	1.366
<i>Trans</i> -3,4-DHS	0.01	0.01	–	0.9662	–	0.9660	–	1.349	1.362
<i>Trans</i> -3,5-DHS	0.01	0.01	–	0.9658	0.9658	–	–	1.347	1.348
<i>Trans</i> -2,4-DHS	0.00	0.00	–	–	–	0.9661	0.9663	1.351	1.371
<i>Trans</i> -2, 4,4'-DHS	0.01	0.01	0.9662	–	–	0.9662	0.9663	1.351	1.372
3,3'-DM- 4,4'-DHS	0.00	0.00	0.9699	–	–	0.9699	–	1.349	1.363

^a From ref. [17]^b From ref. [27]

and LUMO energies, AIP, BDE of phenolic hydroxyl groups on each OH site, and the spin density distribution for the radicals formed after H-removal. The conformer with the lowest electronic energy was used for calculation. Using the standard state enthalpies at 1 atm and 298.15 K, the homolytic BDE values were calculated by the following relationship:

$$\text{BDE} = H_{\text{radical}} + H_{\text{H}} - H_{\text{molecule}} \quad (1)$$

where H_{radical} is the total enthalpy of the free radical, H_{H} is the gas-phase total enthalpy of the hydrogen atom, and H_{molecule} is the total enthalpy of the parent molecule.

AIP was calculated as the total energy of the radical species after the electron oxidation minus the total energy of the species before it was oxidized:

$$\text{AIP} = E(\text{ArOH}^{\bullet+}) - E(\text{ArOH}). \quad (2)$$

Results and discussion

Molecular structure–antioxidant activity relationships of the studied stilbenes

From the optimized values of the dihedral angles α ($C_6-C_1-C_8-C_7$) and θ ($C_8-C_7-C_1-C_2$) at the B3LYP/6-31G** level (Table 1), it is evident that all resveratrol analogues studied in this work, are strictly planar. It must be pointed out that the strictly planar geometry of these compounds determines

the energetically favorable delocalization of π -electrons, and the stacking interaction of the planarity of stilbenes system may also facilitate electron transfer.

In compound 3, 4-DHS there is a weak hydrogen bond between the 3-OH and 4-O with a bond length of 2.12013 and between the 3'-OCH₃ and 4'-OH in compound 3, 3'-DM-4, 4'-DHS, with a bond length of 2.07516 Å. These H-bonds stabilize the ground state molecules and inhibit the H-abstraction reaction. However, the free radicals formed after the H-abstraction reaction in 3- and 4-positions in 3, 4-DHS include stronger intramolecular hydrogen bonds with lengths of 1.94853 and 1.9717 Å respectively, which makes the reaction occur easily. The intramolecular hydrogen bonds can be helpful for the stabilization of the 3 and 4 positions free radicals. Therefore, we can say that the higher antioxidant activity of 3, 4-DHS is due to the intramolecular hydrogen bond effect after H-abstraction.

It seems from the geometrics optimized results (Table 2), and reversible conversion from single to double bond, that all resveratrol analogues studied have a semiquinone structure after H-abstraction.

As shown in Table 2, the bond length of C_4-O in 3, 4-DHS, decreased from 1.3606 Å to 1.2530 Å, while, the bonds $C_2=C_3$ and $C_5=C_6$ decreased from 1.3842 Å and 1.3939 Å to 1.37481 Å and 1.3677 Å, respectively. On the contrary, the bonds of $C_3=C_4$, $C_4=C_5$, $C_6=C_1$ and $C_1=C_2$ increased from 1.40910, 1.39102, 1.40525, and 1.41202 to

Table 2 The B3LYP/6-31G** optimized values of the C-O, C-C and C=C bond lengths [Å] in 3, 4 DHS in the gas phase

Compounds	C3-O	C4-O	C1-C2	C5-C6	C2-C3	C3-C4	C4-C5	C6-C1	C=C
3,4-DHS	1.3772	1.3606	1.4120	1.3939	1.3842	1.4091	1.3910	1.4052	1.349
4-Semiquinone	1.3379	1.2530	1.4369	1.3677	1.3748	1.4732	1.4423	1.4369	1.362
3,4 Quinone	1.2232	1.2183	1.3661	1.3462	1.4599	1.5546	1.4742	1.4763	1.352

1.47328, 1.44239, 1.43698 and 1.43698 Å, respectively. The most stable structure for both 4 and 4'-radicals is the semiquinone form, in which the unpaired electron is disposed on the whole molecule by the double bond. The semiquinone resonance structures are favorable to stabilize the free radicals. The 5-O radicals in RSV and 3, 5- DHS, also have the same resonance structure as the 4-radical, but the unpaired electron is mainly distributed on the 5, 2, 4 and 6 atoms.

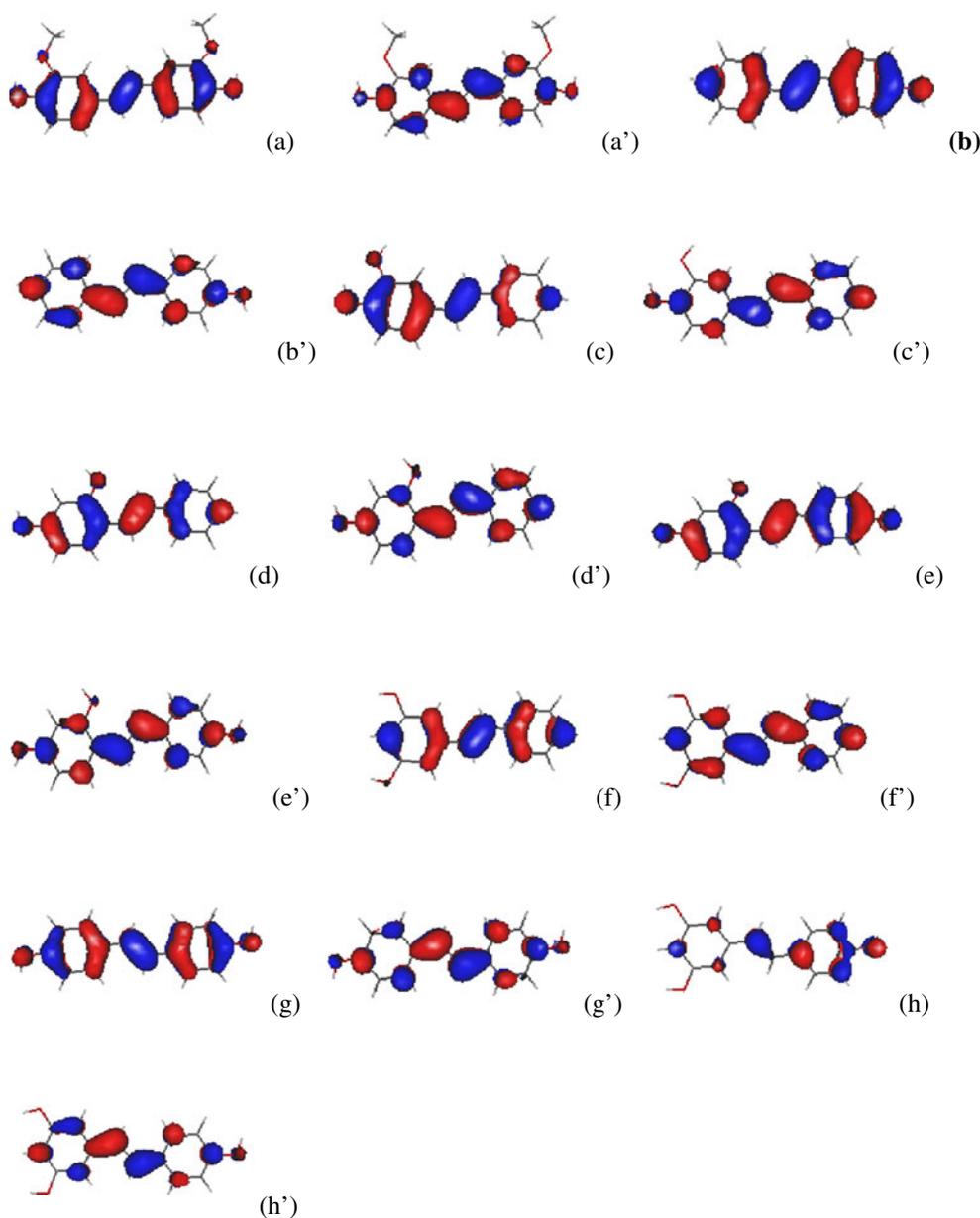
HOMO and LUMO

Both HOMO and LUMO are the main orbitals involved in the chemical reaction. The HOMO energy characterizing the

ability of electron-giving is suitable for representing the free radical scavenging potential of polyphenols, since the process to impede the auto-oxidation may involve not only the H-atom abstraction but also, the electron-transfer [21]. Higher values of ϵ_{HOMO} suggest that the molecule is a good electron donor [22]. On the other hand, the atomic sites characterized by high density of the HOMO distribution are very sensitive to the attack of free radicals and other reactive agents. The more HOMO orbital is delocalized, the more numerous are the electron sites, and more redox reactions will occur [17].

Figure 3 (a, a') shows that both HOMO and LUMO are delocalized in the whole 3,3'-DM-4,4'-DHS molecule except for C₃, C_{3'}, and C_{5'} atoms and 3, and 3'-O-

Fig. 3 The density distributions of HOMO and LUMO of 3,3'-DM-4,4'-DHS (a,a'); 4-HS (b,b'); 3,4-DHS (c, c'); 2,4-DHS (d,d'); 2,4,4'-THS (e,e'); 3,5-DHS (f,f'); 4,4' - DHS (g,g') and RSV(h,h'), respectively



methoxy groups for LUMO. Considering the disposition of HOMO and LUMO orbitals, O₄ and O_{4'} atoms of the two hydroxyls donate electrons easily so that it is possible to lose an electron during the H-abstraction reaction and form the electropositive free radical, then the proton transfer occurs. The OH groups of both 4 and 4'-positions are easily attacked by either the electrophilic or nucleophilic agents. The HOMO and LUMO electron

density (Fig. 3c) in 3, 4 DHS is mainly distributed over the molecule except for the 3-OH position for the LUMO. Regarding 4-HS and 4, 4'- DHS, the hydroxyl positions are very sensitive to the attack of free radicals and other reactive agents, due to the high density of the HOMO distribution. Noting that, the HOMO and LUMO orbitals are distributed in all hydroxyl sites, but the HOMO density is higher in 4 and 4'-OH than

Table 3 Theoretical properties of resveratrol and derivatives

Compounds	E _{total} /Hartree	HOMO (ev)	LUMO (ev)	BDE (O-H) kJ mol ⁻¹	AIP kJ mol ⁻¹
33'-DM-44'-DHS	-920.222815	-4.8294	-1.0003		586.7466
<i>Semi-quinone form</i>	-919.589188	α=-5.0158 β=-6.0014	α=-1.6117 β=-3.3053	350.1211	
<i>Para-quinone form</i>	-918.967004	-5.6071	-3.4076	670.1976	
3,4-DHS	-691.170654	-5.1698	-1.2503		632.7136
<i>4-O-radical</i>	-690.550713	α=-5.2569 β=-6.3027	α=-1.6582 β=-3.4781	314.1890	
<i>3-O-radical</i>	-690.544007	α=-5.5309 β=-5.7971	α=-1.7050 β=-3.5562	331.7954	
<i>Quinone form</i>	-689.919739	-6.2311	-3.4659	657.3460	
4,4'-DHS	-691.169619	-5.0112	-1.0547		613.6919
<i>Semi-quinone form</i>	-690.536455	α=-5.1606 β=-6.1707	α=-1.4857 β=-3.3559	348.9055	
<i>para-quinone form</i>	-689.915495	-6.2039	-3.7431	665.78047	
4, HS	-615.9493435	-5.2420	-1.2109		640.9185
<i>4-O-radical</i>	-615.314812	α=-5.3927 β=-6.3522	α=-1.6413 β=-3.4963	352.4943	
3,5-DHS	-691.168631	-5.4972	-0.0487	371.5491	666.76398
<i>3-O-radical</i>	-690.5268428	α=-6.0011 β=-5.8256	α=-1.7611 β=-3.5997		
2,4-DHS	-691.16791	-5.0692	-1.0187		622.3615
<i>4-O-radical</i>	-690.53572	α=-5.3181 β=-6.3021	α=-0.0541 β=-3.4661	346.3485	
<i>2-O-radical</i>	-690.53840	α=-5.2822 β=-5.8520	α=-1.3896 β=-3.4577	339.3122	
2, 4,4'-THS	-766.38929	-4.8509	-0.8484		596.5397
<i>4-O-radical</i>	-765.75754	α=-5.0781 β=-6.0545	α=-1.3066 β=-3.3203	345.5608	
<i>2-O-radical</i>	-765.760422	α=-5.0278 β=-5.6406	α=-1.2280 β=-3.3099	337.62663	
<i>4'-O-radical</i>	-765.755869	α=-4.9848 β=-6.0197	α=-1.2751 β=-3.1946	349.5805	
<i>para-quinone form</i>	-765.137772	-6.1484	-3.6596	658.9279	
Resveratrol	-766.389138	-5.2183	-1.1714		635.9039
<i>4'-O-radical</i>	-765.755404	α=-5.4006 β=-6.1851	α=-1.6144 β=-3.5056	350.4023	
<i>3-O-radical</i>	-765.745116	α=-5.6975 β=-5.5209	α=-1.6207 β=-3.5467	377.4134	

in 2-OH position. It was noticed that the HOMO density was absent in both 3-OH and 5-OH sites in 3, 5-DHS and RSV. If we look closely at Fig. 3, we can see that there is a significant HOMO density contribution from the double bond between C₇ and C₈ connecting the phenyl rings, in all RSV analogues. The vinyl double bond ensures π -electron delocalization between the A- and B-rings, contributes to the stabilization of RO \cdot after H-abstraction, and hence contributes to the antioxidant activity.

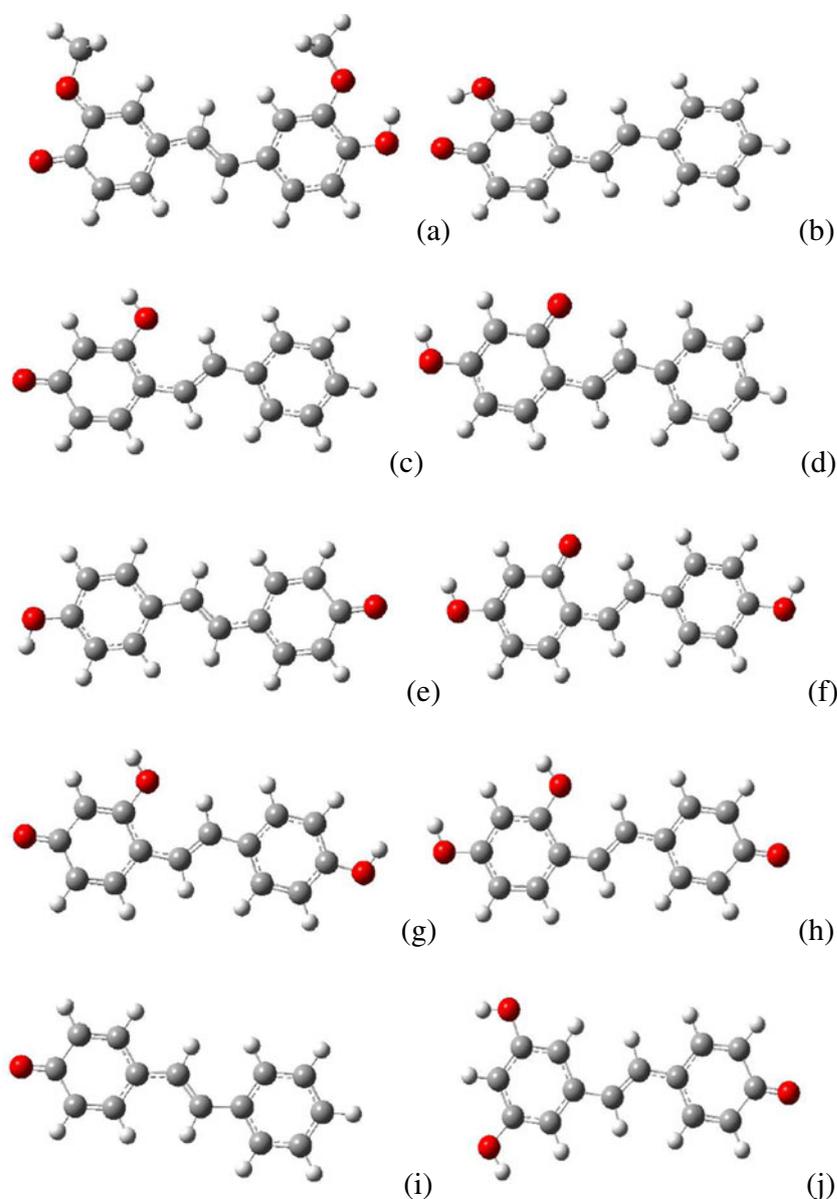
The ϵ_{HOMO} eigenvalue of 4-HS is -5.2420 eV. The substitution of a hydroxyl group in 2, 3 and 4' positions of the antioxidant pharmacophore 4-HS leads to compounds with ϵ_{HOMO} eigenvalues; -5.0692, -5.1698 and -5.0112 eV, respectively. These values are higher than that of RSV

(-5.2183 eV). The most nucleophilic compounds in this theoretical study are 3,3'-DM-44'-DHS and 2, 4, 4'-THS with ϵ_{HOMO} values of -4.8294 eV and -4.8509 eV, respectively. The results obtained in the present work indicate that the existence of a catechol structure or the addition of the methoxy groups increased HOMO values.

Adiabatic ionization potential (AIP)

Both AIP and HOMO are used to determine the electron donating ability of a molecule. The electron abstraction is the first step of the antioxidant mechanism. Therefore, molecules with a lower AIP are more active. However, low values of AIP do not guarantee high antioxidant potency of the antioxidants studied [23]. A low AIP or a high

Fig. 4 The B3LYP/6-31** fully optimized structures of the resonance forms of 4-O-radical of 3, 3'-DM4, 4'-DHS (1); 3,4-DHS (2); 2,4-DHS (3); 4, 4'-DHS (5); 2,4,4'-THS(7); 4'-O-radical of 2,4,4'-THS (8); 4-HS (9) and RSV (10); and 2-O-radical of 2,4-DHS (4) and 2,4,4'-THS(6)



HOMO reflects a strong ability to donate the electrons [24]. The results in Table 3 reveal that the highest AIP values correspond to the lowest HOMO values. For example, 3, 3'-DM-4, 4'-DHS has the highest AIP but the lowest HOMO, while 3, 5-DHS has the lowest AIP but the highest BDE.

Bond dissociation energy (BDE)

The antioxidant activity reflected in the calculated BDE values is often attributed to π -electron delocalization, leading to the stabilization of the radicals obtained after H-abstraction. This conclusion is drawn assuming that, if π electron delocalization exists in the parent molecule, it also exists in the corresponding radical [25]. In order to understand the relationship between the electron delocalization and the reactivity of the radicals, we examined the electron distribution in the singly occupied molecular orbital (SOMO), called in this case, the α -HOMO. By comparing the shape of the α -HOMO to that of the first unoccupied β orbital, we found that α -HOMO is the highest-occupied molecular orbital of spin α , and it is delocalized over the entire molecule. The shape of α -HOMO is quite similar for all radicals, and does not exhibit sufficient variations to explain the differences in activity between the OH groups. Therefore, the shape of α -HOMO is not a reliable indicator for our investigation as it does not describe the global electronic behavior of the radical.

The spin density is often considered to be a more realistic parameter and provides a better representation of the reactivity [26]. The importance of the spin density for the description of RSV antioxidant activity has been pointed out by Cao et al. [27]. We have, therefore, decided to analyze the spin density of all radicals and used Eq. (1) to calculate the hydroxyls BDEs (Table 3).

The H-abstraction reactions of hydroxyls occur easily, because of their lower BDEs (Table 3) compared to the bond energy of the covalent O-H bonds in water (498.0 kJ mol⁻¹) [28]. BDE value of 4-HS is 352.494 kJ mol⁻¹. The

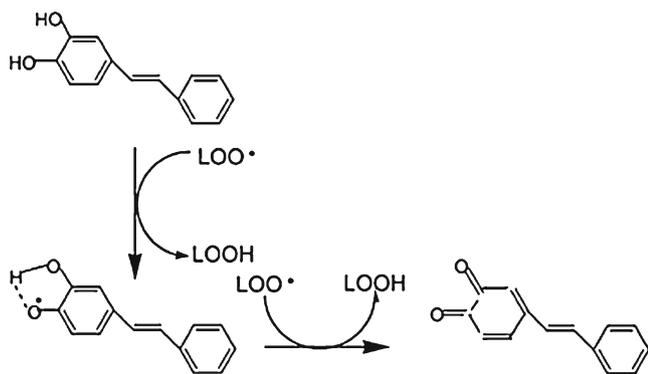


Fig. 5 Mechanism of 3, 4-DHS inhibited peroxidation

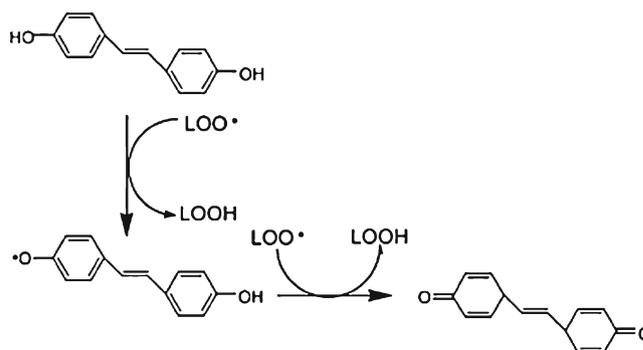


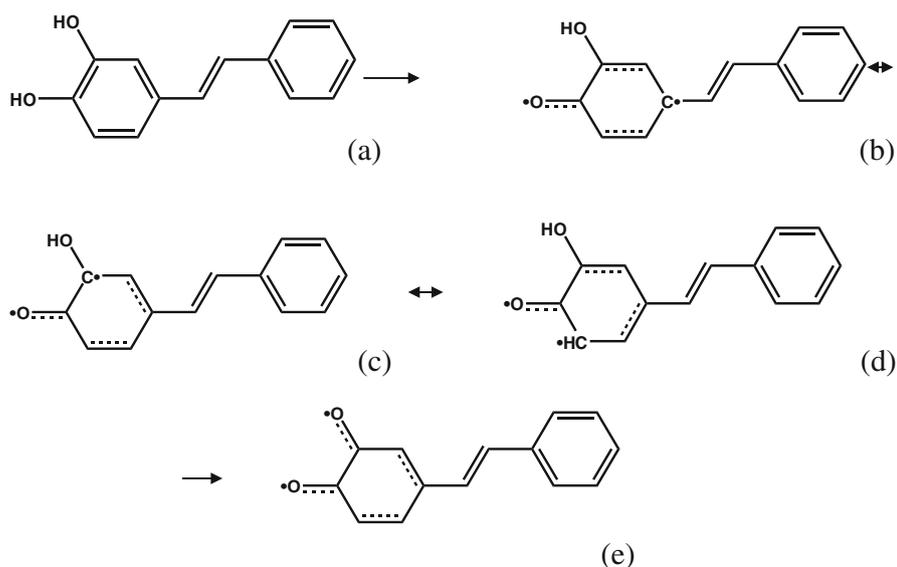
Fig. 6 Mechanism of 4, 4'-DHS inhibited peroxidation

addition of OH in 3, 2, and 4' positions of 4-HS (to obtain 3,4-DHS; 2,4-DHS; and 4,4'-DHS, respectively) decreased the 4-O-radical BDE values to 314.1890, 346.3485 and 348.9055 kJ mol⁻¹, respectively. These BDE values are lower than that of 4'-O-radical of RSV (352.1 kJ mol⁻¹). On the other hand, the BDE value for the semiquinone form of 4, 4'-DHS was 348.9055 kJ mol⁻¹, the additional OH in 2-position leading to 2,4, 4'-THS decreased BDE value of 4'-O-radical to 345.5608 kJ mol⁻¹. The addition of two methoxy groups in both 3 and 3' positions of 4, 4'-DHS increased the semiquinone BDE value to 350.1211 kJ mol⁻¹. The BDE of the 4-semiquinone form of 3,3'-DM-4,4'-DHS is higher than that of the 4, 4'-DHS, despite that the spin density on the O-atom of the 4-OH radical of the 4, 4'-DHS (0.3124) is higher than that in 3,3'-DM-4,4'-DHS (0.2788). This difference is related to the existence of an H-bond between the hydrogen in the 4-OH and 4'-OH groups with the oxygen atoms of the methoxy groups on C₃ and C_{3'} respectively. As a consequence, the BDEs on those sites are higher because the H-removal also implies the breaking of the H-bond. The BDE of 2-O radical in 2, 4 DHS was lower than the 4-O radical, and the BDE of 2-O radical in 2, 4, 4' THS was lower than that of 4, 4'-O radical. The unpaired electron of the 2-OH radical is on C₁ (of 2, 4 DHS and 2, 4, 4' THS), so that it can conjugate with the double bond. This indicates that the 2-O radicals are more stable than the 4, 4'-O radicals and the H-abstraction takes place easier in the 2-position than in the 4- and 4'-ones. For other stilbenes such as resveratrol, the 4'-O-radical is the most stable (Fig. 4).



Fig. 7 The 3, 4 ortho-quinone and 4, 4'para-quinone structure of 3,4-DHS and 4, 4'-DHS

Fig. 8 The formation of semiquinone and quinone structures of 3, 4-DHS



Calculated BDE values for these compounds are in correspondence with the spin density results.

3, 4-DHS bearing ortho-diphenoxyl functionality, like rosmarinic acid [29], is remarkably more active than resveratrol and other ROHs. This is understood in view of the antioxidation mechanism of phenolic antioxidants as exemplified in Fig. 5.

As shown in Fig. 6, the 4'-OH group in 4, 4'DHS, also enhances the activity since it is able to stabilize the phenoxyl radical intermediate by resonance through the trans-double bond and be further oxidized to a para-quinone [3], nevertheless, there has been no experimental or theoretical supporting evidence.

Jovanovic et al. [30] proved experimentally that the ortho-position phenolic hydroxyls of flavonoids could undergo an abstraction of two hydrogen atoms and form a quinone structure, but there is no experimental data proving the abstraction of the second hydrogen in the para position of the 4,4'-DHS and other stilbenes, to give the para-quinone structure. We have calculated the BDE of the quinone formed by losing both hydrogen atoms in both 3, 4-ortho and 4, 4'-para-quinone positions. Figure 7 shows the geometry optimization of both ortho and para quinone structures of 3, 4-DHS and 4, 4'-DHS respectively.

We calculated the BDE of the quinone structure (Table 3) formed by losing the two hydrogen atoms in the ring A of 3,4-DHS. It is 657.3460 kJ mol⁻¹ and only 11.3615 kJ mol⁻¹ different from the BDE sum of losing 4-H and 3-H, respectively. On the other hand, the BDEs of the para 4, 4'-quinone structure of 3,3'-DM-4,4'-DHS, 4, 4'-DHS and 2,4,4'-THS were 670.1976, 665.7707 and 658.9279 kJ mol⁻¹. The half of these values are 335.0988, 332.8853 and 329.46395 kJ mol⁻¹, respectively, and are lower than those obtained for the semiquinone radicals BDEs (348.9055, 350.1211 and 345.5608 kJ mol⁻¹) (Table 3); this shows the relative stability of the para-quinone structure.

As shown in Table 2, the C₃-O and C₄-O bond lengths in 3, 4-DHS parent molecule decreased from 1.3772 and 1.3606 to 1.22322 and 1.2183 Å, in the 3, 4 quinone form.

The same change was observed in C₁-C₂ and C₅-C₆ bond lengths, decreasing from 1.4120 and 1.3939 to 1.36619 and 1.3462 Å respectively. Furthermore, C₂-C₃, C₃-C₄, C₄-C₅, and C₆-C₁, bond lengths increased from 1.3842, 1.4091, 1.3910 and 1.4052 to 1.4599, 1.5546, 1.4742 and 1.4763 Å respectively.

The HOMO and LUMO energies of the 3,4-DHS ground state molecule are -5.1698 and -1.2503 eV, respectively. After the semiquinone structure formation, the 4-O radical HOMO energy is -5.2569 eV and LUMO is -1.6582 eV, the HOMO energy of the 3-O-radical is -5.5309 eV, and the LUMO is -1.7050 eV. For the quinone structure, the HOMO and LUMO energies are -6.2311 eV and -3.4659 eV, respectively. This indicates that the semiquinone form would provide an electron again to continue the H-abstraction.

As shown in reaction mechanism (Fig. 8), the first H-abstraction in 3,4-DHS occurs in the 4-position and the radical formed will be stabilized by the semiquinone

Table 4 Spin density on the oxygen atoms in phenoxy radicals of *trans*-resveratrol and its analogues

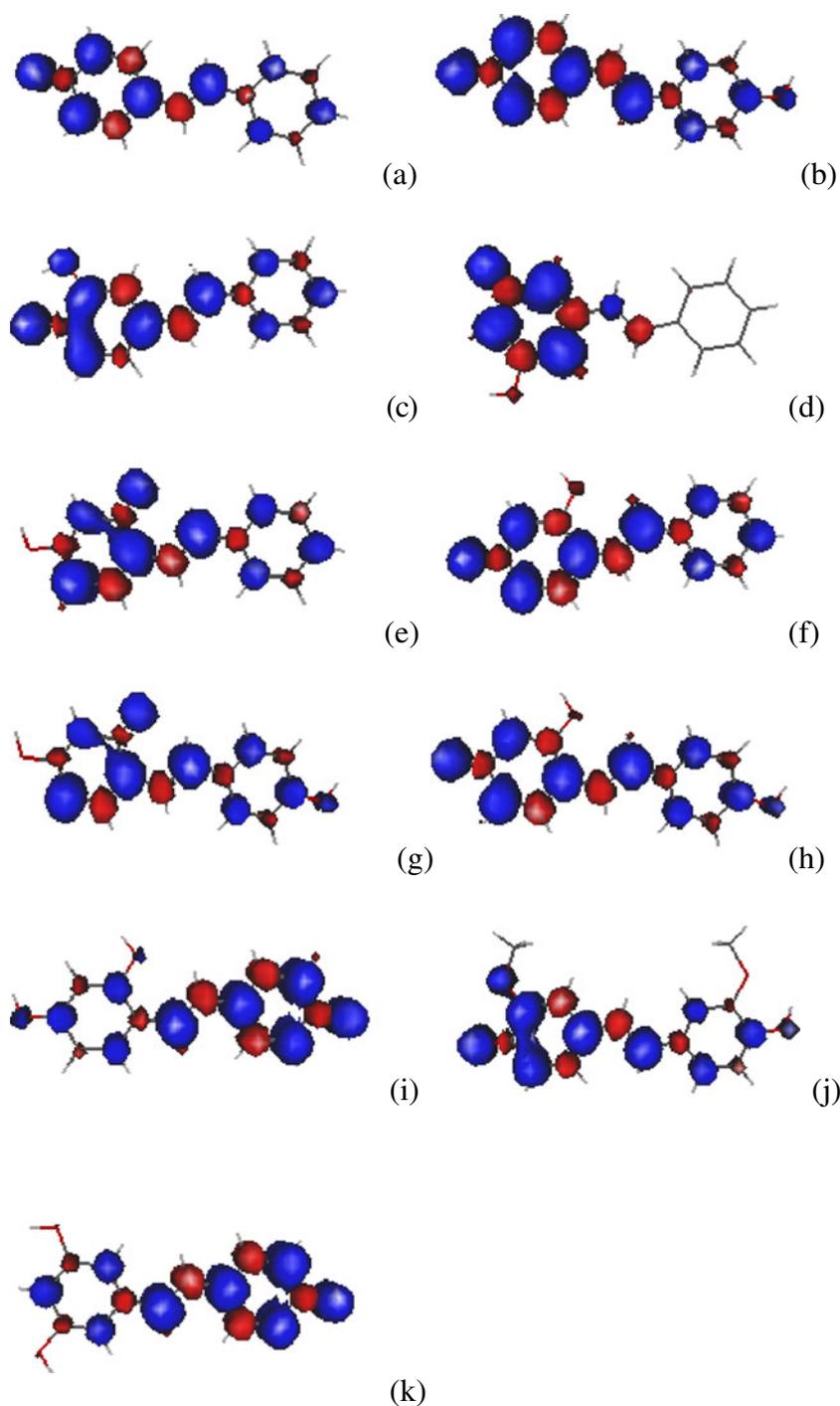
Compounds	4-OH	2-OH	3-OH	5-OH	4'-OH
<i>Trans</i> -resveratrol	–	–	0.4415	–	0.3211
4-HS	0.3205	–	–	–	–
3,5-DHS	–	–	0.4143	–	–
2,4-DHS	0.2928	0.2533	–	–	–
3,4-DHS	0.2853	–	0.3317	–	–
2,4,4'-THS	0.2841	0.2407	–	–	0.3119
4,4'-DHS	0.3124	–	–	–	–
3,3'-DM-4,4'-DHS	0.2788	–	–	–	–

structure (Fig. 8a and b) after passing through the three resonance structures (Fig. 8b–d). The hydrogen atom of the ortho-position hydroxyl is abstracted again and the quinone structure is formed (Fig. 8d and e).

According to the discussion above, it would be inferred that the semiquinone free radical and the 3, 4 ortho-quinone structure are the proper explanations for the higher antioxidant activity of 3, 4-DHS. The same observation was reported for resveratrol by Cao et al. [27]. Concerning the

compounds bearing 4, 4'-OH, such as 4, 4'-DHS, an H-abstraction may occur at the 4-position of the A ring and a semiquinone free radical and the 4, 4'-para quinone structure are the proper explanations for the higher antioxidant activity of 4, 4'-DHS, 3, 3'-DM4, 4'-DHS and 2, 4, 4'-THS. Moreover, the oxygen atoms of the ortho-hydroxyls (4-OH to 3-methoxy and 4'-OH to 3'-methoxy groups for 3, 3'-DM-4, 4'-DHS and 4-OH to 3-OH in 3, 4 -DHS) contribute to the single

Fig. 9 Distribution of spin densities in the radicals formed by H-removal from the A and B rings for 4-HS (1); 4, 4'-DHS (2); 3,4-DHS (3); 3,5-DHS (4); 2,4-DHS (5, 6); 2,4,4'-THS (7, 8, 9); 3, 3'-DM4, 4'-DHS (10) and resveratrol (11) computed at B3LYP/6-31G**



electron dispersing, this is why the spin density has been reduced from 0.3124 in 4, 4'-DHS to 0.2788 in 3,3'-DM-4,4'-DHS and from 0.3205 in 4-HS to 0.2853 in 3,4-DHS, respectively. The inductive effect has an important

contribution in the stabilization of the free radical as well as the hydrogen bond effect. The 2-O-radical of 2,4,4'-THS, displays a low spin density compared to the 4 and 4'-O-radicals because of the resonance effects.

Fig. 10 Spin density in the 4-O-radical of 3, 3'-DM 4, 4'-DHS (1); 3,4-DHS (2); 4, 4'-DHS (3); 4-HS (4); 2,4-DHS (5);, and 2,4,4'-THS(8); 4'-O-radical of 2,4,4'-THS (9) and resveratrol (11); 2-O-radical of 2,4-DHS (6) and 2,4,4'-DHS (7) and 3-O-radical of 3,5-DHS (10) computed at B3LYP/6-31G**

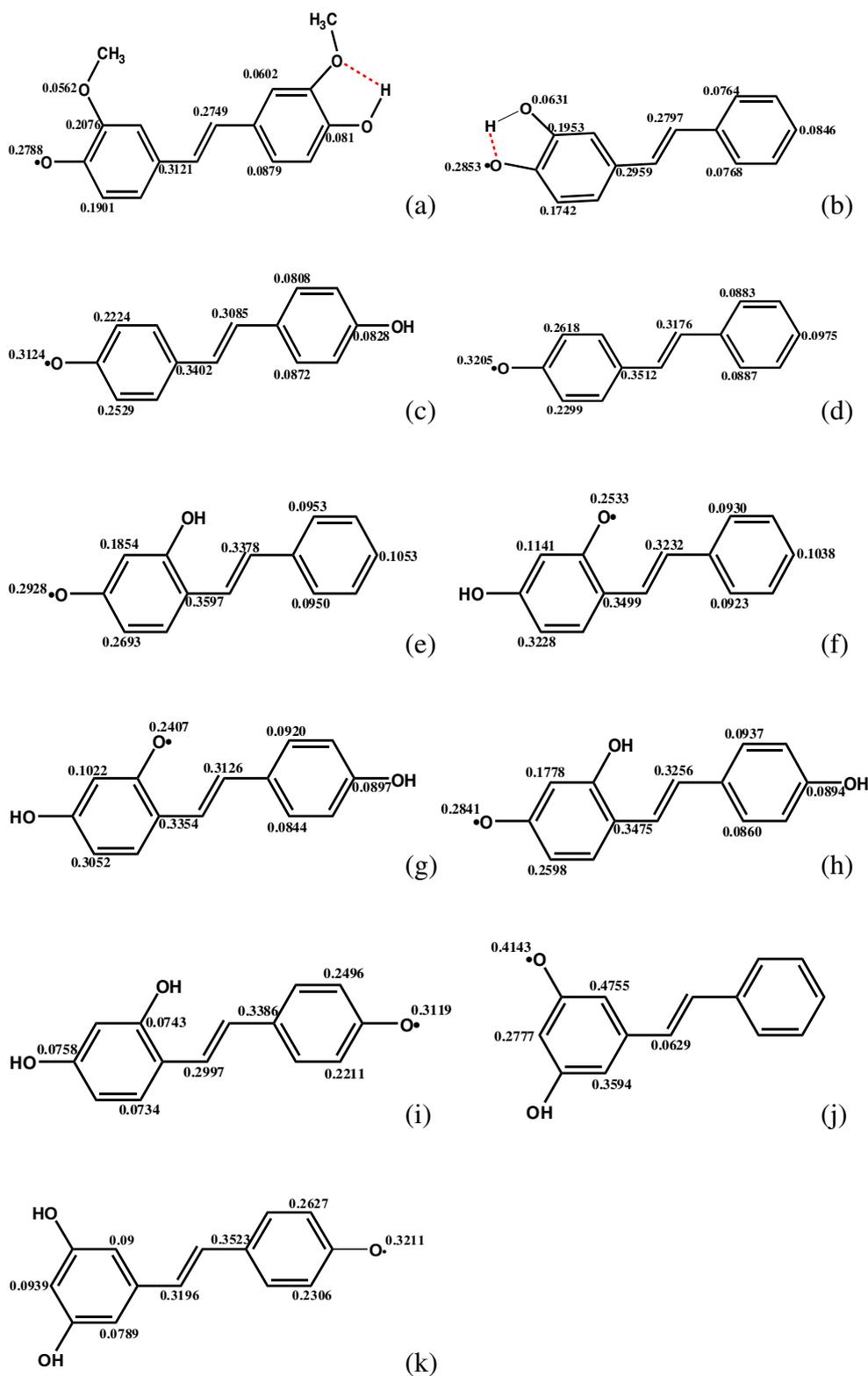
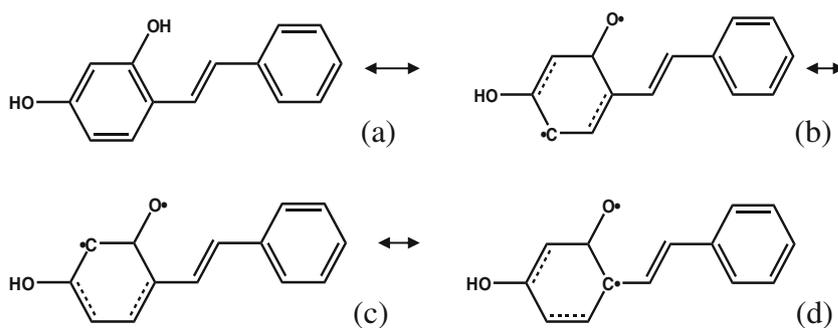


Fig. 11 The resonance structures of the 2, 4-DHS radicals



Spin density

Another molecular parameter correlated with the free radical scavenging activity is the spin density, which was also calculated. Spin density characterizes the distribution of electron spin in the free radicals and is responsible for their stability [17]. It must be stressed that the more delocalized the spin density in the radical, the easier the radical formed and thus the lower the BDE [31]. The spin density on the 4-O-radical in the 3, 4-DHS is 0.2853 (Table 4), whereas it is 0.3317 for the 3-O-radical (Fig. 9). This is a consequence of delocalization effects due to the presence of the double bond between C_7 and C_8 , which allows for spin presence on the C_8 . Indeed, the dominant structures of the 4-O-radicals are those in which the unpaired electron is disposed on the whole molecule. The 3-O-radical also has the same resonance structure as the 4-O-radical, but the unpaired electron is mainly distributed on the A ring (Fig. 9). Unlike the unpaired electron on C_1 of the 4-O-radical, the unpaired electron on the C_2 of the 3-O-radical can not conjugate with the double bond.

Here, it must be stressed that a hydroxyl group substituted on a carbon with positive spin density increases the stability of a radical and has the opposite effect when substituted on a carbon with negative spin density [32].

Note that the spin density on 4-O- atom in 4- HS is 0.3205 and it is delocalized through the whole molecule as shown in Fig. 9. C_1 (0.3512), C_3 (0.2618), C_5 (0.2299) and C_8 (0.3176) atoms are positive spin density centers, while C_2 , C_4 , C_6 are negative ones. With the addition of an OH-group on the 3-ortho position of 4- HS, the spin density on 4-O-radical decreases to 0.2853, with the delocalization on C_1 (0.2959), C_3 (0.1953), C_5 (0.1742) and C_8 (0.2797). Moreover, the 3-OH added is substituted on a carbon with positive spin density as shown in Fig. 10, so it increases the stability of the 4-O-radical. The addition of an OH-group on the 4'-para position in 4-HS, decreases the spin densities on the 4-O-radical to 0.3402 (C_1), 0.2224 (C_3), 0.2529 (C_5) and 0.3085 (C_8). In 4, 4'-DHS, 4'-OH is substituted on a carbon with positive spin density which contributes to the stability of the radical. On the other hand, 3,3'-DM-4,4'-DHS is the result of adding two methoxy groups in 4,4'-DHS on 3 and 3' -positions, the spin density on 4-O-radical decreases to

0.2788, with delocalization on C_1 (0.3121), C_3 (0.2076), C_5 (0.1901) and C_8 (0.2749). In view of BDEs, AIP and spin density values (Tables 3 and 4), it appears that O_3 and O_5 have almost no contribution to resveratrol antioxidant activity. As a consequence, 3, 5-DHS is not a good antioxidant.

The spin density on 4-O-radical of 2,4-DHS is 0.2928 and localized on C_1 (0.3597), C_3 (0.1854), C_5 (0.2693) and C_8 (0.3378). The addition of an OH group to the 2-position of 4-HS, unlike the other analogues, increases the spin density on C_8 . It is noticed that the concentration in B-ring is slightly increased. The same finding was obtained with 2, 4, 4'-THS (addition of an OH to 4, 4'-DHS on the 2-position). On the other hand, the spin density value of 2-O-radical is 0.2533 in 2,4-DHS and 0.2407 in 2, 4, 4'-THS respectively. The later spin density values are lower than that of 3,4-DHS 4-O radical (0.2853), despite higher BDE values; 339 and 337 kJ mol^{-1} for 2,4-DHS and 2, 4, 4'-THS respectively, compared with that of 3,4- DHS (314.1890 kJ mol^{-1}). This is the effect of the vicinity of the double bond to the 2-position in both 2, 4-DHS and 2, 4, 4'-THS. The most stable structure for these molecules is that in which the unpaired electron is localized on the ortho position of the 2-O-radical (Figs. 11 and 4). The calculated BDEs of these compounds confirm this result.

The low values of spin density in O-radicals studied show that these compounds are excellent antioxidants.

The experimental observations about some resveratrol derivatives antioxidant activity were satisfactorily explained by the results obtained by Cheng et al. [16] and Cai et al. [3]. Our results confirmed and provided deeper understanding of these experimental observations. Furthermore, we must point out that our theoretical study supports the experimental one about the 2,4,4'-THS antioxidant activity found to be higher than that of resveratrol for AAPH test but not for the Cu^{2+} -induced LDL peroxidation [16].

Conclusions

The results of this DFT computations revealed that *trans*-3, 4-DHS; *trans*-3, 3'-DM4, 4'-DHS and 4, 4'-DHS exhibit

remarkably high antioxidant activity. Moreover, the later mentioned compounds are more active antioxidants than *trans*-resveratrol. However, 3,5-DHS and 4-HS are less able to scavenge free radicals than *trans*-resveratrol. These results are in full accordance with experimental results indicating that molecules bearing ortho-dihydroxyl or 4-hydroxy-3-methoxyl groups possess significantly higher antioxidant activity than those bearing no such functionalities. Our calculations demonstrate that the antioxidant potency depends on: (i) the geometry of the neutral compounds and their phenoxy radicals, (ii) the number and position of the hydroxyl groups, (iii) the semiquinone and (iv) quinone structures. It is worth noting that the inductive effect of both hydroxyl and methoxy groups, and the intramolecular hydrogen bond effect after H-abstraction contribute strongly to the antioxidant activity. The OH addition in the 2-position of 4-HS, unlike the other analogues, increases the spin density on C₈ at the double bond. On the other hand, the electron or hydrogen abstraction in ortho position is more favored than in para position for 2, 4-DHS and 2,4,4'-THS. The low spin density in the 2-position compared with the 4-position, revealed that the antioxidant pharmacophore of these two compounds is 2-hydroxystilbene.

AIP values were significantly higher than those of BDE for all compounds studied. In conclusion, this work demonstrates that H-atom transfer takes the main part in free radicals scavenging activity of the antioxidants studied and this mechanism dominates over the single-electron transfer.

Finally, this work contributes to the understanding of the pharmacological activity of the compounds studied. These findings could be useful to both food and pharmaceutical industries.

References

- Fremont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66:663–673
- Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ (1999) Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* 140:1–10
- Cai YJ, Fang JG, Ma LP, Yang L, Liu ZL (2003) Inhibition of free radical induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1637:31–38
- Tadolini B, Juliano C, Piu L, Franconi F, Cabrini L (2000) Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 33:105–114
- Sánchez-Moreno C, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F (2000) Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutr Res* 20:941–953
- Seybert DW, Milnar CM (1998) Antioxidant activity of resveratrol analogs in phospholipid oxidation. *Free Radical Bio Med* 25:S37
- Pinto MC, Garcia-Barrado JA, Macias P (1999) Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric Food Chem* 47:4842–4846
- Richard T, Pawlus AD, Iglesias ML, Pedrot E, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Monti JP (2011) Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann N Y Acad Sci* 1215:103–108
- Tili E, Michaille JJ (2011) Resveratrol, microRNAs, inflammation, and cancer. *J Nucleic Acids*. doi:10.4061/2011/102431
- Vingtdeux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P (2010) AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem* 285:9100–9113
- Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T (2011) Resveratrol activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals* 19:163–174
- Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P, Szekeres T, Jager W (2004) Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure–activity relationship. *Bioorg Med Chem* 12:5571–5578
- Wang MF, Li JG, Rangarajan M, Shao Y, Lavoie EJ, Huang TC, Ho CT (1998) Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46:4869–4873
- Fang JG, Lu M, Chen ZH, Zhu HH, Li Y, Yang L, Wu LM, Liu ZL (2002) Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chem Eur J* 8:4191–4198
- Stivala LA, Savio M, Fedarico C, Perucca P, Bianchi L, Magas G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V (2001) Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* 276:22586–22594
- Cheng JC, Fang JG, Chen WF, Zhou B, Yang L (2006) Structure–activity relationship studies of resveratrol and its analogues by the reaction kinetics of low density lipoprotein peroxidation. *Bioorg Chem* 34:142–157
- Mikulski D, Górniak R, Molski M (2010) A theoretical study of the structure–radical scavenging activity of *trans* resveratrol analogues and *cis* resveratrol in gas phase and water environment. *Eur J Med Chem* 45:1015–1027
- Queiroz AN, Gomes BA, Moraes WM Jr, Borges RS (2009) A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur J Med Chem* 44:1644–1649
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB et al. (2003) Gaussian 03. Gaussian, Inc., Pittsburgh
- Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP (1985) AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc* 107:3902–3909
- Nagaoka SI, Kuranaka A, Tsuboi H, Nagashima U, Mukai K (1992) Mechanism of antioxidant reaction of vitamin E: charge transfer and tunneling effect in proton-transfer reaction. *J Phys Chem* 96:2754–2761
- Fukui K (1982) Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science* 218:747–754
- Mikulski D, Molski M (2012) A quantum chemical study on the antioxidant activity of bioactive polyphenols from peanut (*Arachis hypogaea*) and the major metabolites of *trans* resveratrol. *Theochem* 981:38–46
- Chen W, Guo P, Song J, Cao W, Bian J (2006) The Ortho hydroxy-amino group: another choice for synthesizing novel antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett* 16:3582–3585
- Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux JL (2006) A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: the specificity of the 3-OH site. *Food Chem* 97:679–688
- Szabo A, Ostlund NS (1982) Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory. Dover, New-York
- Cao H, Pan X, Li C, Zhou C, Deng F, Li T (2003) Density functional theory calculations for resveratrol. *Bioorg Med Chem Lett* 13:1869–1871

28. Berkowitz J, Ellison GB, Gutman D (1994) Three methods to measure RH bond energies. *Phys Chem* 98:2744–2765
29. Cao H, Cheng WX, Li C, Pan XL, Xie XG, Li TH (2005) DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *THEOCHEM* 719:177–183
30. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MJ (1994) Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc* 116:4846–4851
31. Parkinson CJ, Mayer PM, Radom L (1999) Assessment of theoretical procedures for the calculation of reliable radical stabilization energies. *J Chem Soc Perkin Trans 2*:2305–2313
32. Senthilkumar K, Kumaresan R (2012) A DFT study on the structural, electronic properties and radical scavenging mechanisms of calycosin, glycitein, pratensein and prunetin. *Theochem* 985:14–22



Homolytic and heterolytic O–H bond cleavage in *trans*-resveratrol and some phenanthrene analogs: A theoretical study



Ali Benayahoum^{a,*}, Habiba Amira-Guebailia^a, Omar Houache^b

^a Laboratory of Applied Chemistry, Guelma University, 8 Mai 1945, Guelma 24000, Algeria

^b Petroleum & Chemical Engineering Department, Sultan Qaboos University, P.O. Box 33, Al Khoud 123, Muscat, Oman

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2014

Received in revised form 8 March 2014

Accepted 9 March 2014

Available online 24 March 2014

Keywords:

Phenanthrene

Resveratrol

DFT

HAT AIP

PA

ETE and SPLET

ABSTRACT

In this article, quantum chemical calculations based on the density functional theory (DFT) have been used to study the relationship between the structure and the antioxidant activity of *trans*-resveratrol (RSV) and its phenanthrene analogs in the gas phase, benzene and water. Our investigation includes H-atom transfer (HAT), single electron transfer–proton transfer (SET–PT) and sequential proton loss electron transfer (SPLET) mechanisms. The calculated values were in good agreement with the experimental results. Like other phenolic compounds, the H-atom transfer mechanism is the thermodynamically preferred mechanism in vacuum, for the studied molecules. While, the SPLET mechanism is the thermodynamically favorable pathway in water. Our calculations suggest that, SET–PT is not the most preferred mechanism in all environments studied.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

In biological systems, the occurrence of free radicals, species bearing at least one unpaired electron in the outermost shell [1], was revealed less than 50 years ago [2]. Free radicals are unstable and highly reactive with adjacent molecules such as lipids, proteins, and carbohydrates, leading to cellular damage [3]. With growing evidence showing the connection between the free radicals induced oxidative stress and the development of a range of illnesses such as cardiovascular, congestive heart failure, diabetes, arterial hypertension and cerebrovascular accidents [4], the role of radical-scavenging antioxidants has received increasing attention [5,6].

Polyphenols are the most important group of naturally occurring antioxidants. They constitute one of the most broadly distributed classes of compounds in the plant world with more than 8000 structures already identified [7]. Stilbenes (1,2-diarylethenes) are non-flavonoid polyphenols occurring in plant tissues and associated to the resistance of plants against fungal attack such as *Botrytis cinerea*, or abiotic stress, such as UV irradiation [8,9]. *Trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-stilbene) (RSV) is a naturally occurring phytoalexin found in many plants such as the grapevine *Vitis vinifera* L. [10]. Several studies have reported on the

antioxidant activity of resveratrol [11,12] and many researchers have emphasized the key role played by the 4'-OH of resveratrol in the antioxidant activity [12–20]. Recently, we have demonstrated by theoretical computations that the antioxidant potency of molecules bearing para-dihydroxyl groups depends on the para-quinone structure generated from the stilbene's original structure after H-abstraction [20]. We have also shown that the 2-hydroxystilbene is a novel antioxidant pharmacophore for the stilbene's skeleton and contributes to the antioxidant action more than 4'-OH in the same molecule [20].

On the other hand, Nazarpour et al. [21] investigated the effect of 23 substituents with various electron-donating and electron-withdrawing characters on resveratrol analogs O–H bond dissociation enthalpies (BDEs) via density functional theory (DFT). The results revealed that the mutual positions of substituents and OH groups affect substantially investigated BDEs. Formation of strong intramolecular hydrogen bonds and suitable spin density distributions in several radicals result in low BDEs. On the other hand, the calculated BDEs have been correlated with Hammett constants, selected geometry parameters, and charge on phenoxy radical oxygen q (O). Moreover, a quantum calculation based on DFT method was performed to study the antioxidant activity of *trans*-resveratrol, its O-sulfate metabolites, and peanut stilbenoids [22]. Peanut polyphenols are found to be more active donors of hydrogen atoms in the gas phase than in water medium, in which the compounds studied are more susceptible to electron donation

* Corresponding author.

E-mail address: ali_benay@yahoo.fr (A. Benayahoum).

than in the gas phase. The calculations have shown that the O-sulfates, O-disulfates and O-trisulfates studied are more efficient hydrogen donors than *trans*-resveratrol.

Trans-resveratrol has received extensive attention, not only for its biological importance, but also for being a reference molecule for the design of drugs with enhanced antioxidant potency [19,23,24]. The two main working mechanisms of phenols (ArOH) antioxidant action [25,26] are:

(1) The hydrogen atom transfer (HAT) mechanism:



(2) The single-electron transfer followed by proton transfer (SET-PT).



Another process has been discovered and confirmed on the basis of kinetics experiments - sequential proton loss electron transfer (SPLET) [27,28].



The net result of all three mechanisms which is the formation of phenoxy radical ArO[•], is the same. The reaction enthalpies related to individual steps of the above described mechanisms are usually denoted as follows:

BDE: O–H bond dissociation enthalpy related to (Eq. (1)).

AIP: ionization potential, enthalpy of electron transfer from the antioxidant (Eq. (2.1)).

PDE: proton dissociation enthalpy (Eq. (2.2)).

PA: proton affinity of phenoxide anion (Eq. (3.1)).

ETE: electron transfer enthalpy (Eq. (3.2)).

Aiming to find more effective antioxidants than resveratrol, Ding et al. [29] synthesized and studied the experimental antioxidant activity of five hydroxylated phenanthrenes differing in the number and positions of the hydroxyl groups (Fig 1): 3,6-dihydroxyl phenanthrene, (A); 2,4,6-trihydroxyl phenanthrene, (B); 2,3-dihydroxyl phenanthrene, (C); 2,3,6,7-tetrahydroxyl phenanthrene, (D) and 2-methoxy-3-hydroxyl phenanthrene, (E). They found that most of these compounds have shown higher antioxidant potency than resveratrol, especially compound B having the same hydroxyl group substitutions as resveratrol. Recent studies focused mainly on the O–H BDE and AIP [20,30] and neglected SPLET mechanism despite its importance for antioxidant activity. Very few theoretical studies have taken into account PDE, PAs and ETes in theoretical calculations of properties of RSV and derivatives.

Mazzone et al. studied the antioxidant activity of some recently synthesized phenanthrenes [30], their conclusions were drawn on the basis of only BDE and AIP parameters calculations.

In this work, and as a complement to the study undertaken by Mazzone et al. [30], Bond Dissociation Enthalpy (BDE), Proton Affinity with Electron Transfer Enthalpy (PA and ETE) and Adiabatic Ionization Potential with Proton Dissociation Enthalpy (AIP and PDE), were investigated to evaluate the antioxidant activity of resveratrol and the above mentioned molecules (A–E). Hence, BDE of hydroxyl group represents the reaction enthalpy of HAT. PA of the phenoxide anion is related to the first step of SPLET mechanism and AIP is related to the first step of SET-PT process. Therefore, BDE, AIP and PA have been used to determine the most thermodynamically preferred reaction mechanism [31,32].

B3LYP/6-311G(d,p) level of theory was employed to perform the reliable optimization of the geometrical parameters of the studied compounds and to calculate physicochemical descriptors characterizing their antioxidant ability. On the other hand, the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) distribution and Mulliken spin density in free radicals were also studied.

It must be stressed that the possible area of action for antioxidants is the biological membranes where unsaturated lipids are present. Hence, our calculations took place in the presence of benzene (non-polar solvent). On the other hand, water is the main substance found in all types of physiological liquids, calculations were therefore, performed in presence of water (a polar solvent). Another important goal of this study is to estimate the effect of water and benzene as solvents, on the individual reaction enthalpies, because SET-PT and SPLET mechanisms are of importance in solvated media.

2. Methods

The molecular structures were obtained using Gaussian 09 [33] by energy minimization at the B3LYP/6-311G(d,p) level and confirmed to have no imaginary frequencies. For the compounds having several conformers, all of them were investigated and the conformer with the lowest electronic energy was used in this work. Frequency calculation revealed that the B3LYP optimized structures were real minima (no imaginary frequency). The absence of spin contamination was noted with the S^2 value which is about 0.75 in all cases. The enthalpy of the parent molecule is then corrected for translational, rotational, and vibrational terms to obtain the thermal corrections including the zero point energy (ZPE). The gas-phase enthalpy of hydrogen atom at 298.15 K, including the translation and PV corrections (–0.49764 hartree), was used. The total enthalpies of the chemical systems studied were computed from the following formula:

$$H_{\text{tot}} = E_0 + \text{ZPE} + \Delta H_{\text{trans}} + \Delta H_{\text{rot}} + \Delta H_{\text{vib}} + \text{RT} \quad (1)$$

where E_0 is the calculated electronic energy, ZPE stands for zero-point energy calculated to demonstrate the difference between harmonic computed frequencies and the actual anharmonic experimental frequencies, ΔH_{trans} , ΔH_{rot} , ΔH_{vib} are translational, rotational and vibrational contributions to the enthalpy, respectively, whereas RT represents pV-work. In this study the UFF model of cavity was employed to evaluate the solvation effects. The PCM (polarizable continuum model) calculations were performed with the tesserae of 0.2 Å² average size.

The calculated gas-phase total enthalpies of proton and electron were 1.48 kcal/mol and 0.75 kcal/mol, respectively [34]. For AIP and ETE calculations, the electron solvation enthalpy value, $\Delta_{\text{solv}}H(\text{e}^-)$, is required, we therefore used published values: –25.1 kcal/mol for water and –1.67 kcal/mol for benzene. For PDE and PA calculations, we need the proton solvation enthalpies, $\Delta_{\text{solv}}H(\text{H}^+)$ in studied solvents. The values –260.51 kcal/mol for water, and –213.67 kcal/mol for benzene were used [31,32].

3. Results and discussion

From the optimized values of the dihedral angles α (C6'–C1'–C8–C7) and θ (C8–C7–C1–C2) for RSV and its phenanthrene analogs at the B3LYP/6-311G(d,p) level, it is evident that all compounds studied in this work, are strictly planar which means that the delocalization of π -electrons is energetically favorable for these compounds, and the stacking interaction of the planarity of stilbenes and phenanthrenes system may also facilitate electron transfer.

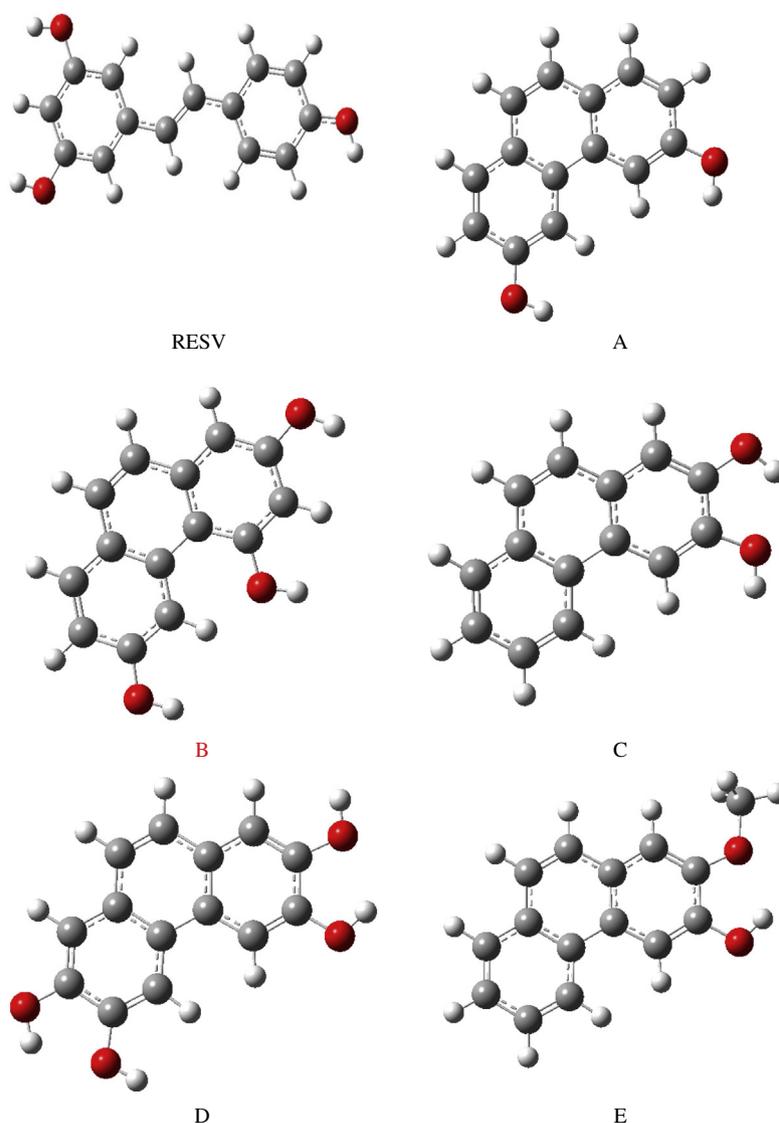


Fig. 1. Geometries of resveratrol and its hydroxylated phenanthrene analogs ground state molecules optimized by B3LYP/6-311G(d,p).

3.1. HOMO and LUMO

HOMO and LUMO are the major orbitals implicated in chemical reactions. The HOMO energy, describing the ability of electron-giving, is an adequate parameter for representing the free radical scavenging potential of polyphenols, since the process to slow down the auto-oxidation may engage the H-atom abstraction as well as the electron-transfer [35]. Higher values of ϵ_{HOMO} for a given molecule indicate that it is a good electron donor [36]. On the other hand, the atomic sites characterized by high density of the HOMO distribution are very susceptible to the attack of various reactive agents. The number of electron sites leading to more redox reactions, depends on HOMO orbital delocalization. In compound A (Fig 2), both HOMO and LUMO orbitals are mainly distributed over the molecule, except for the 3 and 6-OH positions for the LUMO. So, A is only attacked by the electrophilic groups. On the other hand, HOMO orbitals are distributed in three hydroxyl positions in compound B, whereas these orbitals are absent in 3 and 5-OH positions in RSV. In contrast with RSV, all hydroxyl groups are easily attacked by the electrophilic agents in compound B.

In compounds C, D, and E, both HOMO and LUMO orbitals are mainly distributed over the molecule, except for the 2-OH and 2-OCH₃ positions for the LUMO.

On the other hand, a significant HOMO density contribution from the double bond connecting the phenyl rings of hydroxylated stilbenes was confirmed. This vinyl bond plays a major role in π -electron delocalization between the A and B-rings, it takes part in the stabilization of RO \cdot after H-abstraction, and therefore, it contributes to the antioxidant activity.

3.2. Bond Dissociation Enthalpy (BDE)

Molecules with low BDE values are expected to exhibit strong antioxidant activity. In particular, low values of BDE indicate that the antioxidant is able to donate hydrogen during a reaction with free radicals. Calculated BDE values are often attributed to π -electron delocalization, leading to the stabilization of the radicals obtained after H-abstraction. Therefore, molecules with the lowest BDEs are more active. The H-abstraction reactions of hydroxyls occur easily, because of their lower BDE values compared to the energy of the covalent O–H bonds in water (119.02 kcal/mol) [37].

It has been stressed that the gas phase and solution BDE values do not always follow the same trend. Lengyel et al. showed that benzene has practically no effect on BDEs, while large differences in 5-OH BDEs of isoflavones were observed in water [38].

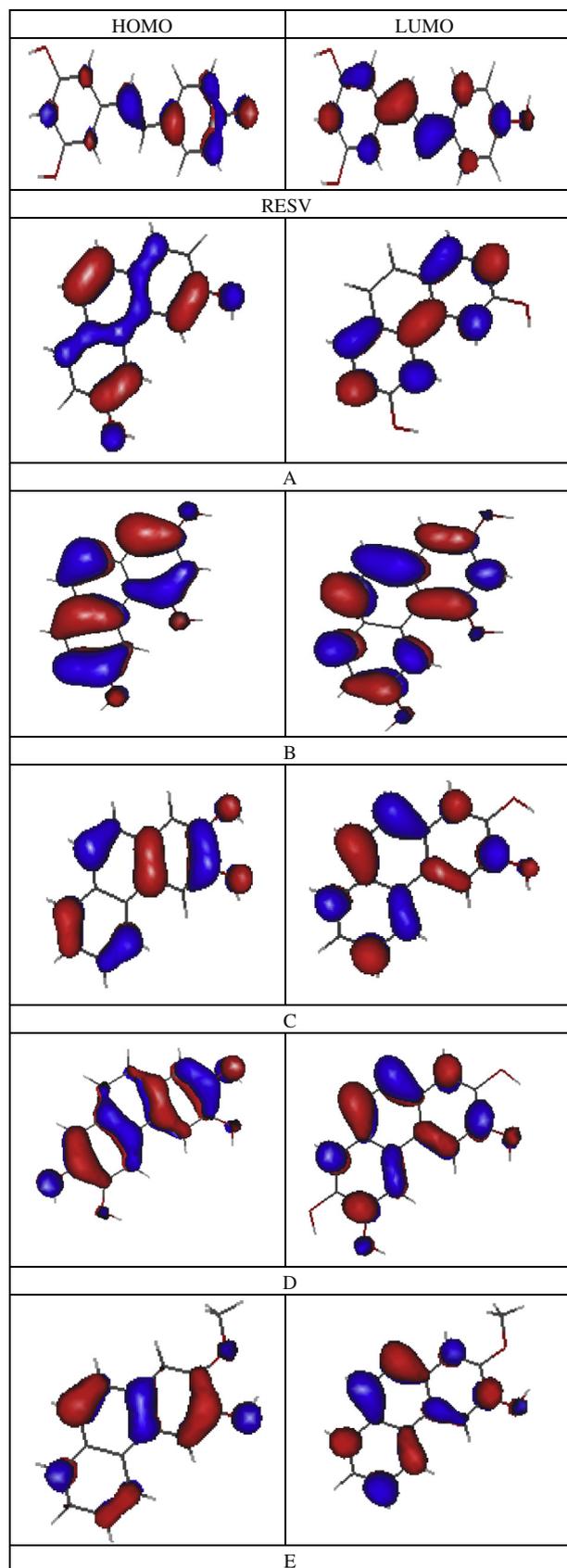


Fig. 2. HOMOs and LUMOs of Phenanthrenes and resveratrol.

Moreover, in real systems, poor solubility and pH may strongly affect the effectiveness of resveratrol and other polyphenols.

Table 1

The computed values of BDE (kcal/mol) obtained at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.

Chemical compound	BDE ^a (vacuum)	BDE ^b (vacuum)	BDE ^b (water medium)	BDE ^b (benzene medium)
<i>T-RSV</i>				
4'-OH-radical	78.66 77.84 ^c 76.86 ^d	85.24	84.46 80.08 ^d	84.76
3-OH-radical	82.87 83.22 ^c 77.34 ^d	89.60	90.00 81.35 ^d	89.59
5-OH-radical	83.15 84.51 ^c 77.35 ^d	89.89	90.42 81.37 ^d	89.90
<i>A</i>				
3 or 6-OH-radical	80.28	86.76	86.32	86.36
<i>B</i>				
2-OH-radical	81.08	87.63	88.09	88.12
4-OH-radical	75.43	81.89	83.60	82.42
6-OH-radical	81.64	88.21	86.99	87.60
<i>C</i>				
2-OH-radical	74.95	80.08	82.79	81.70
3-OH-radical	73.87	81.16	81.56	80.56
<i>D</i>				
2-OH-radical	73.85	80.05	81.29	80.43
3-OH-radical	72.76	79.62	80.84	79.99
<i>E</i>				
3-OH-radical	82.54	89.21	86.71	88.10

^a BDEs computed with zero point vibrational energy (ZPVE).

^b BDEs computed without zero point vibrational energy (ZPVE).

^c [21].

^d [45].

The computed BDE values in the gas phase and solvents are reported in Table 1. The 4'-OH has the lowest BDE value in all environments studied for *trans*-resveratrol, so it represents the first site that can donate its H-atom, followed by the 3-OH. There are no controversial results regarding the first oxidation site, this is in full agreement with other studies [12,20].

For compound B, the phenanthrene analog of resveratrol, obtained by the rotation locking of the olefinic bridge, the BDE values in the gas phase of 2-OH, 4-OH and 6-OH sites (confronted with 5-OH, 3-OH and 4'-OH in RSV) are equal to 87.63, 81.89 and 88.21 kcal/mol respectively. On the other hand, a decrease in the BDE value of 4-OH by 7.71 kcal/mol is observed. Hence, the 4-OH site in compound B represents the first site that can donate its H-atom in all media studied. Hence, the introduction of the single bond between the two rings A and B in resveratrol, to obtain the phenanthrene form, creates a novel pharmacophore on the 4-OH (3-OH in RSV) site. In benzene and aqueous media, the most abstractable hydrogen atom of all phenanthrenes studied is 3-OH corresponding to 4'-OH site in RSV. On the basis of computed BDE values for the parent compounds studied, the most efficient radical scavengers are predicted to be those bearing a catechol moiety in all studied media.

However, low BDE values indicate that the activity of C is higher than that of B but lower than that of compound D (with two catechol moieties).

This finding is in agreement with theoretical [12,20] and experimental [19] results reported for resveratrol and some analogs (3,4,3',4'-tetrahydroxy stilbene, and 3,4-dihydroxy stilbene).

The presence of a methoxy group at C-2 in compound E increased the BDE value by 5 kcal/mol. Intra-molecular hydrogen bond formation between the hydroxyl and the O-methoxy compounds explains the higher BDE values in compound E.

BDE values for compounds studied in the gas phase follow the sequence:



Nevertheless, each of the compounds D and C can donate a second hydrogen atom to form a quinone (Fig 3), with BDE values of 165.03 kcal/mol for D and 150.35 kcal/mol for C. These values are lower than the sum of BDEs corresponding to a simultaneous 2-H and 3-H abstraction. The trend of the BDE value was in accord with that obtained by Ding et al. [29]. These results explain the significantly high k (second-order rate constants) and large n values (n is the stoichiometric factor, number of DPPH \cdot reduced by one molecule of antioxidant, calculated by the equation, $n = 1/(EC_{50} \times 2)$) of both compounds. In water and benzene media, the BDE values follow the sequence $D < C < B < RSV < A < E$, these results are in agreement with those of Ding et al. [29]. Moreover, the results indicate that the BDE values, for a given molecule are close to one another in all studied environments.

3.3. Spin density

The most important quantum property of radicals is the total spin density which characterizes the distribution of electron spin in free radicals and is responsible for their stability. It must be emphasized that the radical is more easily formed when its spin density is more delocalized [39]. As shown in Table 2, the spin densities on the O-atom in the 4'-OH, 3-OH and 5-OH positions

Table 2

Spin density on the oxygen atoms in phenoxy radicals of *trans*-resveratrol and its phenanthrene analogs.

Chemical compound	Spin density (vacuum)	Spin density (water)	Spin density (Benzene medium)
<i>T</i> -RSV			
4'-OH-radical	0.30	0.27	0.29
3-OH-radical	0.39	0.36	0.37
5-OH-radical	0.40	0.37	0.38
<i>A</i>			
3 or 6-OH-radical	0.35	0.31	0.33
<i>B</i>			
2-OH-radical	0.38	0.31	0.33
4-OH-radical	0.27	0.25	0.26
6-OH-radical	0.34	0.32	0.34
<i>C</i>			
2-OH-radical	0.34	0.32	0.33
3-OH-radical	0.32	0.30	0.31
<i>D</i>			
2-OH-radical	0.33	0.31	0.32
3-OH-radical	0.31	0.30	0.31
<i>E</i>			
3-OH-radical	0.34	0.31	0.33

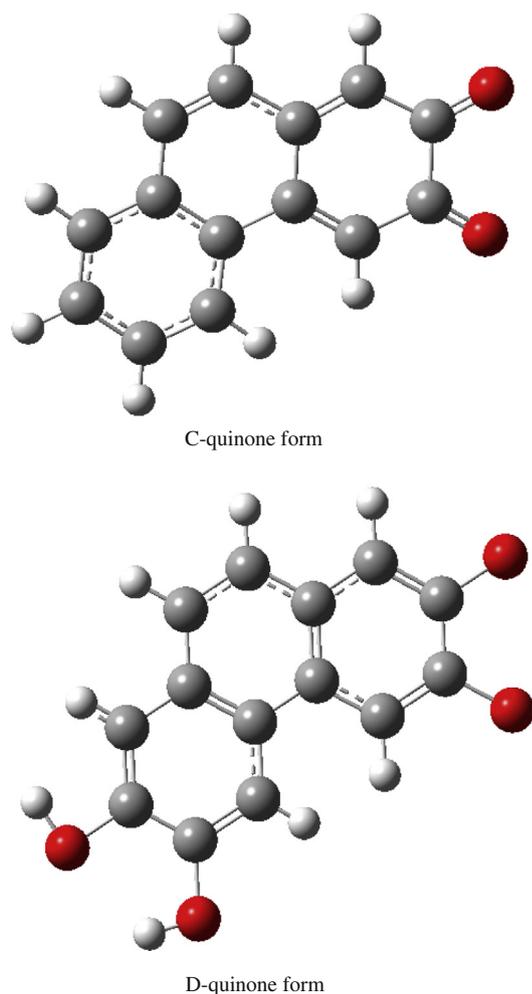


Fig. 3. Ortho quinone structures of compound C and D.

in resveratrol radicals are 0.30, 0.39 and 0.39 respectively in the gas phase, whereas spin densities of the same sites of compound B are 0.36, 0.27 and 0.35, respectively. The cyclization had a lowering effect on the spin density values especially on the 3-OH position. These values are in agreement with the BDE values in three studied media. On the other hand, we should note that in 4'-O-radical of resveratrol, the unpaired electron is disposed on the whole molecule. The 3-O-radical has the same resonance structure as the 4'-O radical, but the 3-O-radical unpaired electron is mainly distributed on A ring (Fig 4). Since for the 2-O, 4-O and 6-O-radicals of compound B, the unpaired electrons are disposed on the whole molecules due to the stabilization of the semi-quinone structures formed after H-abstraction, the antioxidant activity is therefore improved. This reaffirms the importance for construction of the phenanthrene ring. The spin density values, in the gas phase on the O-atom of the 3-OH in compounds A, C, D and E are 0.35, 0.32, 0.33 and 0.34 respectively, and of 2-OH of C and D are 0.34 and 0.33, respectively. It should be noted that the spin density values follow the same trend as BDE values in all environments studied.

3.4. SET-PT mechanism

3.4.1. Adiabatic ionization potentials (AIP)

AIP represents the reaction enthalpy of the first step in the SET-PT mechanism (Eq. (2.2)).

AIPs of the studied molecules reached higher values in gas-phase, in comparison to solution-phase values. Table 3 summarizes AIPs computed in benzene, water and gas-phase. It should be noted that AIPs of the studied molecules decreased with increasing solvent polarity (gas-phase > benzene > water) [32]. Solvents induce large changes in AIPs, because they include solvated charged species (radical and cations). Average difference between AIP values in the gas-phase and water reached 61.46 kcal/mol. In benzene and water the average difference of AIP values reached 38.87 kcal/mol. Higher AIP values in vacuum show that SET-PT is not favored in gas-phase. Unlike BDE values, those of AIP seem to be more influenced by the solvent polarity, since the latter may affect charge separation in a molecule [40].

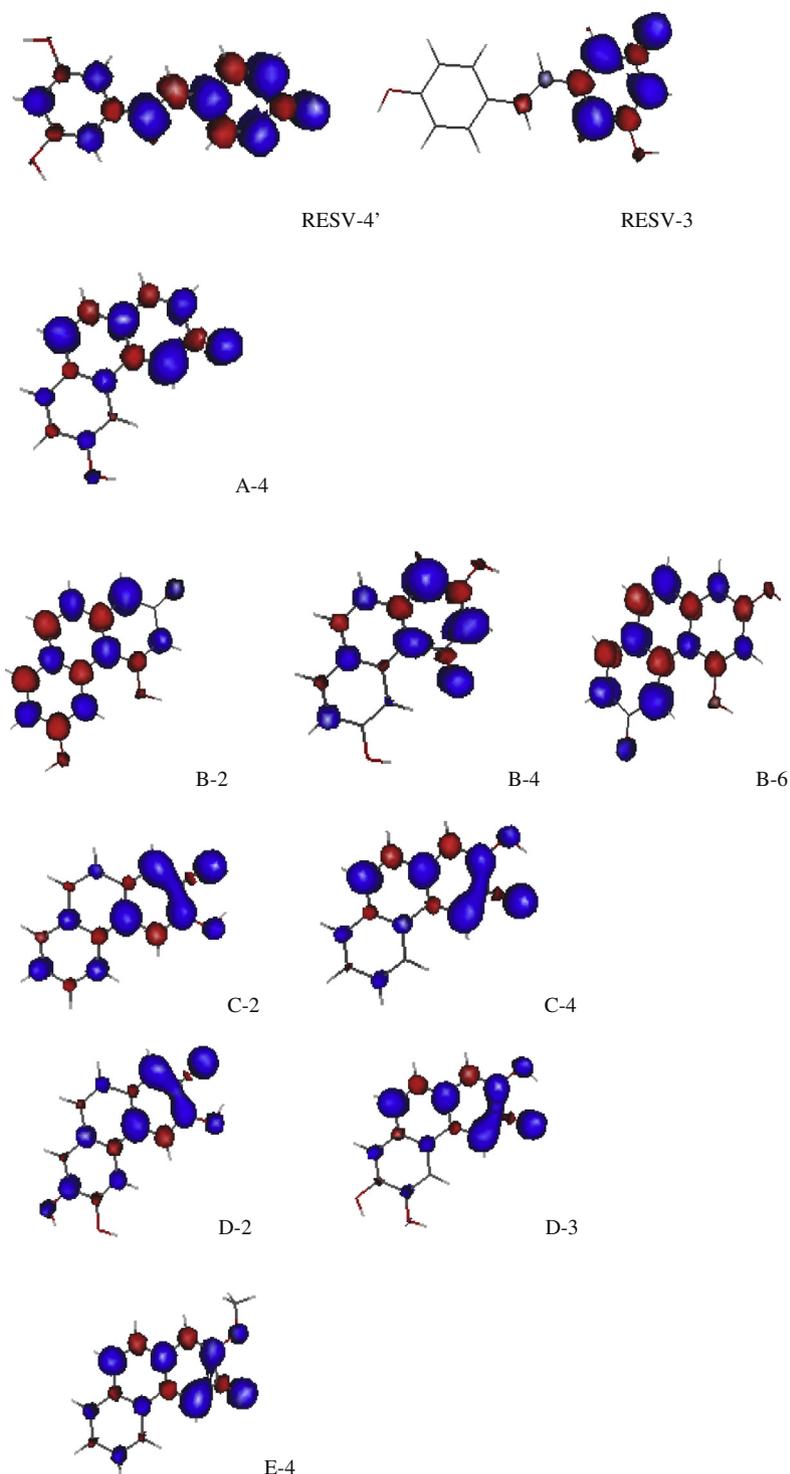


Fig. 4. Spin densities of phenanthrenes and resveratrol studied (3, 4 and 5 indicate the radical position after H-abstraction, ex: B-3 stands for B-3-O-radical).

3.4.2. Proton dissociation enthalpies (PDE)

Proton dissociation enthalpies related to the second step of SET–PT mechanism, Eq. (2.2), show thermodynamically preferred OH group for deprotonation of radical cation formed in the first step, Eq. (2.1).

As shown in Table 4, PDE values of phenol were 1.43 kcal/mol in water, and 206.02 kcal/mol in vacuum (6-311++G** basis set) [31]. PDE of indole-3-carbinols in water is lower by 209.84 kcal/mol than that in vacuum [41], while PDE of the basic structure of chroman in water is lower than that of the gas-phase value by

206.62 kcal/mol [42]. The results of this investigation are in agreement with those reported by Urbaniak et al. [43] with regard to large enthalpy of proton hydration in water, and significantly lower PDEs in water than in the gas-phase.

On the other hand, Lu et al. [44] found that *trans*-resveratrol PDE values in vacuum and water were 266.12 and 322.58 kcal/mol respectively. It should be noted that their calculations did not include the enthalpy of solvated proton. Hence, in this work, we recalculated these values including the proton solvation enthalpy. Mikulski et al. [45] used PDE denotation for the first step of

Table 3

The computed values of PDE and AIP (kcal/mol) obtained at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.

Chemical compound	PDE (vacuum)	PDE (water medium)	PDE (benzene medium)	AIP (vacuum)	AIP (water medium)	AIP (benzene medium)
<i>T-RSV</i>				157.68	98.58	135.82
4'-OH-radical	240.84	14.23	48.08			
3-OH-radical	245.20	19.77	52.91			
5-OH-radical	245.46	20.19	52.65			
<i>A</i>				162.09	99.67	142.83
3 or 6-OH-radical	234.91	15.00	42.11			
<i>B</i>				157.68	99.52	137.06
2-OH-radical	241.15	16.91	49.13			
4-OH-radical	235.41	12.43	44.51			
6-OH-radical	241.73	15.81	45.72			
<i>C</i>				166.62	104.26	143.03
2-OH-radical	227.78	6.88	37.25			
3-OH-radical	226.71	5.65	36.68			
<i>D</i>				160.11	99.85	137.52
2-OH-radical	236.10	9.79	41.49			
3-OH-radical	232.77	9.34	41.05			
<i>E</i>				161.75	102.21	139.59
3-OH-radical	240.73	12.84	47.09			

Table 4

DFT gas-phase and water PDE values of phenol for various basis sets in kcal/mol.

Basis set	PDE (gas-phase)	PDE (water)
6-311++G**	206.02	1.43
6-311++G(2d,2p)	207.21	2.39
6-311++G(2df,2pd)	207.45	2.86

SPLET and found that PDE values of *trans-resveratrol* in aqueous and gas phases were 281.161 and 233.58 kcal/mol, respectively. It should be stressed that PDE values in water were unexpectedly high for phenolic groups [31,42]. It must be emphasized that in the first work [44], the results revealed that PDE values in vacuum were lower than those obtained in water, while in the last one [45], PDE values were lower in water than those obtained in the gas-phase. These controversial results regarding PDE values were obtained despite the use of the same basis set 6-311G(d,p). On the other hand, the large enthalpy of proton hydration in water cannot appear in PDE results for both studies [45,46].

It is the reason for which we recalculated PDEs for stilbenes and phenantrenes analogs including the proton solvation enthalpy.

AIP are lower than PA in vacuum, so it can be assumed that the first step of SET-PT, which is the single electron transfer is possible in vacuum, this result is in agreement with that reported by Urbaniak et al. [43].

3.5. SPLET mechanism

3.5.1. Proton affinities

In Ding et al. [29] paper, the effect of adding acetic acid on DPPH· scavenging reaction of B in methanol was investigated. The rate constant ($1.74 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) decreased remarkably with increasing concentration of acetic acid to reach a limiting value of $1.46 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Authors suggested that the reaction occurs via a sequential proton loss electron transfer mechanism and the actual electron donor is the phenolate anion formed by deprotonation of compound B. Based on this analysis, we investigated the SPLET mechanism in which, PA of the phenoxide anion, ArO^- represents the reaction enthalpy of the first step (Eq. (3.1)). Several experimental studies have shown that phenoxide anions formed from flavonoids are better electron donors and radical scavengers than neutral molecules [46]. As shown in Table 5, water causes

Table 5

The computed values of PA and ETE (kcal/mol) obtained at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.

Chemical compound	PA (vacuum)	PA (water medium)	PA (benzene medium)	ETE (vacuum)	ETE (water medium)	ETE (benzene medium)
<i>T-RSV</i>						
4'-OH-radical	345.28	43.39	128.08	53.15	69.41	55.26
3-OH-radical	352.40	46.51	115.47	50.39	71.83	72.70
5-OH-radical	352.87	46.74	115.34	48.23	72.02	73.14
<i>A</i>						
3 or 6-OH-radical	348.69	45.15	112.30	49.28	72.59	72.64
<i>B</i>						
2-OH-radical	346.47	52.36	110.77	54.23	72.16	75.41
4-OH-radical	341.07	52.02	106.10	52.02	75.20	72.59
6-OH-radical	353.09	46.32	115.64	54.42	68.78	66.57
<i>C</i>						
2-OH-radical	337.72	37.42	102.65	53.65	72.59	76.41
3-OH-radical	337.64	37.32	102.74	54.64	73.72	77.63
<i>D</i>						
2-OH-radical	338.8695	38.48	103.37	52.99	71.16	75.20
3-OH-radical	338.8695	38.13	103.52	52.39	71.06	75.06
<i>E</i>						
3-OH-radical	353.2672	46.6752	116.03	47.15	68.38	70.65

considerable changes in the enthalpies of anions. Calculated PA for basic structure of *trans*-resveratrol in water, is lower than in gas-phase by 301.88 kcal/mol. The main reason is the large negative enthalpy of H⁺ hydration, PAs in water are significantly lower than in gas-phase. Again, electron donor groups slightly increase PAs, and this is in agreement with results reported for substituted phenols in water [31].

We should note that PDE values found in this study are lower than PA values; this could be due to the fact that the cations liberate easily protons than neutral systems. Moreover, for each conformer, values of PAs related to all phenolic protons in benzene and water are lower than those of BDEs and AIPs in corresponding environment.

As mentioned in the BDE section, the kinetics of the DPPH-scavenging process is partially governed by sequential proton loss electron transfer (SPLET), due to the contribution of phenolates to the DPPH[•] scavenging, besides hydrogen atom transfer (HAT). Addition of acetic acid reduces the rate by eliminating SPLET and leaving HAT, the rate will hence be reduced, while addition of water enhances phenol deprotonation and increases the rate.

Computed results also indicate that SPLET mechanism should be thermodynamically favored in water, because in this medium, PA values for studied molecules are lower than AIPs and BDEs.

3.5.2. Electron transfer enthalpies (ETE)

ETE represents the reaction enthalpy of the second step in SPLET mechanism (Eq. (3.2)). Calculated B3LYP/6-311G(d,p) ETEs are compiled in Table 5. The results revealed that the ETE values in solvents, are higher than those in vacuum. Note that the comparison between the SPLET and HAT revealed that the larger PA is confronted by the lower ETE, and vice versa. It must be stressed that a charged molecule is more sensitive to the effect of substituents than its radical counterpart. Electron withdrawing groups are favorable to stabilize ArO⁻, while electron donating groups have an opposite effect. Therefore, electron donating groups decrease ETE [47], which explains the lower ETE value for compound E.

4. Thermodynamically preferred mechanism

We can conclude that the studied environments reaction enthalpies follow the sequence:

Gas-phase: BDE < AIP < PA
Benzene: BDE < PA < AIP
Water: PA < BDE < AIP

It is clear that HAT mechanism is dominant in both vacuum and benzene, because BDE values of OH groups are significantly lower than corresponding AIP and PA values. On the other hand, in water, PAs of OH groups of studied compounds are significantly lower than corresponding BDE and AIP values. Hence, SPLET mechanism represents the most thermodynamically probable reaction pathway in polar solvents. In all media, SET-PT mechanism is not the most preferred one, because AIP values are always higher than BDEs and PAs. Due to large enthalpy of proton solvation in both studied solvents, PAs are significantly lower than gas-phase values. In benzene, calculated PAs are noticeably higher than in water.

On the other hand, there is no pronounced difference between BDE values in the studied environments.

5. Conclusion

In this work, the O–H bond dissociation enthalpies, ionization potentials, proton dissociation enthalpies, proton affinities and electron transfer enthalpies for *trans*-resveratrol and its

phenanthrene analogs, related to HAT, SET-PT and SPLET mechanisms of antioxidant action were calculated in vacuum, benzene and water. DFT/B3LYP method with 6-311G(d,p) basis set was used.

The 4'-OH group is the most favored site for homolytic and heterolytic O–H breaking in *trans*-resveratrol in all environments studied. On the other hand, the 3-OH site is the most preferred in all phenanthrenes studied with the exception of B molecule, the phenanthrene analog of RSV. The introduction of the single bond between the two rings A and B in resveratrol, creates a novel pharmacophore on the 4-OH (3-OH in RSV) site, suggesting the importance for construction of a phenanthrene ring.

In the gas-phase and benzene, BDE values are lower than those of PA and AIP, i.e. HAT represents the thermodynamically preferred mechanism [31,41,42]. On the other hand, SPLET represents the most thermodynamically favored mechanism in water, because PA values in water are lower than AIPs and BDEs of studied molecules [31,42]. In all environments studied, SET-PT is not the most preferred mechanism because AIPs of all molecules investigated are always higher than BDEs and PAs [31,41].

Finally, our investigation indicates that not only gas-phase calculations should be taken into consideration. We must keep in our minds that it is very important to perform calculations in polar and non-polar solvents to know the preferred mechanism of free radical scavenging action of both stilbenes and phenanthrenes.

References

- [1] J.M.C. Gutteridge, J. Mitchell, Redox imbalance in the critically ill, *Br. Med. Bull.* 55 (1999) 49–75.
- [2] W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47–95.
- [3] M.A. Kuhn, Oxygen free radicals and antioxidants, *Am. J. Nurs.* 103 (2003) 58–62.
- [4] J. Chen, J. He, L. Hamm, V. Vatuman, P.K. Whelton, Serum antioxidant vitamins and blood pressure in the United States population, *Hypertension* 40 (2002) 810–816.
- [5] M. Takashima, M. Horie, M. Shichiri, Y. Hagihara, Y. Yoshida, E. Niki, Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application, *Free Radical Biol. Med.* 52 (2012) 1242–1252.
- [6] G. Aldini, K.J. Yeu, E. Niki, R.M. Russell, Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications, 1st ed., John Wiley & Sons, Wiley-Blackwell, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA, 2010, pp. 10.
- [7] J.B. Harborne, *Plant Phenolics*, vol. 8, Springer Verlag, New York, 1980.
- [8] P.Mc. Langcake, W.V. Carthy, The relationship between resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*, *Vitis* 18 (1979) 244–253.
- [9] P. Langcake, Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene, *Physiol. Plant. Pathol.* 18 (1981) 213–226.
- [10] J. Burns, T. Yokota, H. Ashihar, M.E.J. Lean, A. Crozier, Plant foods and herbal sources of resveratrol, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3337–3340.
- [11] R. Amorati, M. Lucarini, V. Mugnaini, G.F. Pedulli, M. Roberti, D. Pizzirani, Antioxidant activity of hydroxystilbene derivatives in homogeneous solution, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 7101–7107.
- [12] H. Cao, X. Pan, C. Li, C. Zhou, F. Deng, T. Li, Density functional theory calculations for resveratrol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 1869–1871.
- [13] F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada, M. Rossi, Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7279–7285.
- [14] A.N. Queiroz, B.A.Q. Gomes, W.M. Moraes Jr., R.S.A. Borges, A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1644–1649.
- [15] S. Stojanović, O. Brede, Elementary reactions of the antioxidant action of trans-stilbene derivatives: resveratrol, pinosylvin and 4-hydroxystilbene, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002) 757–764.
- [16] S. Stojanović, H. Sprinz, O. Brede, Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation, *Arch. Biochem. Biophys.* 391 (2001) 79–89.
- [17] M. Wang, Y. Jin, C.T. Ho, Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3974–3977.
- [18] M. Leopoldini, S.G. Chiodo, N. Russo, M. Toscano, Detailed investigation of the OH radical quenching by natural antioxidant caffeic acid studied by quantum mechanical models, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 4218–4233.

- [19] Y.J. Cai, J.G. Fang, L.P. Ma, L. Yang, Z.L. Liu, Inhibition of free radical induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1637 (2003) 31–38.
- [20] A. Benayahoum, H. Amira-Guebailia, O. Houache, A DFT method for the study of the antioxidant action mechanism of resveratrol derivatives, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 2285–2298.
- [21] E. Nazarpour, M. Zahedi, E. Klein, Density functional theory (B3LYP) study of substituent effects on O–H bond dissociation enthalpies of trans-resveratrol derivatives and the role of intramolecular hydrogen bonds, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 10093–10104.
- [22] D. Mikulski, M. Molski, A quantum chemical study on the antioxidant activity of bioactive polyphenols from peanut (*Arachis hypogaea*) and the major metabolites of trans-resveratrol, *Comp. Theor. Chem.* 981 (2012) 38–46.
- [23] K. Fukuhara, I. Nakanishi, A. Matsuoka, T. Matsumura, S. Honda, M. Hayashi, T. Ozawa, N. Miyata, S. Saito, N. Ikota, H. Okuda, Effect of methyl substitution on the antioxidative property and genotoxicity of resveratrol, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 282–287.
- [24] M. Murias, W. Jäger, N. Handler, T. Erker, Z. Horvath, T. Szekeres, H. Nohl, L. Gille, Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 903–912.
- [25] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1173–1183.
- [26] A.P. Vafiadis, E.G. Bakalbassis, A DFT study on the deprotonation antioxidant mechanistic step of *ortho*-substituted phenolic cation radicals, *Chem. Phys.* 316 (2005) 195–204.
- [27] M.C. Foti, C. Daquino, C. Geraci, Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 2309–2314.
- [28] A. Staško, V. Brezová, S. Biskupič, V. Mišík, The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents, *Free Radic. Res.* 41 (2007). 379–379.
- [29] D.J. Ding, X.Y. Cao, F. Dai, X.Z. Li, G.Y. Liu, D. Lin, X. Fu, X.L. Jin, B. Zhou, Synthesis and antioxidant activity of hydroxylated phenanthrenes as cis-restricted resveratrol analogues, *Food Chem.* 135 (2012) 1011.
- [30] G. Mazzone, N. Malaj, N. Russo, M. Toscano, Density functional study of the antioxidant activity of some recently synthesized resveratrol analogues, *Food Chem.* 141 (2013) 2017–2024.
- [31] E. Klein, V. Lukeš, M. Ilčin, DFT/B3LYP study of tocopherols and chromans antioxidant action energetic, *Chem. Phys.* 336 (2007) 51–57.
- [32] J. Rimarčík, V. Lukeš, E. Klein, M. Ilčin, Study of the solvent effect on the enthalpies of homolytic and heterolytic N–H bond cleavage in *p*-phenylenediamine and tetracyano-*p*-phenylenediamine, *J. Mol. Struct.* 952 (2010) 25–30.
- [33] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian, Inc. Wallingford CT, 2009.
- [34] J.E. Bartmess, The thermodynamics of the electron and the proton, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 6420–6724.
- [35] S.I. Nagaoka, A. Kuranaka, H. Tsuboi, U. Nagashima, K. Mukai, Mechanism of antioxidant reaction of vitamin E: charge transfer and tunneling effect in proton-transfer reaction, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 2754–2761.
- [36] K. Fukui, Role of frontier orbitals in chemical reactions, *Science* 218 (1982) 747–754.
- [37] J. Berkowitz, G.B. Ellison, D. Gutman, Three methods to measure RH bond energies, *Phys. Chem.* 98 (1994) 2744–2765.
- [38] J. Lengyel, J. Rimarčík, A. Vagánek, E. Klein, On the radical scavenging activity of isoflavones: thermodynamics of O–H bond cleavage, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 10895–10903.
- [39] C.J. Parkinson, P.M. Mayer, L. Radom, An assessment of theoretical procedures for the calculation of reliable radical stabilization energies, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1999) 2305–2313.
- [40] M. Tsimidou, N. Nenadis, H.Y. Zhang, Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids and phenolic acids, in: D. Boskou, I. Gerothanassis, P. Kefalas (Eds.), *Natural antioxidant phenols. Sources, structure-activity relationship, current trends in analysis and characterization*, Research Signpost, Kerala, India, 2006, pp. 33–51 (Chapter 3).
- [41] M. Najafi, M. Najafi, H. Najafi, DFT/B3LYP study of the substituent effects on the reaction enthalpies of the antioxidant mechanisms of Indole-3-Carbinol derivatives in the gas-phase and water, *Comp. Theor. Chem.* 999 (2012) 34–42.
- [42] M. Najafi, K.H. Mood, M. Zahedi, E. Klein, DFT/B3LYP study of the substituent effect on the reaction enthalpies of the individual steps of single electron transfer-proton transfer and sequential proton loss electron transfer mechanisms of chroman derivatives antioxidant action, *Comp. Theor. Chem.* 969 (2011) 1–12.
- [43] A. Urbaniak, M. Szeląg, M. Molski, Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid, *Comp. Theor. Chem.* 1012 (2013) 33–40.
- [44] L. Lu, S. Zhu, H. Zhang, S. Zhang, Improvement of antioxidative activity of resveratrol by elongating conjugated chain: a DFT theoretical study, *Comp. Theor. Chem.* 1019 (2013) 39–47.
- [45] D. Mikulski, M. Szeląg, M. Molski, R. Gorniak, Quantum-chemical study on the antioxidation mechanisms of trans-resveratrol reactions with free radicals in the gas phase, water and ethanol environment, *J. Mol. Struct.* 951 (2010) 37–48.
- [46] M. Musialik, R. Kuzmicz, T.S. Pawlowski, G. Litwinienko, Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 2699–2709.
- [47] T. Brinck, M. Haeberline, M. Jonsson, A computational analysis of substituent effects on the O–H bond dissociation energy in phenols: polar versus radical effects, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 4239–4244.