

4.3 Étude biochimique II

Activités antioxydantes et antiradicalaires des feuilles de *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) et d'autres légumes verts testées sur lipoperoxydation et sur des monocytes HL-60 activés au PMA

Cette étude a fait l'objet d'une publication (*Nutrients* 2011, 3, 818-838 ; doi :10.3390/nu3090818) qui constitue le corps de l'étude biochimique II, et qui est insérée à la fin du résumé.

4.3.1 Résumé

Introduction

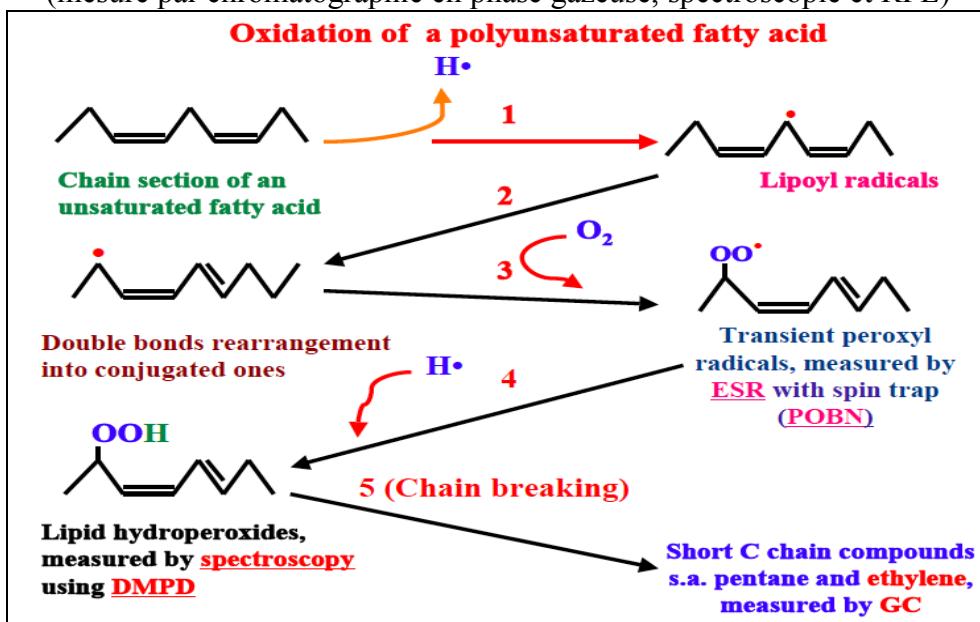
Les ROS produites après activation des monocytes et d'autres cellules phagocytaires attaquent les acides gras poly-insaturés, qui sont des composants majeurs de la membrane cellulaire. Une oxydation bien contrôlée des acides gras est un processus physiologique normal, courant et non cytotoxique, qui remplit des fonctions physiologiques intrinsèques comme la production d'énergie.

Par contre, une lipoperoxydation accrue et fréquente présente des risques pour les mitochondries et les cellules. Ses produits perturbent la structure de la bicoche membranaire par des associations Van Der Waals inadéquates, augmentent sa viscosité et sa fragilité osmotique. Les peroxydes attaquent également les protéines, altèrent leur structure par des scissions, des liaisons covalentes ou de type "cross links", abaissent leur mobilité de rotation et perturbent leurs fonctions (Bland 1978 [6]; Sevanian et Hochstein 1985 [5]; Richter 1987 [7]).

Objectifs et méthodes

Cette étude biochimique a été effectuée sur un modèle acellulaire et sur un modèle cellulaire. Dans son modèle acellulaire, l'étude explore la capacité des extraits aqueux d'*Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus acetosella*, *Manihot esculenta* et *Pteridium aquilinum* d'agir à différentes étapes de la peroxydation d'une émulsion d'acide linoléique (C18: 2 ω 6) (Fig. 1).

Fig. 1: Marqueurs de peroxydation lipidique
(mesure par chromatographie en phase gazeuse, spectroscopie et RPE)

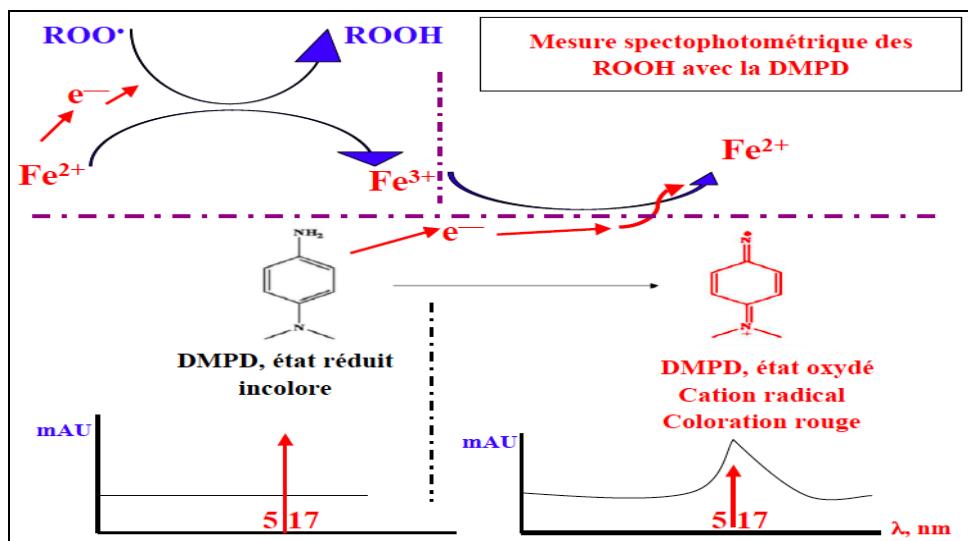


(Modifié selon Frankel 1991 [29])

Des produits volatils de courte chaîne carbonée comme l'éthylène et le pentane sont des marqueurs d'une lipoperoxydation avancée (Frankel 1991[29]) :

- La **production d'éthylène** a été mesurée par **chromatographie en phase gazeuse**.
- La production d'**hydroperoxydes** a été mesurée en **spectrophotométrie** (517 nm) en utilisant de la *N,N'*-diméthyl-*p*-phénylediamine (**DMPD**, Fig. 2).

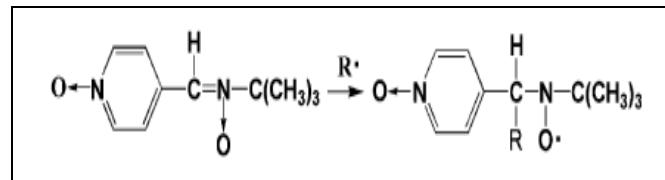
Fig. 2: Principe de la mesure des hydroperoxydes par oxydation de la DMPD



Modifié selon Lunvongsa S, Takayanagi T, Oshima M, Motomizu S (2006) Novel catalytic oxidative coupling reaction of *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine with 1,3-phenylenediamine and its application to the determination of copper and iron at trace levels by flow injection technique. *Analytica Chimica Acta* 576, 261-69.

- La formation d'**intermédiaires radicalaires peroxyles** et autres, qui caractérisent la phase initiale d'une oxydation lipidique, a été mesurée en **résonance paramagnétique électronique** (RPE) en utilisant l' α - (4-pyridyl-1-oxide) -*N*-*tert*-butylnitron (POBN) comme agent "spin trap" (Fig. 3).

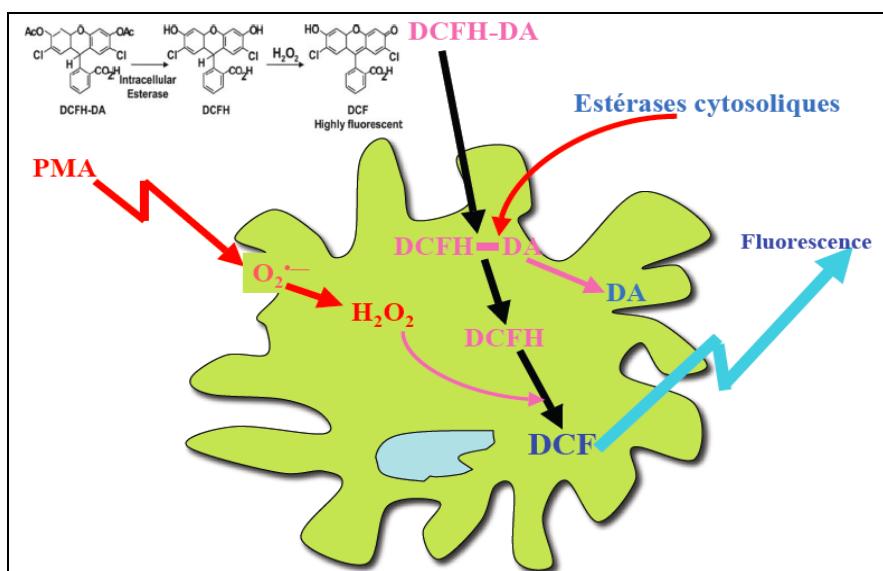
Fig. 3: Fonctionnement du "spin trap" POBN pour la mesure, par RPE, d'espèces radicalaires intermédiaires



Panchenko A, Dilger H, Kerres J, Hein M, Ullrich A, Kaz T, Roduner E (2004) *In-situ* spin trap electron paramagnetic resonance study of fuel cell processes. *Phys. Chem. Chem. Phys* 6, 2891-94

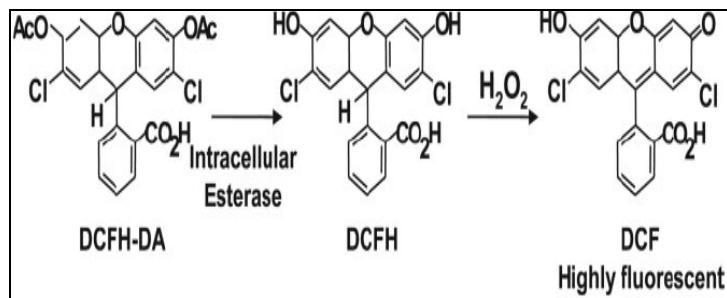
- Dans le modèle cellulaire, la capacité des extraits d'agir sur la production cellulaire de ROS dans des conditions "imitant" l'inflammation a été étudiée sur un modèle de monocytes humains HL-60 activés au PMA en présence de peroxydase de raifort (Fig. 4).
- Pour nous assurer que la baisse de production des ROS observée n'a pas été provoquée par une cytotoxicité due à nos extraits, nous avons effectué un test d'exclusion en utilisant du bleu de Trypan. Les extraits étaient à 100 μ g/ml, la concentration la plus élevée qui a été appliquée dans ce modèle cellulaire.

Fig. 4: Production des ROS par des monocytes activés au PMA, renforcée par HRP



La quantité de ROS produites a été mesurée par **technique de fluorescence** en utilisant la **2',7'- dichlorofluorescine-diacétate** (DCFH-DA), une sonde non fluorescente. Après sa désacétylation par les estérases intracellulaires, ce composé est oxydé par les ROS et devient la dichlorofluorescéine, caractérisée par sa fluorescente (Fig . 5).

Fig. 5: Mesure des ROS par fluorescence due à l'oxydation de la dichlorofluorescine (DCFH) en dichlorofluorescéine (DCF)



Dikalov S, Griendling K K, Harrison D G (2007) Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies
Hypertension 49, 717-27

Les extraits aqueux ont été dissous dans de l'eau ultrapure pour éliminer toute trace métallique.

Pour chaque extrait, deux échantillons ont été préparés, dont un a été chauffé dans de l'eau bouillante. À l'exception de la mesure de la cytotoxicité, dans chaque essai, toutes les concentrations ont été testées en triple. L'analyse statistique a été effectuée avec GraphPad InStat 3.05 sur $n = 9$ pour le test à la DMPD, et $n = 6$ pour les autres tests. Les IC_{50} ont été calculées avec GraphPad Prism 5.0. Les résultats sont présentés comme moyenne \pm déviation standard (SD).

Résultats

Les concentrations 10, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ ont significativement inhibé la production d'**éthylène** par rapport au contrôle (Étude II, Fig 1). Les inhibitions observées sont proportionnelles à la concentration de l'extrait. Pour la même plante à la même concentration, aucune différence significative n'a été constatée entre les échantillons chauffés et non chauffés.

Les résultats de la mesure des **hydroperoxydes** sont présentés à la Fig. 2 de l'étude. À la concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$, seuls l'échantillon non chauffé d'*Abelmoschus* (** ; $p < 0.01$) et l'échantillon chauffé d'*Hibiscus* (*) ; $p < 0.05$) ont atteint une inhibition significative par

rapport au contrôle; mais à partir de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tous les échantillons ont développé des inhibitions significatives *vs.* contrôle de manière dépendante de la concentration.

Toutefois, pour la même plante à la même concentration, les échantillons chauffés et non chauffés d'*Abelmoschus* (10 et 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), d'*Hibiscus* (25 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de *Pteridium* (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) présentent une différence significative l'un par rapport à l'autre ([#]; $p < 0.05$), ainsi que celui de *Pteridium* à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ([#][#]; $p < 0.01$). Les IC₅₀ des échantillons non chauffés sont légèrement supérieures à celles des échantillons chauffés (Tab. 1 de l'étude).

La concentration d'**intermédiaires radicalaires** produits à l'initiation de l'oxydation de l'émulsion d'acide linoléique, mesurée par RPE, est présentée à la Fig. 3 de l'étude. À 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, les échantillons d'*Abelmoschus* et d'*Hibiscus* ont plutôt activé la production de ROS, mais l'ont significativement inhibée à 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Par contre, les échantillons de *Manihot* et de *Pteridium* ont développé des effets inhibiteurs significatifs aux trois concentrations testées (10, 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). À la même concentration pour la même plante, aucune différence significative n'est observée entre échantillons chauffés et non chauffés.

Dans le modèle cellulaire, à la concentration la plus élevée d'extrait de plante que nous avons appliquée (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la **viabilité** des cellules pour tous les extraits n'a présenté aucune différence significative par rapport au contrôle après le test ; nous n'avons donc observé aucune **cytotoxicité** due aux extraits (Étude II, Fig. 4).

Le test de fluorescence sur les monocytes activés au PMA a montré des effets inhibiteurs des extraits sur la **production cellulaire des ROS**, de manière dépendante de la concentration (Étude II, Fig. 5). À toutes les concentrations, les inhibitions sont significatives par rapport au contrôle, mais pour la même plante à la même concentration, aucune différence significative n'a été observée entre échantillon non chauffé et échantillon chauffé.

4.3.2

Publication Étude biochimique II

pp 207 - 230

Nutrients 2011, 3, 818-838; doi:10.3390/nu3090818

OPEN ACCESS

nutrients

ISSN 2072-6643

www.mdpi.com/journal/nutrients

Article

Antioxidant and Antiradical Activities of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) Leaves and Other Selected Tropical Green Vegetables Investigated on Lipoperoxidation and Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) Activated Monocytes

Cesar N. Tsumbu ^{1,2}, Ginette Deby-Dupont ², Monique Tits ¹, Luc Angenot ¹, Thierry Franck ^{2,3}, Didier Serteyn ^{2,3} and Ange Mouithys-Mickalad ^{2,*}