

5. Discussion générale, conclusions et perspectives

Notre travail avait un **double but**. Le **premier** était d'examiner si les plantes du régime alimentaire des populations de la province du Bas-Congo développent des activités AOX *in vitro*. Le **deuxième** était de rechercher les polyphénols éventuellement présents dans ces plantes, qui pourraient expliquer les activités AOX éventuellement observées.

Pour connaître les plantes alimentaires les plus souvent consommées par les populations évoquées ci-dessus, nous nous sommes rendus à différents marchés dans différentes agglomérations du Bas - Congo, et avons interrogé les vendeuses de légumes sur leurs produits les plus souvent écoulés. Nous avons également interrogé des ménages et les grands internats des écoles secondaires sur leurs habitudes alimentaires et leurs préférences en termes de légumes verts.

Ainsi, nous avons sélectionné dix plantes dont les feuilles figurent parmi les légumes verts préférés par les consommateurs (*Abelmoschus esculentus*, *Amaranthus cruentus*, *Colocasia esculenta*, *Gnetum africanum*, *Hibiscus acetosella*, *Manihot esculenta*, *Pteridium aquilinum*, *Psophocarpus scandens*, *Solanum macrocarpon* et *Solanum nigrum*). Parmi elles, le manioc (*Manihot*) est le légume vert de base. Nous avons aussi sélectionné *Cymbopogon citratus*, consommé comme tisane.

Les échantillons de plantes sélectionnées ont été identifiés à l'Institut National d'Études et de Recherches Agronomiques (INERA) de l'Université de Kinshasa et expédiés au laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg.

Dans les méthodes traditionnelles de préparation culinaire, ces légumes sont cuits à l'eau avant d'être consommés. Pour effectuer nos tests dans des conditions proches de ces méthodes, nous avons préparé des extraits aqueux à partir de la poudre de ces plantes.

Deux études biochimiques ont été effectuées sur ces extraits, afin d'évaluer leur capacité AOX et anti-inflammatoire *in vitro*. En effet, les aliments constituent la voie d'apport régulier et courant d'AOX, dont on sait qu'ils peuvent servir d'appoint aux AOX endogènes pour moduler l'activité des enzymes oxydantes, prévenir une production excessive des ROS et, à long terme, les pathologies liées à l'inflammation.

En médecine traditionnelle, certaines de ces plantes sont également utilisées pour soulager différentes douleurs. Leurs usages médicinaux sont signalés dans la littérature.

Ainsi, elles pourraient servir de ressources pour l'obtention des remèdes d'origine naturelle qui seraient plus facilement à la portée des populations locales, au pouvoir d'achat souvent très limité.

Pour connaître les plantes les plus actives à utiliser dans les études biochimiques proprement dites, nous avons commencé par soumettre ces extraits à un **screening biochimique** effectué en trois tests sur des neutrophiles équinaux isolés *ex vivo* et sur la myéloperoxydase.

Dans l'ensemble, les extraits des onze plantes sélectionnées ont inhibé les diverses activités oxydantes étudiées à ce screening, mais à des taux différents, selon le test utilisé et la plante. Quatre plantes dont les effets inhibiteurs étaient les plus élevés (*Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus acetosella*, *Manihot esculenta* et *Pteridium aquilinum*) ont été retenues et soumises à deux études biochimiques plus poussées (**Étude biochimique I et II**).

L'**étude biochimique I** a analysé l'activité AOX et anti-inflammatoire sur les neutrophiles équinaux isolés *ex vivo* et la MPO, qui jouent un rôle clé dans la défense innée de l'organisme et la réponse inflammatoire. Nous avons ainsi ciblé :

- l'effet des extraits sur la production de ROS, mesuré par chimioluminescence (effet stoechiométrique),
- l'effet sur l'activité de la MPO (effet anticatalytique sur enzyme)
- l'effet sur la libération de la MPO (effet "métabolique like" sur la dégranulation)

Le test de **chimioluminescence** avait pour but d'analyser la capacité de nos extraits d'agir sur **l'activité oxydante globale des neutrophiles activés au PMA**.

Les neutrophiles font partie des cellules responsables de la réaction inflammatoire et de grandes productrices des ROS. Le PMA est un puissant activateur qui contourne des étapes de la transduction du signal cellulaire et active directement la PK C. À son tour, celle-ci active la Nox, qui déclenche la production des ROS en catalysant la formation de l'anion superoxyde.

La baisse de la production de ROS a été reflétée par une baisse de la luminescence observée lors du screening et reproduite lors de l'étude biochimique. Elle est le résultat d'une interaction de type **stœchiométrique** entre les AOX contenus dans les extraits et les ROS produites par les neutrophiles activés. Cependant, ces AOX pourraient également avoir exercé un effet anticatalytique et/ ou modulateur sur les enzymes productrices des ROS.

Nous avons alors testé les effets des extraits sur deux activités oxydantes de la **myéloperoxydase**: l'activité de **nitration** et l'activité de **peroxydase**. La première activité a été étudiée par un test de **nitration**, et la deuxième par la technique **SIEFED** développée par Franck et al. (2006).

L'inhibition de l'activité d'une enzyme peut avoir diverses causes. Pour le cas des deux activités de la MPO citées ci-dessus, les composés AOX contenus dans les extraits avaient les possibilités suivantes:

- en tant que réducteurs, neutraliser de manière stœchiométrique les ROS produites par l'enzyme,
- se substituer aux substrats de l'enzyme et donner des électrons à l'enzyme dans son état de Cd I et de Cd II, sans toutefois former des produits réactifs,
- établir une liaison avec l'enzyme de manière à modifier sa conformation et son activité, ou même occuper son site actif et l'empêcher d'interagir avec le substrat.

Les résultats du test de **nitration** suggèrent que nos échantillons pourraient avoir exercé sur l'enzyme une activité tant **stœchiométrique** (capture du dioxyde d'azote) qu'**anticatalytique** (au niveau de l'enzyme).

Par contre, les résultats du test **SIEFED** au cours duquel le milieu réactionnel est éliminé avant la révélation de l'activité enzymatique permet d'affirmer que les extraits ont agi sur **l'activité catalytique** de l'enzyme.

Nous nous sommes également intéressés à l'action potentielle des extraits sur la dégranulation des neutrophiles. En effet, lors d'une activation forte et incontrôlée, les neutrophiles libèrent dans le milieu extracellulaire le contenu de leurs granules (**dégranulation**), notamment la myéloperoxydase. Des taux extracellulaires élevés de MPO sont marqueurs d'une telle activation, et peuvent constituer une source "extracellulaire" de production de ROS. C'est pourquoi nous avons analysé l'effet de nos extraits sur la quantité de MPO que des neutrophiles activés au PMA libèrent en milieu extracellulaire, en utilisant la technique **MPO-ELISA** développée par Franck et al. (2005).

Les résultats indiquent que nos extraits ont abaissé la quantité de MPO libérée, mais à des taux modérés et inférieurs à ceux observés dans le test de chimioluminescence.

Dans leur étude sur les capacités AOX de divers extraits d'*Agelanthus dodoneifolius* (Loranthaceae) dont un extrait aqueux, Boly et al. (2011) rapportent également que le taux d'inhibition de la dégranulation des neutrophiles a été plus bas que celui de l'inhibition de la chimioluminesce. La dégranulation est un phénomène métabolique complexe, contrôlé par des mécanismes autres que ceux qui régulent la production de ROS (Faurschou et Borregaard 2003). Cette différence pourrait expliquer, du moins partiellement, la faible capacité de nos extraits à inhiber la dégranulation, et donc la libération de la MPO par les neutrophiles activés.

Pour être certains que l'effet des extraits n'est pas lié à leur éventuelle cytotoxicité, nous avons étudié la **viabilité des neutrophiles** isolés *ex vivo* en présence et en l'absence des solutions de nos extraits à la concentration de 0.1 à 10 µg/ml, à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de Trypan, et n'avons observé aucune différence significative.

L'**étude biochimique II** avait pour but d'analyser les effets de nos extraits sur la **peroxydation lipidique** à l'exemple de l'oxydation d'une émulsion d'acide linoléique. En effet, les biomembranes sont constituées notamment de lipides, notamment sous forme de phospholipides, qui pourraient être facilement vulnérables lors des attaques oxydantes.

Nous avons ciblé les effets des extraits de plante sur les trois étapes suivantes de la peroxydation de l'émulsion de l'acide linoléique:

- la **production d'éthylène** comme marqueur d'une peroxydation lipidique avancée, a été mesurée par **chromatographie en phase gazeuse**;
- la **production d'hydroperoxydes** a été étudiée par spectrophotométrie en utilisant la **DMPD**;
- la **formation d'espèces radicalaires intermédiaires** a été étudiée par **RPE** en utilisant du **POBN** comme agent "spin trap".

Les résultats montrent une baisse du taux de peroxydation de l'émulsion d'acide linoléique aux trois étapes étudiées. L'inhibition de la formation d'espèces radicalaires intermédiaires, mesurée par la technique RPE, met en évidence que nos échantillons interviennent efficacement dès l'étape précoce de l'initiation et pourraient protéger des structures lipidiques contre la peroxydation.

Dans cette deuxième étude, nous avons également réalisé un deuxième modèle cellulaire avec des **monocytes humains de lignée continue HL-60** et étudié l'effet des extraits sur la **capacité oxydante** (production des ROS) de ces monocytes après les avoir activés au PMA. Pour y arriver, nous avons effectué un test de **fluorescence** en utilisant comme sonde la dichlorofluoresceine diacétate et en associant de la **peroxydase de raifort** pour renforcer la production des ROS.

Les résultats montrent que nos échantillons inhibent cette production d'une manière dépendante de la concentration. La baisse de fluorescence observée à l'ajout des extraits à des concentrations de plus en plus élevées dans le système est une mesure de type stœchiométrique; elle exprime une neutralisation précoce des ROS produites avant qu'elles n'aient pu oxyder la dichlorofluoresceine (DCFH, non fluorescente) en dichlorofluorescéine (DCF, fluorescente). Cependant, cette baisse de fluorescence pourrait aussi être due à une baisse de l'activité même de production des ROS par les monocytes et la peroxydase de raifort que nous avons utilisée pour renforcer cette production. Ainsi, les extraits pourraient avoir également développé une activité AOX de type anti-catalytique.

Pour écarter tout doute si la baisse de la fluorescence observée n'était pas due à une cytotoxicité de nos extraits, nous avons effectué un test de **viabilité des monocytes** en présence et en l'absence des solutions de nos extraits à la concentration de 100 µg/ml, à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de Trypan, et n'avons observé aucune différence significative.

Le **second but** de notre travail était d'étudier **les polyphénols dérivés des acides phénols et les flavonoïdes** contenus dans nos extraits de plante, lesquels justifieraient au moins partiellement les inhibitions observées.

Nous avons poursuivi cet objectif en commençant par la technique de **chromatographie sur couche mince** (CCM) effectuée avec des extraits méthanoliques. Cette technique de séparation et la révélation avec la solution DPBAE avant de visualiser les plaques sous lumière UV à 365 nm mettent à profit les propriétés de ces composés de produire à cette longueur d'onde une fluorescence de couleur typique : bleue pour les dérivés des acides phénols, orangée pour les flavonoïdes dont le noyau B est de type quercétine (c'est-à-dire porte 2 groupes –OH), et verte pour ceux dont ce noyau est de type kaempférol (un groupe –OH).

Toutes les plantes ont présenté des bandes de fluorescence de ces couleurs; le facteur de rétention de certaines de ces bandes correspondait à celui des témoins que nous avons utilisés. Ces résultats suggèrent la présence des dérivés d'acides phénols et des flavonoïdes dans nos extraits.

Nous avons élargi l'étude des polyphénols et déterminé la **teneur en polyphénols totaux et en tanins** en utilisant la **technique au réactif phospho-molybdo-tungstique** décrite dans la Pharmacopée Européenne (rubrique 2.8.14 "détermination des tanins dans les drogues végétales").

Les résultats indiquent des teneurs variant d'une plante à l'autre. Il faut cependant souligner que la fougère-aigle (*Pteridium aquilinum*) est particulièrement riche en tanins.

Partant de la teneur de chaque plante en polyphénols non-tanins, nous avons effectué un **dosage des flavonoïdes** pour les plantes dont cette teneur était supérieure à 1 % (*Hibiscus acetosella*, *Pteridium aquilinum*, *Solanum nigrum*), et y avons associé le manioc pour son caractère de légume de base. Ce dosage a été effectué moyennant la technique décrite dans la Pharmacopée Européenne (Monographie de la feuille de bouleau).

Suivant cette technique, les plantes les plus riches en flavonoïdes (% exprimés en hypéroside) sont : *Hibiscus acetosella* > *Pteridium aquilinum* > *Solanum nigrum* et *Manihot esculenta*.

Nous avons ensuite effectué des analyses CLHP sur les plantes sélectionnées, et de manière plus poussée, sur le manioc et l'hibiscus.

Un des dérivés d'acide phénol, majoritaire dans l'hibiscus a été isolé par CLHP préparative et sa structure a été établie grâce aux techniques de spectrométrie de masse et à la RMN.

La littérature est peu abondante sur les polyphénols de *Pteridium aquilinum*. Imperato (1995 - 1998) rapporte la présence des dérivés du kaempférol, ce que nous pouvons confirmer par la CCM (présence de bandes vertes révélées par le DBAE). Mendez (2005) signale la présence des dérivés de l'acide cinnamique.

La détermination des tanins révèle que l'échantillon de *Pteridium aquilinum* que nous avons analysé contient majoritairement une quantité particulièrement élevée de tanins. Ces composés sont fréquents dans beaucoup d'aliments végétaux, comme les noix, la grenade, etc (Sharma et al. 2010). À faible concentration, ils ne sont pas toxiques et développent une activité AOX efficace. Ceci justifie en partie les inhibitions que nous avons observées pour l'extrait de cette plante dans nos études biochimiques.

En plus, les métabolites des tanins développent également une activité AOX. L'acide ellagique libéré dans l'intestin grêle par les tanins hydrolysables est un AOX bien connu; la flore intestinale métabolise aussi les tanins en d'autres dérivés dont les effets sont également favorables à la santé (Santos-Buelga et Scalbert 2000; Sharma et al. 2010).

Cependant, une teneur importante en tanins est un facteur de restriction pour la consommation de la fougère-aigle, car ces composés sont parfois définis comme ayant un caractère anti-nutritionnel qui précipite d'autres nutriments comme les protéines, inhibe leur absorption intestinale et abaisse leur biodisponibilité. En quantité élevée, ils peuvent irriter les muqueuses des voies digestives.

Enfin, concernant l'usage alimentaire de la fougère - aigle, le **facteur limitant** demeure la présence des **ptaquilosides**. Ces composés constituent un grand risque pour la santé du consommateur, car ils sont toxiques, carcinogènes et très difficilement biodégradables (Santos et al. 2010). **Notre objectif est donc de mettre en garde les populations qui la consomment, pour les en dissuader et prévenir un problème de santé publique.**

Les résultats obtenus pour *Abelmoschus esculentus* révèlent que cette plante renferme majoritairement de l'hypéroside et de la rutine (CCM et CLHP). Ces deux hétérosides de la quercétine remplissent les critères structurels nécessaires à une activité AOX suffisante, et peuvent expliquer les inhibitions que nous avons observées avec cette plante lors de notre screening et de nos deux études biochimiques.

Gacche et al. (2010) rapportent que l'extrait hydro-éthanolique d'*Abelmoschus esculentus* L. chélate le fer II. Murakami et al. (1995) ont observé une forte activité anti-tumorale de l'extrait méthanolique d'*Abelmoschus esculentus*, lequel inhibe l'activité du virus d'Epstein-Bar dans des cellules de culture stimulées avec du *O*- hexadécanylphorbol-13-acétate.

Ali et al. (2011) signalent dans leur étude que la teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux d'*Abelmoschus* sp. a été de 31.00 ± 15.4 mg d'équivalent acide gallique par 100 g de portion comestible, contre 25.59 ± 1.69 mg pour l'extrait méthanolique. Cet extrait a été légèrement plus actif que l'extrait méthanolique dans le test FRAP (51.19 ± 9.7 mg équivalent Trolox par 100 g de portion comestible contre $45,01 \pm 0,54$ mg pour l'extrait méthanolique), mais nettement moins actif que l'extrait méthanolique dans le test DPPH ($16,62 \pm 2.47$ mg équivalent Trolox contre $25,85 \pm 0.34$ pour l'extrait méthanolique).

Wu et al. (2007) rapportent que l'hypéroside extrait de l'espèce *Abelmoschus manihot* (L). Medik inhibe de manière significative l'activité du virus de l'hépatite sur culture cellulaire

(IC₅₀ de 9 à 12 µg/ml). Ansari et al. (2005) ont observé une forte capacité de l'extrait aqueux d'*Abelmoschus* sp. à piéger les radicaux libres (test DPPH) et à inhiber *in vitro* la peroxydation non enzymatique des lipides du cerveau bovin.

Nos résultats sur l'extrait d'*Abelmoschus esculentus* ne sont pas en contradiction avec les données de la littérature évoquées ci-dessus.

Cependant, après des tests au réactif phospho-molybdo-tungstique, au DPPH et d'oxydation non enzymatique des LDL isolées du plasma frais des sujets humains à jeun et en bonne santé, Katsube et al. (2004) concluent une très faible capacité AOX de l'extrait d'*Abelmoschus* sp.

Notre étude sur *Hibiscus acetosella* a montré la présence de l'**acide caféylhydroxycitrique**. La littérature nous renseigne que plusieurs dérivés d'acides phénols ont été isolés du genre *Hibiscus*. Elle nous apprend aussi que l'acide hydroxycitrique se transforme facilement en sa lactone, l'acide de l'hibiscus.

D'une part, cette transformation ne devrait pas altérer la capacité AOX de cet aliment, qui réside plutôt dans la structure de la partie « acide caféique » de ce composé. D'autre part, cette même transformation expliquerait que lors de l'extraction aqueuse à 100 °C, le pic du composé qui a été élué immédiatement avant l'acide caféylhydroxycitrique augmente de manière très significative, ce qui n'a pas été le cas lors de l'extraction à 60 °C.

L'acide caféique est un polyphénol à part entière, dont l'activité AOX peut expliquer partiellement les inhibitions développées par l'extrait d'*Hibiscus acetosella* dans nos études biochimiques.

La littérature est peu abondante sur l'espèce *Hibiscus acetosella*. Mandelli (2010) signale que l'extrait 70% hydroalcoolique de cette plante d'origine africaine développe des activités antimicrobiennes contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Dans le genre *Hibiscus*, l'espèce *Hibiscus sabdariffa* semble être la plus étudiée (Puckhaber et al. 2002). L'extrait de ses feuilles piège efficacement les radicaux libres dans un modèle DPPH, inhibe la xanthine oxydase et la peroxydation lipidique (Tseng et al. 1997), tout comme la cyclo-oxygénase et la formation des radicaux libres par des liposomes (Christian et al. 2006). L'extrait aqueux étudié par Wong et al. (2006) a développé une activité AOX significative dans des tests DPPH et FRAP. Olelaye et Rocha (2007) rapportent que les polyphénols d'*Hibiscus* sp. protègent de manière significative contre une agression oxydante et améliorent l'activité de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase après

administration d'acétaminophène à des souris saines. Hirunpanich et al. (2005) ont observé que l'extrait des calices séchés de la plante inhibe l'oxydation des LDL *in vitro*; Lin et al. (2007) signalent que l'extrait de la plante baisse le taux de cholestérol sanguin par effet dose-dépendant. En plus, Chang et al. (2006) rapportent que l'extrait d'*Hibiscus* sp baisse le taux de formation des diènes conjugués lors d'une peroxydation lipidique et retarde l'apoptose des macrophages induite par l'oxydation des LDL. Rosa et al. 2007 indiquent que l'extrait méthanolique de l'espèce *Hibiscus tiliaceus* L. protège efficacement des cellules de culture et leur ADN contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène et le *tert*-butylhydroperoxyde. L'extrait de l'espèce *Hibiscus rosasinensis* améliore la sensibilité à l'insuline (Venkatesh et al. 2008).

Au Bas-Congo, le **manioc** est le légume vert de base. Nos recherches ont révélé que sa feuille contient majoritairement de la rutine et du kaempférol-3-*O*-rutinose. Il y a également de l'amentoflavone en faible quantité. Salawu et al. (2009 et 2011) ont également identifié ces composés dans l'espèce *Manihot utilissima*.

La présence de ces polyphénols explique à suffisance les inhibitions que nous avons observées avec l'extrait de cet échantillon.

Salawu (2006) rapporte que l'extrait méthanolique des feuilles de manioc piège l'anion superoxyde, inhibe de manière significative la peroxydation lipidique et la formation des diènes conjugués.

Kubo et al. (2006) ont observé que la rutine et la quercétine développent des activités différentes: la rutine piège l'anion superoxyde généré par la xanthine oxydase sans inhiber l'enzyme elle-même, tandis que la quercétine inhibe l'enzyme et baisse le taux de peroxydation de l'acide linoléique catalysée par la lipoxygénase du soja.

Salawu et al. (2011) signalent que l'extrait éthanolique des feuilles de manioc inhibe de manière significative l'oxydation induite par le radical peroxyde dans des cellules cancéreuses de lignée continue (HepG 2). Sur d'autres souches de cellules cancéreuses de lignée continue, notamment Lovo et Lovo/Adr, cet extrait développe des effets cytotoxiques contre des cellules cancéreuses multi-résistantes (EC₅₀ de 1.0 à 2.6 µg/mL).

Rahmat et al. (2003) ont étudié la capacité des extraits éthanoliques des feuilles de manioc d'inhiber la croissance des diverses cellules cancéreuses (cancer du sein, cancer du colon, cancer du foie, etc). Ils rapportent que ces extraits développent des effets cytotoxiques sur certaines souches de cellules cancéreuses, et que les valeurs IC₅₀ sont voisines de 50.00 µg/mL mais varient d'une souche de cellule à une autre.

Wong et al. 2006 ont étudié l'activité AOX des extraits aqueux d'une vingtaine de plantes alimentaires tropicales sur des modèles DPPH et FRAP, et leur capacité de chélater le cation cuprique. Ils rapportent que l'extrait des feuilles de manioc a une teneur élevée en polyphénols totaux (> 20 mg équivalent acide gallique/ g de poids sec) et développe une activité supérieure à la moyenne de beaucoup d'autres extraits analysés dans la même étude.

L'amentoflavone abaisse l'expression de la COX-2 induite par TNF- α dans des cellules de culture de lignée A549, inhibe l'activation de NF- κ B dans les macrophages et par là, l'induction de la NOSynthase. Ainsi, l'amentoflavone développe d'importantes activités modulatrices, antioxydantes et anti-inflammatoires.

Le kaempférol et la rutine abaissent l'expression des NOSynthases inductibles et de la COX-2 (Kim et al. 2004; Woo et al. 2005).

Cependant, nous devons rappeler que le manioc contient des substances cyanogènes qui pourraient dissuader d'en consommer. Mais le respect des méthodes de préparation culinaire traditionnelles assure une détoxification suffisante des produits de manioc en abaissant leur teneur en HCN jusqu'en dessous de la norme fixée par l'OMS (10 mg d'équivalent HCN/ kg de poids sec de l'aliment).

Le **traitement thermique** peut augmenter l'activité AOX d'un extrait, mais aussi la diminuer (Tomaino et al. 2004; Temitope et al. 2010 ; Ioannou et al. 2012). Dans nos études, nous n'avons pas observé de différence significative entre l'activité AOX des échantillons que nous avons chauffés à 100 °C et celle des échantillons que nous n'avons pas chauffés.

Dans l'ensemble, nos résultats mettent en évidence la capacité des extraits de nos plantes :

- d'abaisser la production des ROS par des cellules responsables de cette production (neutrophiles et monocytes activés au MPA) dans une activité AOX de type stœchiométrique, sans exclure la possibilité d'une activité de type anticatalytique,
- d'abaisser les activités oxydantes (activité de nitration et activité peroxydasique) de la MPO, une enzyme oxydante qui joue un rôle majeur dans la production des ROS.

Ces effets inhibiteurs observés sur l'enzyme sont respectivement de type stœchiométrique avec possibilité d'effet anticatalytique pour l'activité de nitration, et de type carrément anticatalytique pour l'activité de peroxydase dans la technique SIEFED.

- Les résultats prouvent également que nos extraits sont capables d'abaisser le taux de peroxydation d'une émulsion d'acide linoléique dès son initiation.

Les deux tests d'exclusion au bleu de Trypan ont mis en évidence que la présence des extraits n'a pas affecté la viabilité des cellules de manière significative.

L'étude des polyphénols a ciblé les flavonoïdes et les dérivés d'acides phénols et mis en évidence certains composés de ces deux sous-familles de polyphénols, dont la présence et la synergie expliquent au moins partiellement les activités AOX que nous avons observées.

Des analyses CLHP plus poussées effectuées pour le manioc et l'hibiscus ont mis en évidence la présence d'une quantité appréciable d'acide caféylhydroxycitrique dans l'hibiscus, de rutine et de kaempférol -3-O- rutinose dans la feuille de manioc.

Ces résultats nous permettent de conclure que les feuilles d'hibiscus et de manioc peuvent constituer pour leurs consommateurs une bonne source d'apport alimentaire en AOX : l'hibiscus principalement pour les dérivés d'acide caféique, le manioc pour la rutine et le kaempférol-3-O-rutinose. Cependant, pour le manioc, la préparation culinaire doit atteindre au préalable une détoxification suffisante.

À la fin de ce travail, nous devons rappeler que nos études biochimiques ont été effectuées *in vitro*. Elles sont donc assez éloignées et peu représentatives des conditions réelles *in vivo*. Néanmoins, elles ont l'intérêt de mettre en évidence les potentialités antioxydantes et anti-inflammatoires des plantes alimentaires que nous avons analysées, potentialités qui se basent notamment sur les polyphénols que contiennent ces plantes. Les effets de ces composés pourraient en partie être à la base de l'usage que l'on fait de certaines de ces plantes dans la médecine traditionnelle, notamment pour soulager des douleurs.

Sous réserve de l'influence des conditions physiologiques réelles, l'idéal serait que des petites quantités de ces polyphénols puissent être absorbées, atteindre la circulation systémique et le

milieu cellulaire à très faible concentration pour pouvoir moduler les activités des enzymes oxydantes.

Par ailleurs, notre étude plus poussée des polyphénols s'est étendue sur les feuilles de manioc et d'hibiscus, et principalement sur leurs composés majoritaires. Les autres composés présents en moindre quantité, qui participent également aux activités AOX et anti-inflammatoires de ces échantillons, ainsi que les polyphénols d'autres plantes sélectionnées au départ n'ont pas pu être étudiés de manière plus poussée. Ils constituent un domaine à explorer davantage. C'est notamment le cas de *Solanum nigrum*.

Dans la perspective d'en connaître plus, d'autres recherches seraient souhaitables pour explorer davantage tous ces polyphénols et analyser leurs activités AOX et anti-inflammatoires dans des conditions plus proches et plus représentatives de la situation *in vivo*.

5.1 Références bibliographiques

- Ali M A, Chanu Kh V, Devi L I (2011) Antioxidant capacities of vegetables consumed in north east India assessed by three different *in vitro* assays. *Int. J. Res. Pharma. Sci.* 2(2), 118-23
- Ansari N M, Houlihan L, Hussain L, Pieroni A (2005) Antioxidant activity of five vegetables traditionally consumed by South-Asian migrants in Bradford, Yorkshire, UK. *Phytother. Res.* 19 (10), 907-11
- Boly R, Dessy S, Kohnen S, Kini F, Lompo M, Mouithys-Mickalad A, Guissou I P, Dubois J, Deby-Dupont G, Serteyn D, Frank T (2011) Modulatory activities of *Agelanthus dodoneifolius* (Loranthaceae) extracts on stimulated equine neutrophils and myeloperoxidase activity. *Int. J. Mol. Med.* 28(2), 261-70. Doi : 10.3892/ijmm.2011.695
- Chang Y-C, Huang K-X, Huang A-C (2006) *Hibiscus* anthocyanin-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL- mediated macrophages apoptosis. *Food and Chem. Toxicol.* 44, 1015-23
- Christian K R, Nair M G, Jackson J C (2006) Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *J. of Food Composition and Analysis* 19, 778-83
- Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5, 1317-27.
- Franck T, Grulke S, Deby-Dupont G, Deby C, Duvivier H, Peters F, Serteyn D (2005) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific neutrophil myeloperoxidase measurement in blood. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 412-19.
- Franck T, Kohnen S, Deby-Dupont G, Grulke S, Deby C, Serteyn D (2006) A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in *in vitro* tests. *J Vet Diagn Invest* 18, 326-44
- Gacche R N, Kabaliye V N, Dhole N A, Jadhav A D (2010) Antioxidant potential of selected vegetables commonly used in diet in Asian subcontinent. *Ind. J. Natur. Products and Resources* 1(3), 306-13.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Morales N P, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsalee A, Suthisisang A (2005). Antioxydant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* LINN (Roselle) *in vitro* using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol. Pharm. Bull.* 28 (3), 481-84
- Imperato F (1995) Flavonol glycosides from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 40(6), 1801-02
- Imperato F (1996) Kaempferol 3-O- (5'- feruloyl)apioside) from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 43(6), 1421-23
- Imperato F (1997_a) Kaempferol 3-O-(6''- caffeoyl)glucoside) from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 45(1) 199-200

- Imperato F (1997_b) Rhamnetin 3-*O*-laminaribioside from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 45(8), 1729-30
- Imperato F (1998) Kaempferol 7-*O*-Rhamnoside -4'- *O*-glucoside from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 47(5), 911-13
- Ioannou I, Hafsa I, Hamdi S, Charbonnel C, Ghoul M (2012) Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *J. of Food Engineering* 111, 208-17
- Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, Yamana Y (2004) Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *J. of Agric. Food Chem.* 52, 2391-96
- Kim H P, Son K H, Chang H W, Kang S S (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 229-45
- Kubo I, Masuoka N, Nihei K-I, Burgheim B (2006) Maniçoba, a quercetin-rich Amazonian dish. *J. of Food Composition and Analysis* 19, 579-88
- Lin T-L, Lin H-H, Chen C-C, Lin M-C, Chou M-C, Wang C-J (2007) *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Res.* 27(3), 140-45
- Mandelli F D (2010) Análise farmacognóstica e avaliação da atividade antimicrobiana de *Hibiscus acetosella*. Universidade UNESC, Criciúma, Portugal. www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/000051/00005121.pdf
- Mendez J (2005) Dihydrocinnamic acids in *Pteridium aquilinum*. *Food Chemistry* 93, 251-52
- Murakami A, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H (1995) Screening for *in vitro* anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Letters* 95, 139-46
- Olelaye M T, Rocha B T J (2007) Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Experimental and Toxicologic Pathology* 59(5), 319-27. doi: 1016/j.etp.2007.10.003
- Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition 2004. DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament). Conseil de l'Europe. Strasbourg. <http://www.pheur.org>
- Puckhaber L S, Stipanovic R D, Bost G A(2002) Analyses for flavonoid aglycones in fresh and preserved Hibiscus flowers. In Jancik J, Whipkey A (Eds) Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 2002, USA, pp 556-63
- Rahmat A, Kumar V, Fong L M, Endrini S, Sani H A (2003) Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 12(3), 292-95
- Rosa R M, Moura D J, Melecchi M I S, dos Santos R S, Richter M F, Camarao E B et al. (2007) Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and *tert*-butyl-hydroperoxide. *Toxicology in Vitro* 21(8), 1442-52
- Salawu S O (2006) Chemical composition and *in vitro* antioxidant activities of some Nigerian vegetables. *J. of Pharmacol. and Toxicol.* 1(5), 429-37

- Salawu S O, Giaccherini C, Innocenti M, Vincieri F F, Akidahunsi A A, Mulinacci N (2009) HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chemistry* 115, 1568-74
- Salawu S O, Akidahunsi A A, Sanni D M, Decorti G, Cvorovic J, Tramer F et al. (2011) Cellular antioxidant activities and cytotoxic properties of ethanolic extracts of four tropical green leafy vegetables. *Afr. J. of Food Sci.* 5(4), 267-75
- Santos M G, Kelecom A, de Paiva S R, de Moraes M G, Rocha L, Garrett R (2010) Phytochemical studies in Pteridophytes growing in Brazil : a review. *Am. J. of Plant Sci. And Biotechnol.* 4(1), 113-25
- Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1094-1117
- Sharma M, Li L, Cezlver J, Killian C, Kovoov A, Seeram N P (2010) Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3965-69
- Temitope, A O, Olufemi A G, Alaba F T (2010) Effect of heat treatment on antioxidant activity of some spices. *Continental J. Food Sci. Technol.* 4, 53-59
- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A (2004) Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.* 89, 549-54
- Tseng T H, Kao E, Chu Y H, Chou P P, Linwu H W, Wang C J (1997) Protective effects of dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 35, 1159-64
- Venkatesh S, Thilagavathi J, Sunadar D S (2008) Anti-diabetic activity of flowers of *Hibiscus rosasinensis*. *Fitoterapia* 79, 79-81
- Wong S P, Leong L P, Koh J H W (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99, 775-83
- Woo E R, Lee J Y, Cho I J, Kim S G, Kang K W (2005) Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF- κ B activation in macrophages. *Pharmacol. Res.* 51, 539-46
- Wu L-l, Yang X-b, Huang Z-m, Liu H-z, Wu G-x (2007) *In vivo* and *in vitro* antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L). *Medik. Acta Pharmacol. Sin.* 28 (3), 404-09