

1 Généralités

1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

1.1.1 Définition et notions préliminaires

Les "espèces réactives de l'oxygène" (**ROS**, de l'anglais **Reactive Oxygen Species**) sont des dérivés de l'**oxygène** dont certains électrons se trouvent dans un **état énergétique excité**, donc (très) **réactionnel**; certains de ces dérivés portent un électron non apparié (= radicaux libres).

En plus de l'oxygène, certaines ROS contiennent également un atome d'azote et sont aussi appelées "espèces réactives de l'oxygène et de l'azote" (**RNOS**, de l'anglais **Reactive Nitrogen and Oxygen Species**) (Serteyn et al. 2002; Haleng et al. 2007). Dans la suite de ce texte, le sigle « ROS » désignera aussi bien les RNOS que les ROS sans azote (Serteyn 2002).

Elles comprennent :

- des molécules entières (les hydroperoxydes ROOH, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'oxygène singulet ¹O₂, l'ozone O₃, l'acide hypochloreux HOCl etc),
- des ions (l'ion OCl⁻, l'ion peroxynitrite ONOO⁻ etc),
- des radicaux libres caractérisés par la présence d'un électron non apparié sur leur couche électronique supérieure (le radical hydroxyle ·OH ; l'anion superoxyde O₂^{·-}, l'oxyde nitrique ·NO etc).

Le caractère radicalaire est le plus souvent centré sur un atome d'oxygène, mais peut l'être aussi sur l'azote (l'oxyde nitrique ·NO). Cependant, il ne constitue pas toujours le critère de réactivité des ROS. L'oxygène moléculaire (O₂) est un biradical pratiquement inerte vis-à-vis de la matière vivante. Par contre, l'oxygène singulet (¹O₂), HOCl et H₂O₂ ne sont pas radicalaires mais bel et bien réactifs (Serteyn et al. 2002).

1.1.2 Principaux sites biologiques de production des ROS

L'oxygène moléculaire (O₂) porte sur sa couche électronique supérieure deux électrons non appariés. Par ce caractère biradicalaire, il est un triplet, ³O₂, plus couramment écrit O₂. Les deux électrons célibataires sont de spin parallèle et situés dans deux orbitales antiliantes (Thannickal et Fanburg 2000 ; Serteyn et al. 2002). Selon les règles d'interdiction de spin, qui relèvent de la chimie quantique, ³O₂ ne peut pas réagir avec un composé non radicalaire

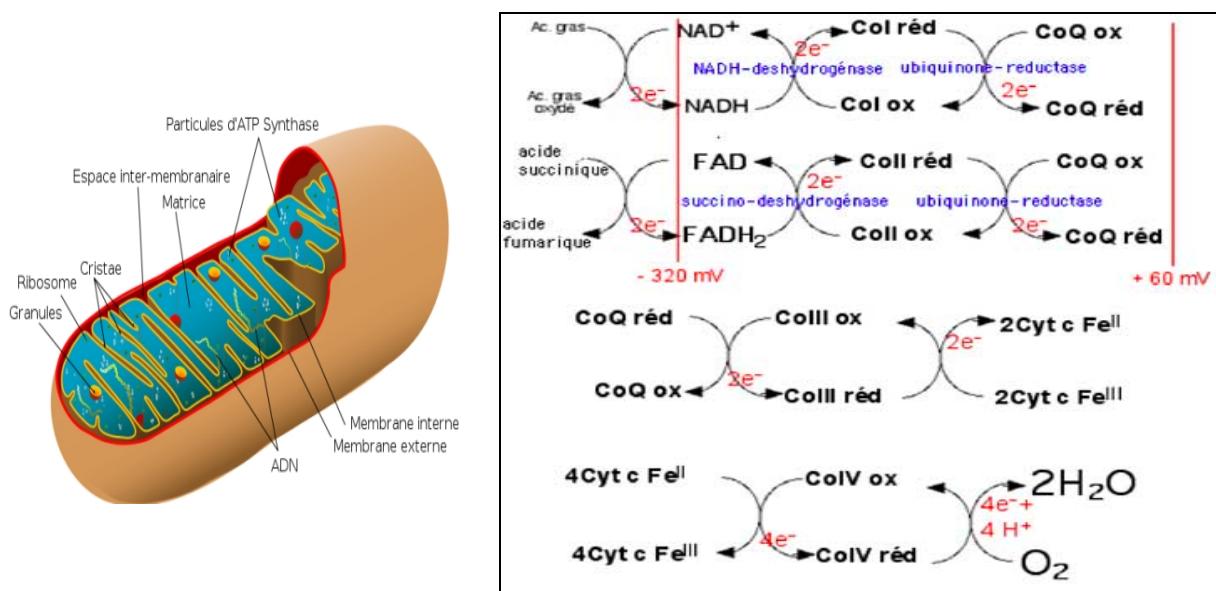
(un singulet), mais peut réagir soit avec un autre triplet, soit avec un doublet (monoradicalaire) (Serteyn et al. 2002).

Les molécules organiques sont des singulets. ${}^3\text{O}_2$ est inerte vis-à-vis d'elles tant que l'interdiction de spin n'a pas été contournée en faisant passer ${}^3\text{O}_2$ soit à l'état de doublet par transfert d'un électron, soit à l'état de singulet (${}^1\text{O}_2$, non radicalaire) par apport d'énergie, ou encore en faisant passer la molécule organique partenaire de la réaction à l'état de doublet (Serteyn et al. 2002). *In vivo*, ces réactions sont catalysées par des enzymes. Les oxydases transfèrent un électron sur le triplet ${}^3\text{O}_2$, les oxygénases transfèrent ${}^3\text{O}_2$ sur une molécule organique préalablement rendue radicalaire. Ci-dessous, nous présentons les principaux sites producteurs des ROS.

1.1.2.1 Production par les mitochondries

L'oxydation des acides tricarboxyliques dans le cycle de Krebs libère de l'énergie qui est transportée par des électrons de haut niveau d'énergie sur les FAD et NAD⁺ sous forme des réducteurs FADH₂ et NADH.

Fig. 1 : Cadran gauche : Schéma (non exhaustif) de la mitochondrie
Cadran droit : Modèle de la chaîne de transport d'électrons (Deby 2009b)

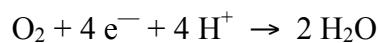


Cyt = cytochrome ; Co = Complexe ; CoQ = coenzyme Q ; ox = oxydé ; réd = réduit.

Ces électrons perdent progressivement leur énergie en traversant la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane interne de la mitochondrie (Fig. 1). Leur ultime rôle est de réduire l'oxygène moléculaire d'un coup, en produisant de l'eau, sans former des

composés intermédiaires. En même temps, les mitochondries stockent cette énergie en produisant de l'adénosine triphosphate (ATP). De tout l'oxygène que l'être humain consomme, la plus grande quantité sert à cette réduction, qui est catalysée par la cytochrome *c* oxydase ou complexe IV de la chaîne de transport d'électrons.

Les deux électrons transportés par NADH entrent dans la chaîne par la NADH déhydrogénase (Co I). Les deux autres transportés par FADH₂ entrent par la succinate déhydrogénase (Co II). L'ubiquinone réductase catalyse leur transfert de CoQ sur Co III, où ils réduisent le fer hémique situé dans le cytochrome *c*. Ce dernier n'est pas fixé sur Co III de manière inamovible. À l'état réduit, il a une très grande affinité pour Co IV et lui cède les électrons qu'il a reçus. Oxydé, il a une très grande affinité pour Co III et va y chercher d'autres électrons. Dans le pôle matriciel de Co IV, les électrons, arrivés au bout de leur chaîne de transport, réduisent d'un coup O₂ et forment deux molécules d'eau.



La phosphorylation de l'ADP en ATP, catalysée dans Co V (l'ATPsynthase, non représentée dans le schéma ci-dessus), et l'oxydation de FADH₂ et NADH, correspondant à la réduction de O₂ en H₂O, sont couplées et constituent la phosphorylation oxydative (Deby 2009b).

Tab. 1: Principaux sites mitochondriaux de réduction de O₂ en O₂^{•-} (Turrens 2003)

Component	Localization	References
Complex I (NADH dehydrogenase)	Inner membrane/ inner side	(Turrens & Boveris, 1980; Turrens <i>et al.</i> 1982; Genova <i>et al.</i> 2001; Kushnareva <i>et al.</i> 2002)
Complex II (succinate dehydrogenase)	Inner membrane/ inner side	(Zhang <i>et al.</i> 1998; Lenaz, 2001)
Complex III (ubiquinol-cytochrome <i>c</i> reductase)	Inner membrane/ inner side	(Boveris <i>et al.</i> 1976; Cadenas <i>et al.</i> 1977; Turrens <i>et al.</i> 1985)
Complex III (ubiquinol-cytochrome <i>c</i> reductase)	Inner membrane/ outer side	(Han <i>et al.</i> 2001; Starkov & Fiskum, 2001)
External NADH dehydrogenase (yeast)	Inner membrane/ outer side	(Fang & Beattie, 2003)
Glycerolphosphate dehydrogenase	Inner membrane/ outer side	(Drahota <i>et al.</i> 2002)
Dehydroorotate dehydrogenase	Matrix	(Forman & Kennedy, 1976)
Mono amino oxidase	Outer membrane/ inner side	(Hauptmann <i>et al.</i> 1996; Cadenas & Davies, 2000)

Comme le potentiel de réduction standard des couples rédox de la chaîne varie de - 0.32 V pour NAD(P)H, à - 0.39 V pour le cytochrome *c* de Co IV et que celui de O₂ est supérieur (- 0.16 V; Wood 1987), tout couple dont le potentiel de réduction est inférieur à - 0.16 V peut réduire O₂. En plus, le milieu de la matrice mitochondriale est fortement réducteur ;

différentes composantes de la chaîne (flavoprotéines, clusters Fe-S, ubisemiquinone) peuvent fournir un électron à O₂ (Tab. 1) (Turrens 2003; Orrenius 2007).

Ainsi, des électrons s'échappent de la chaîne par « fuite » et réduisent en O₂•— environ 2 à 4 % de l'oxygène inspiré (Thannickal et Fanburg 2000 ; Gardès-Albert et al. 2003 ; Turrens 2003; Valko et al. 2007 ; Orrenius et al. 2007; Orrenius 2007).

Sur la surface matricielle de la membrane interne, les principaux producteurs d'O₂•— sont Co I et Co III (Turrens 2003; Brand et al. 2004; Ott et al. 2007; Orrenius et al. 2007 ; Orrenius 2007). Co II participe également à cette production (Turrens 2003), d'autant plus que son substrat, le succinate, accélère la production de O₂•— dans Co I. Cette observation suggère une possibilité d'inversion du flux d'électrons entre les deux complexes (Liu et al. 2002).

Le taux de production d'O₂•— est contrôlé notamment par la concentration des substrats (donneurs d'électrons, O₂) et le flux d'électrons (Turrens 2003). La production qui a lieu dans la matrice est éliminée par les différents AOX qui y sont disponibles (catalase, Mn- et Cu/Zn-superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion et autres AOX non enzymatiques) ; une partie de la production intermembranaire est secrétée dans le cytoplasme à travers des canaux anioniques voltage-dépendants (Han et al. 2003).

H₂O₂ peut traverser la double couche de la membrane mitochondriale et atteindre le cytosol (Orrenius 2007). Dans une réaction "Fenton like" (où le fer doit obligatoirement être complexé), il forme 'OH (selon l'équation ci-dessous) :



La cascade « O₂•— → H₂O₂ → 'OH » génère d'autres ROS dont la concentration de part et d'autre de la membrane mitochondriale peut rapidement augmenter (Orrenius 2007). Cependant, *in vivo*, le fer est transporté et stocké dans des poches hydrophobes très peu accessibles, afin d'éviter des réactions d'oxydation délétères aux cellules et tissus. Ainsi, la réaction « Fenton », et la réaction « Haber-Weiss », qui en découle, sont très peu probables en milieu biologique, où le fer à l'état libre est excessivement rare, mais pourrait exister à l'état de trace (Jacob 1995 ; Klebanoff 2005).

1.1.2.2 Production par les cellules phagocytaires

1.1.2.2.1 Notions sur les événements qui constituent l'inflammation

L'inflammation est une réaction complexe de défense de l'organisme contre des agents exogènes comme les bactéries, et/ou endogènes comme les déchets des processus dégénératifs. Elle comprend un ensemble d'événements qui aboutissent à la production des ROS par les cellules phagocytaires (au premier rang les **neutrophiles**, puis les **monocytes** et les **macrophages**, et en moindre quantité les éosinophiles). Les **cellules endothéliales** y participent également de manière déterminante (Gardès-Albert et al. 2003).

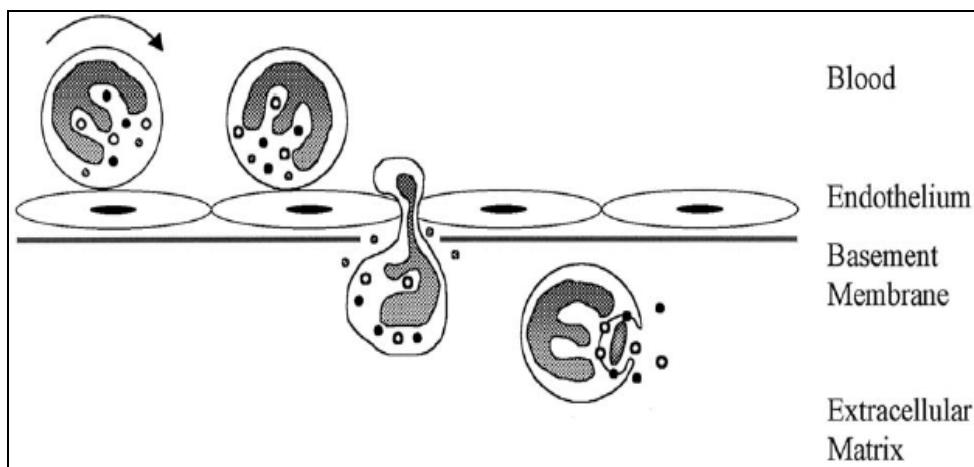
Les cellules phagocytaires sont formées dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Selon les facteurs de croissance présents et leur concentration, cette cellule souche se différencie soit en lignée lymphoïde pour produire des lymphocytes, soit en lignée myéloïde pour former des granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles) et des monocytes. À la maturation, les monocytes se différencient en macrophages (Goldsby et al. 2001). L'association entre "*granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF)" et interleukine -3 (IL-3) favorise la différenciation en lignée myéloïde. La présence supplémentaire d'IL-6 permet d'avancer vers la formation du précurseur des granulocytes et des macrophages ; celle de GM-CSF et de G-CSF favorise la maturation du précurseur en un neutrophile prêt à passer dans le sang où il circule de 7 à 10 heures avant d'aller demeurer quelques jours dans les tissus, y remplir ses fonctions et mourir (Rosenberg et Gallin 1999).

La migration transendothéliale des cellules phagocytaires du sang à travers la membrane endothéliale vers les tissus est appelée « diapadèse » ou « extravasation » (Goldsby et al. 2001; Faurschou et Borregaard 2003) (Fig. 2).

En l'absence d'activation, les cellules phagocytaires adhèrent faiblement aux cellules endothéliales parce que les molécules d'adhésion exprimées à la surface des unes et des autres ne sont que de faible affinité. Les cellules phagocytaires roulent sur l'endothélium.

À la réception d'un signal en provenance des médiateurs de l'inflammation (cytokines, chémokines), les cellules phagocytaires et endothéliales expriment des molécules d'adhésion de plus grande affinité.

Fig. 2: Extravasation des cellules phagocytaires (Faurschou et Borregaard 2003)



Ces événements activent les phospholipases A qui libèrent l'acide arachidonique (C₂₀ :4 ω6) et augmentent le taux des leucotriènes (LT4), puissants médiateurs de l'inflammation (Biesalski et al. 2004). Les cellules phagocytaires adhèrent alors plus fermement à l'endothélium et réorganisent leur cytosquelette. Guidées par le gradient des médiateurs chimio-attractants, elles se faufilent entre les cellules endothéliales, traversent la paroi endothéiale et atteignent le milieu extracellulaire, où elles sont attirées vers le site de l'agression. Arrivées sur ce site, elles phagocytent l'antigène envahisseur et libèrent des substances de défense (Goldsby et al. 2001).

Les neutrophiles sont caractérisés par un noyau plurilobé (polymorphonucléaire) et par des granules cytoplasmiques, notamment les granules primaires (azurophiles peroxydase positifs), les granules spécifiques, les granules gélatinase et les vésicules sécrétoires (Faurschou et Borregaard 2003).

Ces granules réagissent avec des colorants acides, basiques, et finalement neutres. Cette propriété a valu le nom de "neutrophile" à cette sous-famille de granulocytes, qui constitue 50 à 70 % des leucocytes circulants, 95 % de tous les granulocytes, et joue un rôle crucial dans l'immunité innée et la réaction inflammatoire.

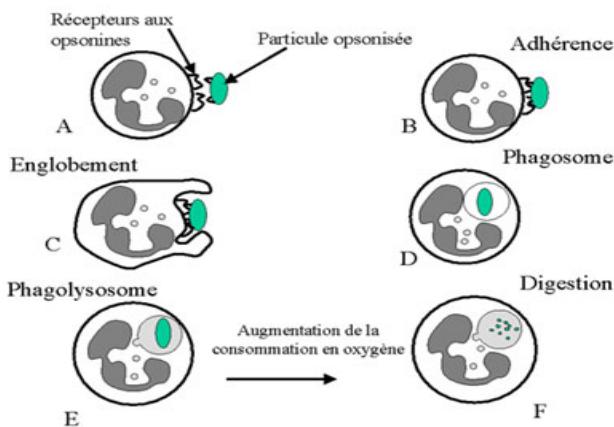
Les neutrophiles sont les premiers leucocytes à migrer, en très grand nombre, vers le site de l'agression (Goldsby et al. 2001). Ils disposent d'une concentration particulièrement élevée en **MPO** (jusqu'à 5 % de leur masse totale), une enzyme bactéricide extrêmement active dans la production des ROS (Serteyn et al. 2003). Un disfonctionnement des neutrophiles fragilise largement l'immunité innée et expose à des infections graves, systémiques, parfois mortelles, comme la granulomatose septique chronique, provoquée par une déficience de la production des ROS (Curnutt 1993). Au site de l'agression, les cellules phagocytaires ont trois fonctions

principales : la **phagocytose**, la **dégranulation** et la **production des ROS** (Goldsby et al. 2001).

♦ La phagocytose (Fig. 3)

Fig. 3: Phagocytose d'une particule opsonisée par un neutrophile

(www.chups.jussieu.fr/polys/anapath)



Les enzymes du lysosome sont déversées dans le phagosome pour constituer le phagolysosome. La digestion des particules des pathogènes fait intervenir une forte production de ROS.

Sur leur membrane cytoplasmique, les neutrophiles disposent des récepteurs aux lipopolysaccharides et à d'autres polysaccharides spécifiques des pathogènes. À leur reconnaissance, les antigènes sont opsonisés et présentés à des immunoglobulines membranaires (Ig) qui les fixent (adhérence). Dans la suite, une région de la membrane cellulaire forme des pseudopodes autour de l'antigène, l'encapsule (englobement) et se détache du reste de la membrane pour former le phagosome, une vacuole cytoplasmique dans laquelle l'antigène est désormais enfermé, la surface externe de la membrane cellulaire devenant la surface interne de la membrane du phagosome (Grennberg et Silverstein 1993; Lee et al. 2003). Cette séquestration est suivie d'événements métaboliques, dont la dégranulation, qui concourent à dégrader et à digérer le matériel phagocyté (Goldsby et al. 2001).

♦ La dégranulation

Les substances contenues dans chaque catégorie de granules des neutrophiles sont spécifiques de cette catégorie; les granules primaires sont les seuls à contenir de la MPO (Tab. 2) (Faurschou et Borregaard 2003). Le contenu de tous les granules (MPO, lysozyme, défensine, phosphatase alcaline, collagénase, acétyltransférase, élastase, etc) participe aux activités protéolytiques et hydrolytiques destinées à la dégradation et à la digestion complète du matériel phagocyté.

Tab. 2: Contenu des granules primaires des neutrophiles (Faurschou et Borregaard 2003)

Membrane	Matrix
CD63 CD68 Presenilin 1 Stomatin V-type H ⁺ -ATPase	Acid β-glycerophosphatase Acid mucopolysaccharide α ₁ -Antitrypsin α - Mannosidase Azurocidin BPI β - glycerophosphatase β - Glucuronidase Cathepsins Defensins Elastase Lysozyme MPO <i>N</i> -acetyl-β-glucosaminidase Proteinase-3 Sialidase Ubiquitin-protein

BPI = bactericidal/permeability increasing protein

La formation du phagosome enclenche divers autres événements métaboliques, dans lesquels sont également impliqués les éléments du complément. Les granules intègrent leur membrane dans celle du phagosome, fusionnent avec lui et libèrent leur contenu dans l'espace intravacuolaire, qui constitue désormais le phagolysosome. Les granules peuvent également intégrer leur membrane dans celle du neutrophile et la modifier. En cas d'activation très forte et prolongée des neutrophiles, le contenu des granules primaires est libéré en milieu extracellulaire ; toutefois, ce cas extrême arrive très rarement (Faurschou et Borregaard 2003).

1.1.2.2.2 La production des ROS

Dans les cellules, la production des ROS est assurée par des enzymes oxydantes. Les oxydases (**NADPH oxydase**) constituent un "point d'entrée" en produisant l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dont dérivent d'autres ROS. La **NOS** produit l'oxyde nitrique ('NO) indépendamment de $O_2^{\cdot-}$ et constitue un autre "point d'entrée" (Serteyn et al. 2002). La **MPO** produit HOCl qui amplifie la production des ROS (Serteyn et al. 2003). D'autres enzymes (déshydrogénases, oxygénases, cyclo- et lipoxygénases, peroxydases, etc), des composés non enzymatiques et des cellules non phagocytaires produisent également des ROS.

1.1.2.2.2.1 Production par la NADPH oxydase (Nox)

Structure de la Nox

La Nox est un grand complexe multiprotéique transmembranaire, dont la Fig. 4 propose un modèle de structure simplifié.

Elle est composée des sous-unités suivantes :

- le flavocytochrome b_{558} , membranaire, composé de deux sous-unités : les protéines gp91^{phox}, site de l'activité catalytique, et p22^{phox} (*phox* pour « *phagocytic oxidase* »). Rap, une petite protéine membranaire, est attachée à la sous-unité membranaire gp91^{phox}.

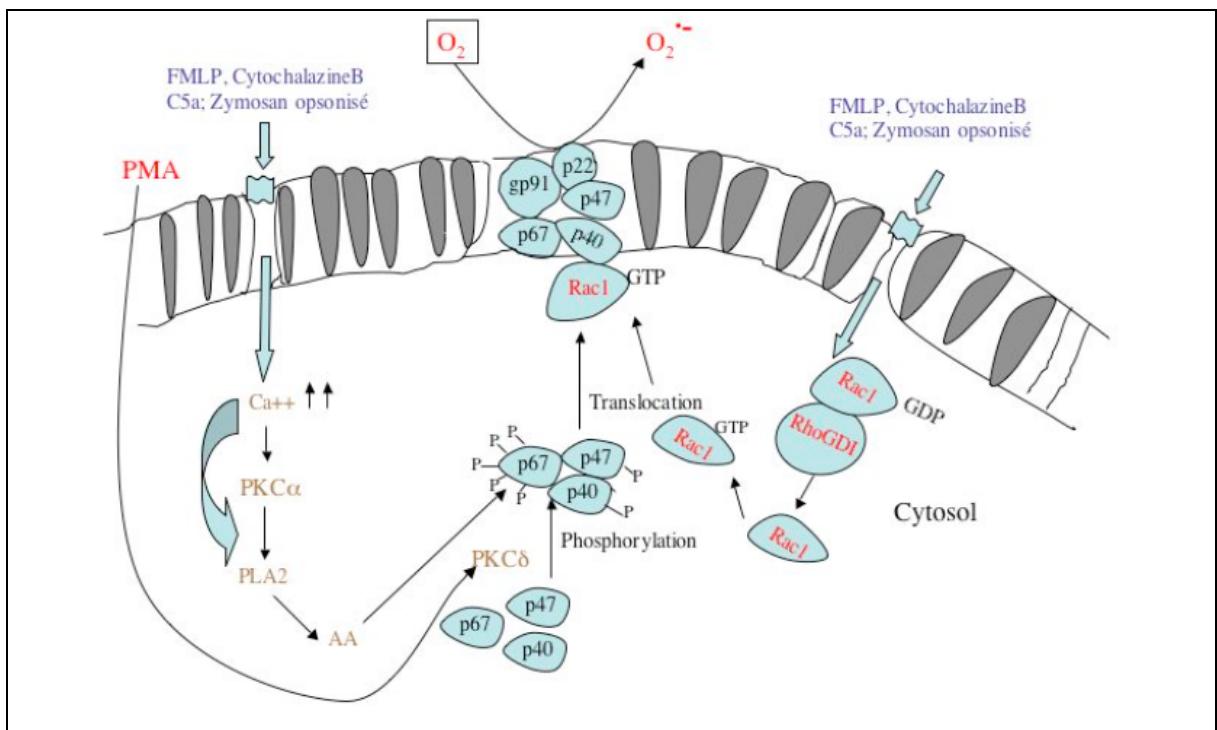
Le cytochrome absorbe à 558 nm ; il est également nommé $b\text{-}245$ parce que son potentiel standard de réduction est de -245 mV. Il porte une flavine adénine dinucléotide (FAD) et deux groupements prosthétiques hémiques dont les potentiels redox sont de -225 et -265 mV à pH 7.0 (Sumimoto et al. 1992; Babior 1999; Takeya et Sumimoto 2003).

- les composantes cytosoliques : les protéines p40^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} et la protéine Rac.

Différentes isoformes ont été découvertes dans des cellules non phagocytaires. Elles sont distinguées les unes des autres par classification en sous-familles Nox et Duox. La Nox des cellules phagocytaires constitue la sous-famille Nox 2 (Lambeth et al. 2007). Sa sous-unité gp91^{phox} est également appelée Nox 2 parce qu'elle est le site catalytique.

Les protéines gp91^{phox} et p22^{phox} sont membranaires ; les 4 autres (p40, p47, p67 et Rac 1) sont cytosoliques. À l'activation, p47 est la première à être phosphorylée. Elle est ensuite transloquée vers les deux unités membranaires et entraîne avec elle p40 et p67, phosphorylées elles aussi. La protéine Rac 1 est également attirée vers les unités membranaires. Les différentes unités finissent par se rassembler et constituer la forme active de la Nox. La protéine gp91^{phox}, qui contient le site actif de la NADPH oxydase, peut alors produire l'anion superoxyde (Babior 1999).

Fig. 4 : Modèle de structure et d'activation de la Nox
(Mouithys-Mickalad 2007)

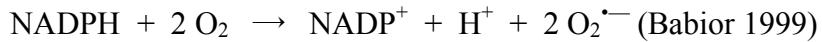


Assemblage des composantes et activation

L'assemblage des composantes de la Nox enclenche l'activation. Sur la protéine Rac, la phosphorylation de GDP en GTP active la protéine qui ensuite se détache de RhoGDI et est recrutée sur la membrane pour s'y associer à la sous-unité Nox 2 du cytochrome b_{588} (Fig. 4).

Après leur phosphorylation, les protéines p40^{phox}, p67^{phox} et p47^{phox} sont recrutées sur la membrane, où p67^{phox} et p47^{phox} s'associent à la fois l'une à l'autre et directement au flavocytochrome. p47^{phox} effectue d'elle-même sa propre translocation et y entraîne p67^{phox} (DeCoursey et Ligeti 2005 ; Lambeth et al. 2007).

Ces événements résultent dans un changement de conformation de p47^{phox} qui la rend accessible à p22^{phox}. Celle-ci entre en interaction allostérique avec gp91^{phox}, le site catalytique (Ago et al. 2003) qui ensuite catalyse le transfert de deux électrons d'une molécule de NADPH cytosolique à travers FAD et le fer hémique sur deux molécules O₂ dans le phagosome (Doussiere et al. 1996 ; Babior 1999; Takeya et Sumimoto 2003).



p40^{phox} se fixe sur des phosphatidyl-inositols et d'autres lipides membranaires phosphorylés, et aiderait à arrimer plus fermement dans la membrane cellulaire les autres composantes régulatrices de la Nox (Lambeth et al. 2007). Rap 1 participe à l'assemblage des composantes et à leur phosphorylation (Babior 1999), mais ses fonctions sont encore peu détaillées (DeLeo et Quinn 1996 ; DeCoursey et Ligeti 2005).

Le transfert d'électrons de NADPH à O₂ par la Nox s'effectue en plusieurs étapes. Le donneur d'électrons, NADPH, est fourni par le « shunt » des hexoses monophosphates (DeCoursey et Ligeti 2005).

Régulation de la Nox phagocytaire

* *Par la voie de l'activation*

L'activité des Nox est régulée spatialement et temporellement (Babior et al. 1973). La fixation de l'activateur sur le récepteur membranaire induit des événements de phosphorylation et de changement de conformation qui sont transmis jusqu'à la PKC (Takeya et Sumimoto 2003). Des activateurs solubles comme le formyl méthyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) biaisent la transduction (Dekker et al. 2000 ; Takeya et Sumimoto 2003; DeCoursey et Ligeti 2005).

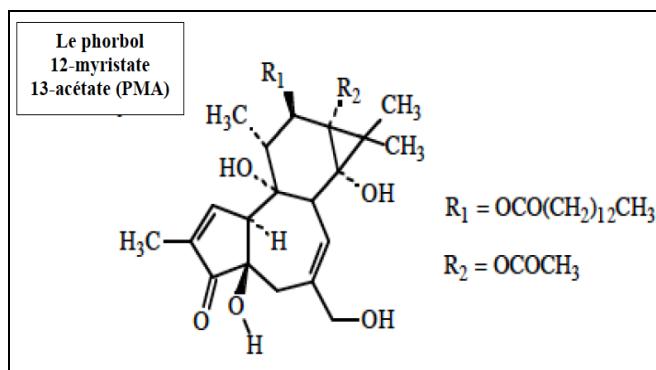
Les PKC participent directement à la phosphorylation des composantes cytosoliques de la Nox. Les esters de phorbol induisent divers ré-arrangements de leur environnement moléculaire, qui aboutissent à l'activation des récepteurs au phorbol (Cox et al. 1985). Contrairement au fMLP, l'activation au PMA biaise toute la transduction du signal et induit la phosphorylation immédiate de PKC. Le PMA (Fig. 5) est un puissant activateur ; il effectue une stimulation immédiate, forte et continue de la PKC δ (Dekker et al. 2000 ; Takeya et Sumimoto 2003; DeCoursey et Ligeti 2005).

Le changement de conformation du cytochrome accroît énormément son affinité pour NADPH. La **vitesse d'assemblage** des composantes de la Nox est un facteur régulateur de

l'activation de la Nox 2. Toute mutation dans l'une ou l'autre de ses composantes rend l'enzyme peu ou pas fonctionnelle. La « granulomatose septique chronique », une déficience héréditaire caractérisée par des infections sévères et récurrentes, résulte de l'incapacité des neutrophiles à produire les ROS nécessaires pour combattre les bactéries. Une mutation au niveau des gènes codant respectivement pour les protéines gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} est à l'origine de cette déficience (Heyworth et al. 2003).

Les phosphorylations, la translocation, le recrutement et l'assemblage des composantes cytosoliques sur la membrane sont induites par le stimulus. La **vigueur du stimulus** détermine l'intensité et la durée de l'activité oxydase (Groemping et Rittinger 2005).

Fig 5 : Structure du PMA (Mouithys-Mickalad 2007)



NADPH et O₂ sont les deux substrats de l'enzyme. Sous conditions physiologiques normales, la pression partielle d'O₂, déjà inférieure à 5% de son niveau atmosphérique, ne joue pas de rôle dans l'activité de l'enzyme, mais la **disponibilité de NADPH** dans le cytosol est déterminante. Sa concentration cytoplasmique habituelle (50 – 100 μM) semble équivaloir à son affinité pour l'enzyme (DeCoursey et Ligeti 2005).

Pendant l'activité, NADPH doit être continuellement renouvelé grâce au shunt des hexoses monophosphates (ou cycle des pentoses). Des changements de concentration de NADPH et/ou une déficience sévère des enzymes de ce shunt affectent sévèrement l'activité. La **glucose-6-phosphate déshydrogénase** est l'enzyme de départ de ce shunt. Elle catalyse la transformation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone et génère ainsi NADPH à partir de NADP⁺. Sa déficience jusqu'à une activité résiduelle inférieure à 1 % est accompagnée d'une défense antibactérienne déficiente et de symptômes semblables à la granulomatose septique chronique. 20 % de son activité sont requis pour prévenir ces symptômes (DeCoursey et Ligeti 2005). La **6-phosphogluconate déshydrogénase**, une autre enzyme du shunt, régénère également NADPH à partir de NADP⁺ (Deby 2009a).

L'activité Nox est accompagnée d'une forte augmentation de la glycogénolyse pour fournir le glucose nécessaire à la production de NADPH. On observe également une forte consommation d' O_2 , appelée "*respiratory burst*" (DeCoursey et Ligeti 2005) qui est indépendante de la respiration mitochondriale (Takeya et Sumimoto 2003) et par conséquent insensible aux inhibiteurs de la cytochrome c oxydase comme les cyanures. La phosphorylation de GDP en **GTP** est indispensable pour que Rac adhère au cytochrome ; l'activité Nox requiert un **apport suffisant en GTP** (Takeya et Sumimoto 2003; DeCoursey et Ligeti 2005).

* *Par la voie de la désactivation*

Dans les conditions physiologiques normales, un épuisement de NADPH est peu vraisemblable et ne peut pas être la cause d'une désactivation de la Nox. Par contre, une déficience ou une inhibition de la MPO prolonge inhabituellement l'activité Nox. Dans ce cas, la concentration de H_2O_2 , issu de la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ et substrat normal de la MPO, augmente de manière remarquable. H_2O_2 diffuse à travers la membrane du phagosome dans le cytosol, y inhibe les phosphatases et prolonge l'activité Nox. Cette observation suggère qu'un **fonctionnement normal de la MPO** produit des substances qui interviendraient dans la désactivation de la Nox (DeCoursey et Ligeti 2005).

Les protéines **Rac** jouent un rôle dans l'activité Nox : leur phosphorylation régule beaucoup d'éléments clés de la fonction phagocytaire, leur déphosphorylation arrête l'activité de l'enzyme. Les **Gap** (**GTPase activating protein**) peuvent accélérer le taux d'hydrolyse de GTP en GDP et désactiver l'enzyme. Leurs interactions avec Rac à différentes phases de l'activité Nox régulent l'activité de l'enzyme de manière fine et sélective et pourraient expliquer certaines différences observées avec différents stimuli.

La **déphosphorylation** semble être la cause immédiate de désactivation de la Nox dont l'activité paraît réversible, pouvant s'arrêter toutes les 20 à 30 s et reprendre dans les instants suivants. Des événements de déphosphorylation et de phosphorylation expliqueraient cette observation. La phosphorylation accroît l'affinité réciproque des éléments du complexe, permet leur assemblage et active le complexe entier. Les inhibiteurs des kinases (notamment de la PKC) empêchent la phosphorylation et terminent l'activité Nox. Les phosphatases catalysent la déphosphorylation; leurs inhibiteurs accélèrent et prolongent la flambée respiratoire. Une **hyperphosphorylation de p47^{phox}** induit sa dissociation de p67^{phox} et entraîne la désactivation de l'enzyme (Babior 1999; Takeya et Sumimoto 2003; DeCoursey et Ligeti 2005).

1.1.2.2.2.2 Production par la NO synthase (NOS)

Les NOS existent en trois isoformes distinctes (e-, i- et nNOS) qui présentent une homologie de 50 – 60 % (Hobbs et al. 1999 ; Alderton et al. 2001) :

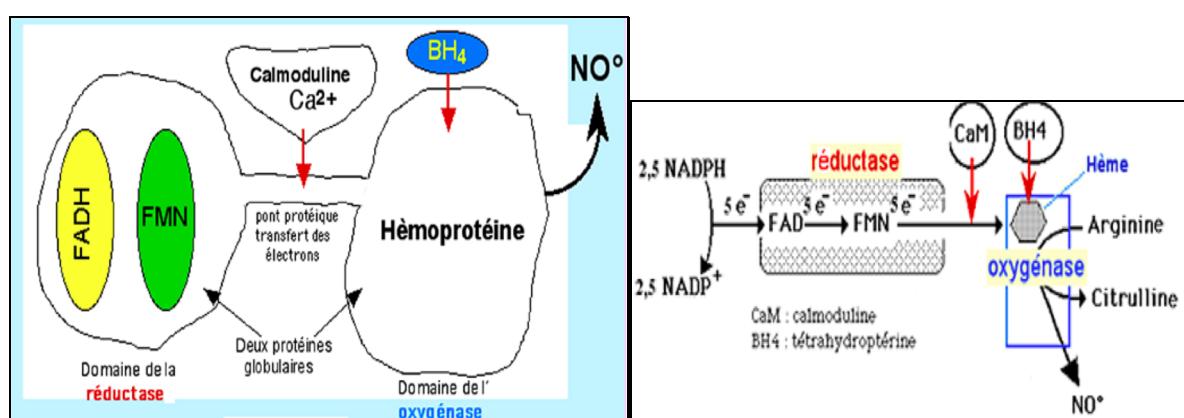
- eNOS (= NOS III), constitutive, est présente, entre autres, dans les cellules endothéliales;
- iNOS (= NOS II), inducible, peut être exprimée dans plusieurs types de cellules, p. ex. après induction par des médiateurs de l'inflammation et des produits bactériens (Hobbs et al. 1999);
- nNOS (= NOS I), constitutive, se rencontre notamment dans les neurones, l'épithélium bronchial et le muscle squelettique humain (Hobbs et al. 1999). Son activité est régulée par Ca^{2+} et par la calmoduline.

Structure et activité des NOS

Les NOS sont des hémoprotéines dimériques. Le dimère est composé de deux protéines globulaires dont chacune constitue un domaine séparé (Fig. 6, cadran gauche) (Deby 2009a).

Fig. 6: Structure de la NOS (cadran gauche) et schéma

du transfert d'électrons (cadran droit) (Deby 2009a)



Cadran gauche : le domaine réductase est relié par un pont protéique au domaine oxygénase. Le pont protéique lie Ca^{2+} et la calmoduline et sert au transfert d'électrons.

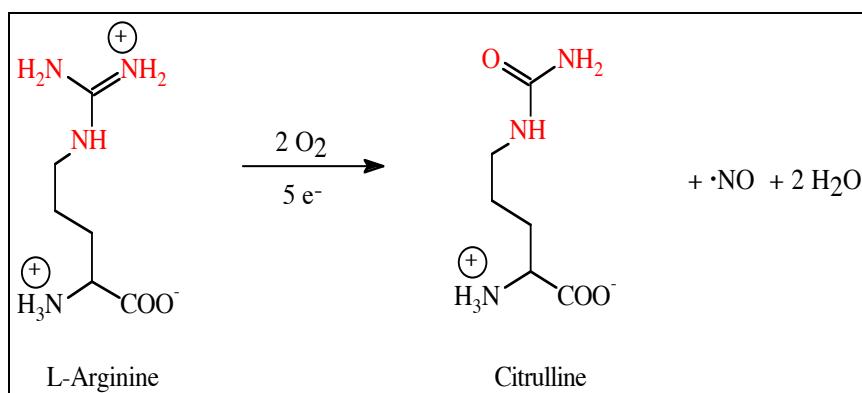
Le domaine oxygénase contient l'hème et BH4.

Cadran droit: transfert d'électrons.

Le domaine C terminal constitue le domaine de la **réductase**. Il contient les sites de liaison pour NADPH, FADH et FMN. Au milieu, un pont protéique unit les deux domaines et sert au transfert d'électrons du domaine C-terminal vers le domaine N-terminal. Ce pont contient la calmoduline (CaM) et le calcium nécessaires à l'activité de la NOS.

Les NOS catalysent la transformation de L-arginine en citrulline (Fig. 7) et produisent du **monoxyde d'azote (\cdot NO)**, appelé aussi **oxyde nitrique**, (Hobbs et al. 1999; Alderton et al. 2001; Deby 2009a).

Fig. 7: Activité de la NOS



L'attaque porte sur la terminaison guanidinique de L – arginine: une demi-molécule d' O_2 oxyde la L – arginine, l'autre demi-molécule forme l'oxyde nitrique $\cdot\text{NO}$
 (Modifié d'après Deby 2009a).

Les électrons provenant de l'oxydation de NADPH sont successivement transférés sur FAD et FMN vers le domaine N-terminal qui constitue le domaine **oxygénase**. Ce dernier contient les sites de liaison pour l'hème, la tétrahydrobioptérine (BH_4) et la L-arginine : c'est le site catalytique qui produit $\cdot\text{NO}$ (Hobbs et al. 1999 ; Alderton et al. 2001) (Fig. 7, cadran droit). Cinq électrons provenant de 2.5 molécules de NADPH sont transférés sur FAD, puis sur FMN dans le domaine réductase et à travers le pont protéique. CaM et BH_4 permettent au domaine oxygénase d'oxyder L-arginine en citrulline et de produire $\cdot\text{NO}$ (Deby 2009a). BH_4 est nécessaire à l'activité de la NOS : elle interagit avec l'hème et se lie près du site actif où se fixe la L-arginine (Alderton et al. 2001).

Régulation de l'activité des NOS

Les NOS ont une stéréo-spécificité pour L-arginine. Elles sont activées par la **calmoduline-Ca²⁺**, mais inhibées par leur propre produit. Au cours de l'activité enzymatique, 'NO peut se fixer sur l'hème, bloquer l'enzyme de manière réversible et induire un état stationnaire de l'activité ("steady state"). Une concentration suffisante d'O₂, de BH₄ et de L-arginine limite cet effet "feed back". Cependant, une concentration insuffisante de BH₄ pousse la NOS à produire H₂O₂ et O₂^{•-}(Deby 2009a). Les **phosphorylations** activent les eNOS et les nNOS et accroissent l'activité Ca²⁺-indépendante des eNOS.

1.1.2.2.3 Production par la myéloperoxydase (MPO)

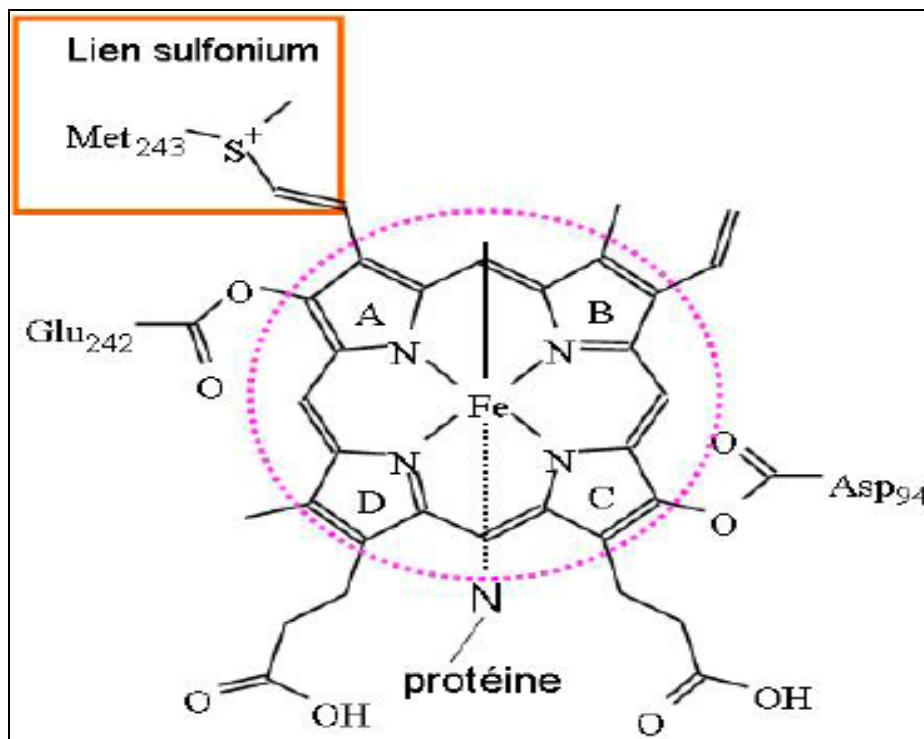
Structure de la MPO

La MPO est une enzyme hémique particulièrement abondante dans les neutrophiles. Elle est présente en moindre quantité dans les monocytes. À la maturation de ces derniers en macrophages, elle n'y est plus détectable. Elle est synthétisée uniquement aux premiers stades de la différenciation myéloïde, au maximum lors du stade promyélocyte (Serteyn et al. 2003). C'est un homodimère de poids moléculaire variable (de 120 à 150 kDa) selon sa glycosylation et formé de deux hémi-enzymes dont chacune a deux sous-unités: une chaîne légère de 15 kDa et une chaîne lourde de \pm 60 kDa, reliées par un pont disulfure (Fig. 8).

Ses quatre noyaux pyrroles A, B, C et D forment un cycle, les atomes d'azote tournés vers l'intérieur (cycle dérivé de la protoporphyrine IX). Au centre du cycle, un atome de Fe^{III} est lié à chacun des quatre atomes d'azote (enzyme native, MPO-Fe^{III}). Par deux liaisons apicales perpendiculaires au plan du cycle, le fer lie l'hème à deux histidines, l'une distale (His₂₆₁) et l'autre proximale (His₅₀₂) (non représentées sur la Fig. 8).

Aux noyaux pyrroles A et C, l'hème présente trois liaisons covalentes avec des acides aminés de la protéine : un groupe méthyle modifié est lié à un résidu aspartate (Asp₉₄), un autre à un résidu glutamate (Glu₂₄₂). Ces deux liaisons sont communes aux peroxydases des mammifères. La troisième, spécifique de la MPO, lie un groupe vinyle du noyau A à l'atome de soufre de la méthionine (Met₂₄₃). Cette liaison "sulfonium" donne à l'enzyme sa propriété particulière de chloration. La MPO absorbe à 430 nm ; son site actif est situé à la base d'une poche hydrophobe d'accès difficile (Serteyn et al. 2003).

Fig. 8: Structure du noyau hémique de la myéloperoxydase (Serteyn et al. 2003)



Production des ROS

Les principales activités oxydantes de la MPO sont présentées dans le Tab. 3. L’enzyme développe une activité de peroxydase particulière, la chloration. À l’état natif (MPO-Fe^{III}), elle transforme H₂O₂ en H₂O et fixe un atome d’oxygène en lui donnant deux électrons dont l’un vient de Fe^{III} qui devient Fe^{IV} et l’autre d’un acide aminé de la protéine qui prend un caractère radicalaire « π cation radical » désigné par les signes « \cdot^+ » (Tab. 3, équation 1A). Dans cet état (MPO^{·+}-Fe^{IV}=O) appelé « composé I » (Cd I, de l’anglais compound), elle reçoit deux électrons de Cl, disponible dans le milieu cellulaire, et retrouve son état natif, tandis que se forme HOCl, un puissant bactéricide et le produit le plus oxydant de la MPO, où Cl est à l’état d’oxydation 1⁺ (Tab. 3, équation 1B; Serteyn et al. 2003 ; Klebanoff 2005).



Cd I développe l’activité de peroxydase classique en 2 étapes de réduction monovalente :

- le premier électron arraché à un réducteur (D¹H) met fin à l’état radicalaire sur la protéine ; le fer demeure à l’état Fe^{IV} (Cd II ; Tab. 3, équation 2A) ;
- le second électron, arraché à D²H, réduit Fe^{IV} en Fe^{III} (MPO-Fe^{III} ; Tab. 3, équation 2B).

Les ascorbates, les catécholamines, les nitrites (NO_2^-), les œstrogènes, la sérotonine et la tyrosine peuvent réduire MPO-Fe^{IV} et produire des dérivés radicalaires réactifs capables de diffuser et de propager la formation des ROS dans les tissus (Serteyn et al. 2003). Les activités catalytiques de la MPO sont mises à profit pour étudier séparément l'affinité de différents réducteurs pour Cd I et Cd II et les effets de l'activité oxydante de Cd I et de Cd II sur eux. NO_2^- présente plus d'affinité pour Cd I que pour Cd II et permet d'étudier l'activité de nitration de la MPO (Kohnen et al. 2007). L'Amplex Red® présente plus d'affinité pour Cd II et permet d'étudier l'activité de peroxydase classique de la MPO (Franck et al. 2006).

Des réducteurs peuvent transformer de manière réversible la forme native, encore active, (MPO -Fe^{III}) en l'état inactif MPO -Fe^{II} (Cd III, Tab. 3, équation 3A) (Deby-Dupont et al. 1999; Serteyn et al. 2003). Tel pourrait être le cas en début de phagocytose pour maintenir dans le phagolysosome un pH légèrement alcalin ou neutre permettant de laisser la MPO encore quiescente et d'atteindre une activité maximale de la Nox (Serteyn et al. 2003).

Tab. 3: Principales activités de la MPO dans la production des ROS (Serteyn et al. 2003)

<p>1) <i>Production de l'acide hypochloreux (activité de chloration)</i></p> <p>1A) $\text{MPO-Fe}^{\text{III}} \text{ (état natif)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{MPO}^{\cdot+}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} \text{ (Cd I)} + \text{H}_2\text{O}$</p> <p>1 B) $\text{MPO}^{\cdot+}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{H}^+ + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{MPO-Fe}^{\text{III}} + \text{HOCl}$</p> <p><i>Oxydation à deux électrons en deux étapes réactionnelles quasi simultanées.</i></p>
<p>2) <i>Activité de peroxydase</i></p> <p>2A) $\text{MPO}^{\cdot+}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{D}_1\text{H} \rightarrow \text{MPO-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} \text{ (Cd II)} + \text{D}_1^\cdot + \text{H}^+$</p> <p>2B) $\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{D}_2\text{H} \rightarrow \text{MPO-Fe}^{\text{III}} + \text{D}_2^\cdot + \text{H}^+$</p> <p><i>En deux étapes d'oxydation à un électron, qui exigent deux molécules de substrat réducteur</i></p>
<p>3) <i>Formation du Cd III</i></p> <p>3A) $\text{MPO-Fe}^{\text{III}} + \text{DH} \rightarrow \text{MPO-Fe}^{\text{II}} \text{ (Cd III)} + \text{D}^\cdot$</p> <p>3B) $\text{MPO-Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{MPO-Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$</p>

MPO-Fe^{III} : enzyme native ; MPO^{·+}-Fe^{IV}=O : Composé I (Cd I) ;

MPO-Fe^{IV}=O : Composé II (Cd II) ; DH / D[·] : donneur d'électrons, à l'état réduit / oxydé.

Autres activités de la MPO

Par sa production de ROS, la MPO développe d'autres activités biologiques :

- activité bactéricide dans le phagosome, principalement grâce à HOCl et à ses dérivés chlorines et chloramines (Deby-Dupont et al. 1999; Serteyn et al. 2003; Klebanoff 2005);
- potentialisation des macrophages à la bactéricidie : les macrophages ne disposent pas de MPO, mais capturent celle des neutrophiles grâce à des récepteurs au mannose et peuvent alors détruire les bactéries pourvues de polysaccharides sur leurs capsules (Serteyn et al. 2003);
- agent inflammatoire : d'ordinaire, la MPO est peu secrétée en milieu extracellulaire (10 – 15 %). Lors d'une réaction inflammatoire incontrôlée, elle est libérée dans le milieu extracellulaire par dégranulation (Serteyn et al. 2003 ; Faurschou et Borregaard 2003). Des concentrations inhabituellement élevées de MPO dans un milieu biologique sont des marqueurs d'un état inflammatoire (Serteyn et al. 2003);
- agent cytotoxique : les produits de la MPO ont des effets délétères sur leur environnement cellulaire (Deby-Dupont et al. 1999; Serteyn et al. 2003; Klebanoff 2005). Ce fait justifie l'intérêt thérapeutique à moduler son activité (Serteyn et al. 2003 ; Malle et al. 2007);
- modulation de la signalisation et des fonctions cellulaires : la chloration et la nitration des résidus tyrosines par les produits de la MPO perturbent les événements de phosphorylation et déphosphorylation ; de cette manière, elles modifient la transduction du signal et l'exécution des fonctions cellulaires (Deby-Dupont et al. 1999; Thannickal et Fanburg 2000; Serteyn et al. 2003; DeCoursey et Ligeti 2005 ; Klebanoff 2005);
- les produits de la MPO interagissent avec les lymphocytes, les macrophages, les plaquettes, les érythrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, et sont impliqués dans des pathologies même non inflammatoires (Deby-Dupont et al. 1999; Serteyn et al. 2003; Klebanoff 2005).

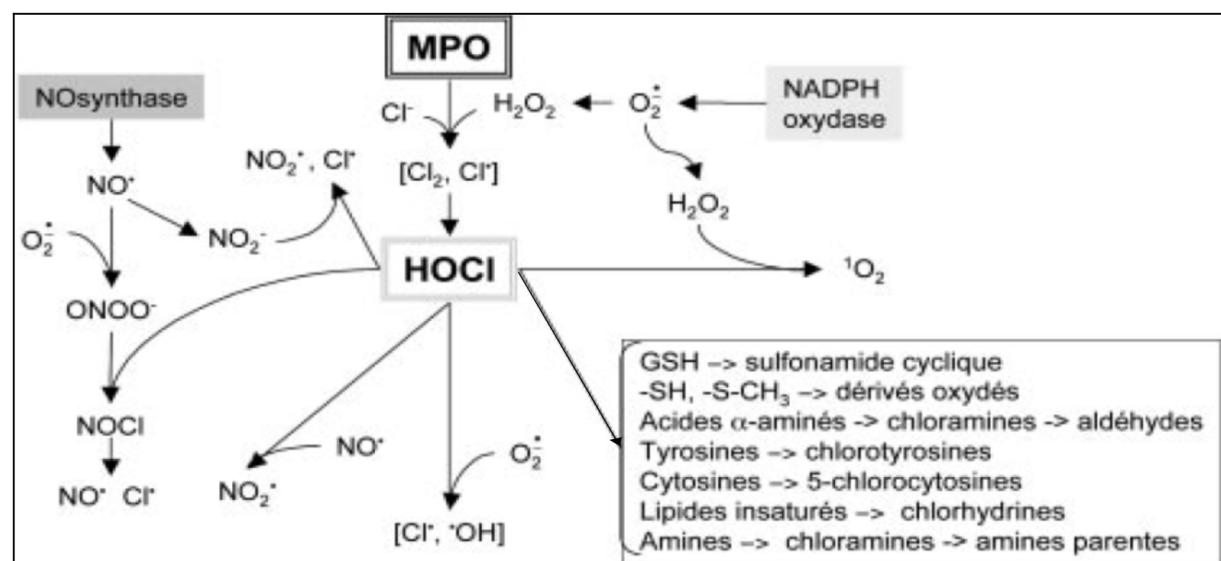
Facteurs régulant l'activité de la MPO

L'activité de la MPO est régulée entre autres par ses substrats. La concentration en H_2O_2 dépend de l'activité de la Nox. Dans le plasma, Cl^- est à une concentration moyenne de 100 mM. La concentration en réducteurs et le pH jouent également un rôle ; **l'enzyme atteint son activité maximale à un pH acide**. NO_2^- réduit Cd I en Cd II et augmente l'activité peroxydasique de la MPO (Deby-Dupont 1999; Serteyn 2003)

Interaction entre NOx, NOS et MPO

L'interaction entre le produit de la Nox (O_2^-), son dérivé H_2O_2 , le produit de la NOS ('NO) (Fig. 9) et les produits d'autres enzymes oxydantes amplifie de manière déterminante la production des ROS.

Fig. 9: Interaction entre la Nox, la NOS et la MPO et amplification de la production des ROS
(Serteyn et al. 2003)



Cl' = chlore à l'état natif ; ' NO ' = monoxyde d'azote ; NO_2^{\bullet} = dioxyde d'azote (radical nitryle); NOCl = chlorure de nitrosyle; $\text{O}_2^{\bullet-}$ = anion superoxyde; ' OH ' = radical hydroxyle; ${}^1\text{O}_2$ = oxygène singulet; $\text{ONOO}^{\bullet-}$ = anion peroxynitrite; GSH: glutathion réduit; $-\text{S}-\text{CH}_3$ = méthionyle. Rectangle inférieur droit = altérations des molécules biologiques par HOCl.

1.1.2.3 Production dans les cellules non-phagocytaires

Des récepteurs membranaires (p.ex. récepteur à l'insuline, récepteur à l'« *epidermal growth factor* » "EGF", etc) fixent des cytokines et des facteurs de croissance. Dans les cellules non-phagocytaires, l'interaction entre ces récepteurs et leurs ligands active des enzymes oxydantes (Thannickal et Fanburg 2000 ; Dröge 2002) (Tab. 4).

Tab. 4 : Production dans les cellules non phagocytaires (Thannickal et Fanburg 2000)

Ligand	Reactive Species	Enzymatic Source(s)	Cell or Tissue	Functional (or Pathophysiological) Effects	Reference No.
<i>Cytokines</i>					
TNF- α	O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ O ₂ [.] O ₂ [.] H ₂ O ₂ Unspecified	NAD(P)H oxidase Unknown NADPH oxidase Flavoprotein oxidase Mitochondria	Fibroblasts Endothelial cells Mesangial cells Chondrocytes Fibrosarcoma	Unknown Unknown MCP-1, CSF-1 expression Mitogenesis NF- κ B activation, IL-6 induction Cytotoxicity	191 202 253 176 257 92
+ IL-1 + IFN- γ	Unspecified Unspecified Unspecified O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ O ₂ [.]	Unknown Flavoprotein oxidase Unknown NAD(P)H oxidase Unknown	Breast carcinoma cells Rat mesangial cells Microglial cells Fibroblasts Endothelial cells	HSP27 phosphorylation COX-2 expression Unknown Unknown Unknown	189 75 47 191 187
IL-1	O ₂ [.]	Unknown	Dog myocardium	Myocardial dysfunction	51
IFN- γ	O ₂ ⁻ O ₂ [.] H ₂ O ₂	Unknown Cyclooxygenase	Endothelial cells Hepatocytes	Unknown Antibacterial action	187 146
<i>Receptor tyrosine kinases</i>					
PDGF	H ₂ O ₂ H ₂ O ₂ O ₂ [.] O ₂ [.]	Unknown Flavoprotein oxidase Unknown Flavoenzyme	BALB/3T3 cells Smooth muscle cells NIH/3T3 cells Smooth muscle cells	"Competence factor" for cell growth Mitogenesis, MAPK activation NOS expression, PGE ₂ release NF- κ B-dependent MCP-1 induction	264 299 134 184
EGF	H ₂ O ₂ Unspecified H ₂ O ₂ Unspecified O ₂ [.] H ₂ O ₂ H ₂ O ₂	Unknown Unknown Unknown Flavoprotein oxidase Lipoxygenase Unknown Unknown Unknown	Epidermoid carcinoma HaCaT cell line Hepatocytes Human keratinocytes PC12 Rat mammary CA cells Mouse epidermal cells Smooth muscle cells Chondrocytes Lung fibroblasts 3T3 L1-preadipocytes	Tyrosine phosphorylation, cell growth JNK activation Carcinogenesis PLA ₂ , MAPK activation Cell growth Enhanced metastasis p70 ^{SGK} activation HB-EGF autoinduction Induction of c-Fos Mitogenesis Adipocyte differentiation	27, 174 17 71 90 196 204 23 133 176 292 143
HB-EGF	H ₂ O ₂	Unknown			
FGF-2	H ₂ O ₂	Flavoprotein oxidase			
IGF-I	H ₂ O ₂	Plasma membrane oxidase			
HGF	H ₂ O ₂	Unknown	Sarcoma cells	Apoptosis	13
<i>Receptor serine/threonine kinases</i>					
TGF- β 1	H ₂ O ₂ H ₂ O ₂	Unknown Unknown Suppression of AOE NADH oxidase Unknown Suppression of AOE Unknown	Mouse osteoblasts Endothelial cells Rat hepatocytes Lung fibroblasts Hepatocytes Pancreatic beta cells Hepatic stellate cells	Growth inhibition; erg-1 induction Growth inhibition Growth inhibition Unknown Apoptosis Apoptosis $\alpha_1(I)$ procollagen, TGF- β induction	216, 265 58, 294 132 290, 293 251, 252 123 59, 83
<i>G protein-coupled receptors</i>					
Angiotensin II	O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ O ₂ [.] O ₂ [.] H ₂ O ₂	NAD(P)H oxidase, p22 ^{phox} Unknown Flavoprotein oxidase PLD-dependent oxidase	Smooth muscle cells Proximal tubule cells Mesangial cells Smooth muscle cells	Cell hypertrophy, p38 activation p27 ^{Kip1} , cell hypertrophy Cell hypertrophy Proliferation/hypertrophy	97, 301, 322 104 125 297
Serotonin	O ₂ [.] OH [.]	NAD(P)H oxidase 5-HT transporter dependent	Smooth muscle cells Rat striatal tissue	ERK activation, proliferation 5-HT depletion	158, 159 262
Bradykinin	O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ O ₂ [.]	Cyclooxygenase Unknown, Ca ²⁺ dependent	Endothelial cells Human keratinocytes	Unknown Unknown	114, 282 89
Thrombin	O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂	NAD(P)H-like enzyme	Endothelial cells	Unknown	113
Endothelin	O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂	NAD(P)H oxidase, p47 ^{phox}	Smooth muscle cells	Cell growth, p38 activation	223, 236
Glutamate	H ₂ O ₂	Unknown	Cardiac myocytes	c-Fos induction	50
<i>Ion channel-linked receptors</i>					
Acetylcholine	H ₂ O ₂	Mitochondria, Zn ²⁺ dependent	Rat cerebral cortex Neurons	Unknown Unknown	35 261
		Mitochondria	Cardiomyocytes	Preconditioning	317

ROS, reactive oxygen species; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; CSF-1, colony-stimulating factor-1; NF- κ B, nuclear factor- κ B; IL, interleukin; HSP27, 27-kDa heat shock protein; COX-2, cyclooxygenase-2; IFN- γ , interferon- γ ; PDGF, platelet-derived growth factor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NOS, nitric oxide synthase; EGF, epidermal growth factor; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; PLA₂, phospholipase A₂; HB-EGF, heparin-bound EGF; FGF-2, fibroblast growth factor-2; IGF-I, insulin growth factor I; HGF, hepatocyte growth factor; TGF, transforming growth factor; AOE, antioxidative enzyme; PLD, phospholipase D; 5-HT, 5-hydroxytryptamine (serotonin); ERK, extracellular signal-regulated kinase.

1.1.2.4 Autres sources enzymatiques et non-enzymatiques

Les **cyclooxygénases** sont des enzymes hémiques ; elles fonctionnent comme des peroxydases. Les **lipoxygénases** portent du fer non hémique, fixent O₂ sur l'électron non apparié d'un radical libre, catalysent la peroxydation d'acides gras poly-insaturés à 20 carbones sur des sites bien définis et produisent des hydroperoxydes (Deby 2009a).

Les **xanthine-oxydoréductases** portent du molybdène au site actif et ont deux formes convertibles l'une dans l'autre: la **xanthine déshydrogénase** (XDH) et la **xanthine oxydase** (XO), désignées ensemble "xanthine-oxydoréductases" (**XOR**). Elles oxydent l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique (Dröge 2002). XDH transfère les deux électrons ainsi arrachés sur deux molécules NADP⁺ et régénère NADPH. Par contre, à la manière de Nox, XO transfère chacun de ces deux électrons sur une molécule O₂ qu'elle réduit en O₂^{•-} (Dröge 2002). Les XOR sont impliquées dans les affections cardiovasculaires associées aux ROS. La pression partielle d'O₂ et la quantité de 'NO disponible seraient les principaux régulateurs de leur expression et de leur activité (Deby 2009a).

En présence des ROS issues des ions ferryles, l'**hémoglobine** s'active en Cd I et peut initier des réactions peroxydasiques délétères. Les **flavines** fixent O₂ et le réduisent en O₂^{•-}. L'addition des protons produit la **peroxyflavine** qui peut libérer H₂O₂. Les **ptéridines** fixent deux molécules O₂ et produisent deux anions O₂^{•-}. Les **métaux de transition** (Fe, Cu) peuvent théoriquement activer O₂. Toutefois, *in vivo*, une telle activation est peu probable, car ces métaux ne sont pas à l'état libre. Les **peroxysomes**, présents dans toutes les cellules eucaryotes, où ils assurent leur détoxication, contiennent des enzymes oxydantes (Deby 2009a).

1.1.3 Les principales ROS biologiques

1.1.3.1 L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

$O_2^{\cdot-}$ est un point d'entrée dans la cascade de production des ROS (Serteyn et al. 2002). En milieu aqueux et à pH physiologique ($\approx 7,4$), sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes) car la SOD accélère sa dismutation spontanée en O_2 et H_2O_2 . En milieu aprotique, il survit un peu plus longtemps, peut diffuser à travers la membrane cellulaire, s'y accumuler, y cliver les liaisons esters des phospholipides (activité "phospholipase like"), induire une lyse cellulaire et former p. ex. des radicaux peroxyles ROO^{\cdot} .

$O_2^{\cdot-}$ est nucléophile. Il arrache ou accepte des protons (H^+). À $pH < 5$, rare dans la cellule mais probable dans les phagosomes, il peut fixer H^+ et former HO_2^{\cdot} . Son potentiel rédox étant négatif ($E_0 = -0.33$ V ; Serteyn et al. 2002), il est un **réducteur efficace** et cède un électron à une série de molécules et de cations métalliques. Il réduit le fer ferrique (Fe^{3+}) stocké dans la ferritine en fer ferreux (Fe^{2+}) et permet de le libérer (Serteyn et al. 2002, Deby 2009a).

1.1.3.2 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

H_2O_2 n'est pas radicalaire. Son potentiel rédox est positif ($E_0 = +0.66$ V). En absence de peroxydases et des métaux de transition, il est assez stable, peut diffuser à partir de son site de production et exister quelques minutes. La MPO et l'éosinophile peroxydase l'utilisent pour produire des dérivés halogénés très réactifs, dont HOCl (Serteyn et al. 2002 ; Deby 2009a).

1.1.3.3 L'acide hypochloreux (HOCl)

Il est spécifiquement produit par la MPO et l'éosinophile peroxydase à partir de H_2O_2 et de Cl^- (Deby-Dupont et al. 1999). La molécule est stable ($E_0 = +1,4$ V) ; c'est un puissant bactéricide indispensable dans la lutte anti-infectieuse. Cependant, il oxyde les structures biologiques (lipides, protéines, fonctions amines) et forme des dérivés comme les sulfoxydes, les aldéhydes, les chloramines, etc. Par les effets toxiques de ces dérivés, HOCl est impliqué dans la carcinogenèse (Serteyn et al. 2002). Il réagit également avec les nitrites et les peroxynitrites et produit des intermédiaires instables ($NOCl$, NO_2Cl) qui forment d'autres espèces réactives ($^{\cdot}NO$, $^{\cdot}NO_2$ et $^{\cdot}Cl$; Fig. 9) capables de nitrosation, de nitration et de chloration.

1.1.3.4 Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

Il pourrait se former lors la décomposition du peroxynitrite ($\text{ONOOH} \rightarrow \text{NO}_2^\cdot \dots \cdot\text{OH}$) ou lors de la « réaction de Fenton », très peu probable *in vivo*, entre H_2O_2 et un métal de transition complexé à un ligand activateur :



Il est très fugace et attaque toutes les molécules, il hydroxyle les cycles aromatiques et initie des cycles de lipoperoxydation. Sa courte durée de vie limite ses dégâts potentiels (Serteyn et al. 2002).

1.1.3.5 L'oxyde nitrique ($\cdot\text{NO}$; monoxyde d'azote)

Il diffuse rapidement à partir de son site de production, traverse la membrane cellulaire et remplit un rôle vasodilatateur. Il est un second messager de courte vie (Serteyn et al. 2002, Hobbs et al. 1999, Alderton et al. 2001, Deby 2009), réagit très rapidement avec $\text{O}_2^\cdot-$ pour former ONOO^- et avec O_2 pour former N_2O_4 (Deby 2009a). C'est un oxydant faible ($E_0 = +0.39$ V; Serteyn et al. 2002), incapable de nitration, mais un bon agent de nitrosation s'il a un cofacteur approprié pour recevoir un électron. Fixé au Fe^{3+} des molécules hémiques, il peut nitroser des phénols, des thiols et des acides aminés (Serteyn et al. 2002).

1.1.3.6 Le peroxynitrite (ONOO^-)

ONOO^- est non radicalaire, instable (durée de vie < une seconde) et très oxydant ($E_0 = +1.4$ V, comme HOCl ; Serteyn et al. 2002). Sa formation ($\cdot\text{NO} + \text{O}_2^\cdot- \rightarrow \text{ONOO}^-$) est endothermique et aurait lieu dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les mitochondries, mais son précurseur $\text{O}_2^\cdot-$ dismute sans longtemps exister (Serteyn et al. 2002 ; Deby 2009a).

Au pH physiologique, il est en équilibre avec son acide conjugué, ONOOH .



Il se transforme rapidement en nitrites et en nitrates et se décompose en dérivés radicalaires ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$). Ses réactions avec les biomolécules (principalement des nitrations et des hydroxylations) sont agressives et délétères : attaque des fonctions thiols, des lipides, des

bases nucléiques, des fonctions amines sur les protéines, et de beaucoup d'autres molécules de petite taille (urate, ascorbate, etc). ONOO^- attaque les sites à métaux de transition (enzymes hémiques, hémoglobine, Mn/Cu/Zn SOD), nitre les cycles aromatiques (tyrosine, tryptophane) et par là les enzymes dont le site actif porte un résidu tyrosyle. La réaction de ONOO^- avec le CO_2 produit du peroxynitrosocarboxylate (ONOOCO_2^-) dont les dérivés ($\cdot\text{NO}_2$ et $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ou NO_3 et CO_2) augmentent les événements de nitration (Serteyn et al. 2002 ; Deby 2009a).

1.1.3.7 Le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet)

NO_2^\bullet , abondant dans les polluants de l'atmosphère des villes, se formerait aussi *in vivo* par réaction entre $\cdot\text{NO}$ et O_2 .



NO_2^\bullet attaque les doubles liaisons des acides gras non-saturés (acide linoléique 18:2 ω 6 ; α -linolénique 18:3 ω 3 et γ -linolénique 18:3 ω 6 ; acide arachidonique 20:4 ω 6) et transforme ces acides soit de *cis*- en *trans*, soit par nitration. Des lipoxygénases transforment l'acide arachidonique en eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, etc), qui sont des messagers intra- et extracellulaires indispensables. Les dérivés nitrés de l'acide arachidonique seraient également des messagers bioactifs.

NO_2^\bullet s'additionnerait aux doubles liaisons d'autres molécules, arracherait soit un H soit un électron aux molécules voisines. Ces réactions créent des radicaux libres. Comme $\text{O}_2^\bullet-$, NO_2^\bullet peut exister assez longtemps dans les espaces intramembranaires aprotiques (Deby 2009a).

1.1.3.8 Autres formes de ROS

La formation de l'**oxygène singulet** (${}^1\text{O}_2$) à partir du triplet ${}^3\text{O}_2$ exige l'inversion d'un des spins des deux électrons célibataires de ${}^3\text{O}_2$. Cette inversion est endothermique (22 Kcal) et peu vraisemblable *in vivo*. La formation de l'**ozone** (O_3) exige 69 Kcal et n'a pas lieu *in vivo*, mais dans l'atmosphère suite aux rayons UV et aux étincelles électriques (Deby 2009a).

1.1.4 Les activités biologiques des ROS

1.1.4.1 Régulation de la vasodilatation ($\cdot\text{NO}$), d'activités enzymatiques et de fonctions physiologiques

$\cdot\text{NO}$ régule la vasodilatation par l'entremise de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) dont il contrôle la production. La guanylate cyclase soluble (sGC) est une protéine hémique hétérodimérique qui catalyse la formation de cGMP, un second messager et un amplificateur cellulaire dans beaucoup de réponses physiologiques. La fixation de $\cdot\text{NO}$ sur les groupes hémiques à Fe^{2+} de sGC provoque sur Fe^{2+} un changement de conformation qui active sGC et lui permet de produire cGMP (Beck et al. 1999 ; Valko et al. 2007).

Comme second messager, cGMP régule le fonctionnement des canaux ioniques, module l'activité des phosphodiésterases et des protéine kinases cGMP-dépendantes qui ont un site de liaison pour elle. Sa fixation ouvre les canaux calciques et module entre autres le fonctionnement de l'odorat et de la vue. Les phosphodiésterases régulent les activités de cAMP et cGMP et modulent par elles la cascade d'événements situés en aval (Beck et al. 1999).

1.1.4.2 Modulation de la signalisation cellulaire

Les ROS interagissent avec des molécules qui interviennent dans la transduction du signal. Leurs cibles sont généralement des molécules membranaires comme les récepteurs et les phospholipides, les protéines du cytosol associées aux récepteurs, les protéines adaptatrices et effectrices, les enzymes, les cascades de la transduction, les facteurs nucléaires, le noyau, son ADN et ses protéines (Serteyn et al. 2002).

Les effets des ROS sur leurs molécules cibles s'expliquent entre autres par la **perturbation de l'état rédox du milieu cellulaire** et par les **altérations de la structure et des fonctions** des protéines dues aux ROS. Selon la cellule cible, leurs effets sont soit activateurs, soit inhibiteurs (Serteyn et al. 2002; Valko et al. 2007).

1.1.4.3 Modulation des facteurs de transcription et de l'expression des gènes

Les facteurs de transcription particulièrement sensibles aux variations de l'état rédox de la cellule sont les cibles privilégiées de cet effet des ROS (Beck et al. 1999; Serteyn et al. 2002).

- Dans les lymphocytes T, la protéine activatrice **AP-1** (AP pour *activating protein*) est impliquée dans l'expression des gènes codant pour des protéines à fonction immunitaire et pour IL-2. Les stimuli induisant une agression oxydante activent AP-1 (Dröge 2002).
- **NF-κB** est impliqué dans l'expression du gène codant pour IL-2 et dans des réponses biologiques comme la réaction inflammatoire, le contrôle de la croissance cellulaire et l'apoptose. Il est souvent le premier facteur de transcription qui répond directement à une agression oxydante. Les ROS participent à son activation (Dröge 2002).
- **p53** remplit un rôle majeur dans la protection de la cellule contre la genèse des tumeurs en initiant l'apoptose dès que la cellule est endommagée (fonction de « tumor suppressor »). Dans son domaine central, il porte plusieurs résidus cystéine qui contrôlent sa fixation sur une séquence spécifique dans l'ADN. Il induit l'expression de **p85** qui sert à la signalisation lors de l'apoptose p53-dépendante. À faible concentration des ROS, la quantité de **p53** est minime et induit l'expression des gènes codant pour des AOX endogènes; à forte concentration des ROS, elle devient élevée et induit l'expression des gènes codant pour des composés qui accélèrent la formation des ROS et l'apoptose (Valko et al. 2007).

1.1.4.4 Rôle dans l'apoptose

L'apoptose joue un rôle indispensable dans le développement et l'homéostasie d'organismes multicellulaires. L'implication des ROS dépend des voies de signalisation qu'elles activent (Dröge 2002). Dans beaucoup de cellules cancéreuses, TNF- α induit la production mitochondriale des ROS. Celle-ci induit la perméabilisation des pores mitochondriaux de transition (Murphy 2009) et la translocation du cytochrome c mitochondrial dans le cytosol. Ces événements, associés à l'activation des caspases-3 et -9, initient l'apoptose de manière irréversible (Wang et al. 1999; Soobrattee et al. 2005).

1.1.5 Effets délétères des ROS sur la santé

À faible concentration, les ROS sont des « seconds messagers ». À concentration élevée, leurs effets deviennent délétères pour les cellules, les tissus et diverses fonctions physiologiques. Les effets néfastes des ROS sont associés aux perturbations du statut rédox, à la modulation de la signalisation cellulaire et de l'expression des gènes, mais aussi à leur interaction avec les biomolécules de grande importance (l'ADN, les lipides, les protéines et les polysaccharides).

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), qui est à l'origine de nombreuses ROS, est un réducteur peu réactif ; sa dismutation spontanée en O_2 et H_2O_2 est rapide, et même accélérée par la SOD. Par contre, le radical hydroxyle ($\cdot OH$) est très réactif et illustre bien les interactions entre les ROS et les molécules biologiques. Cependant, sa propre diffusion limite sa capacité de nuire aux biomolécules: $\cdot OH$ a une durée de vie $< 1 \mu s$ et ne parcourt pas de distances $> 10 \text{ nm}$ (Jacob 1995 ; Gardès-Albert et al. 2003).

1.1.5.1 Attaques sur l'ADN : effets mutagènes et carcinogènes

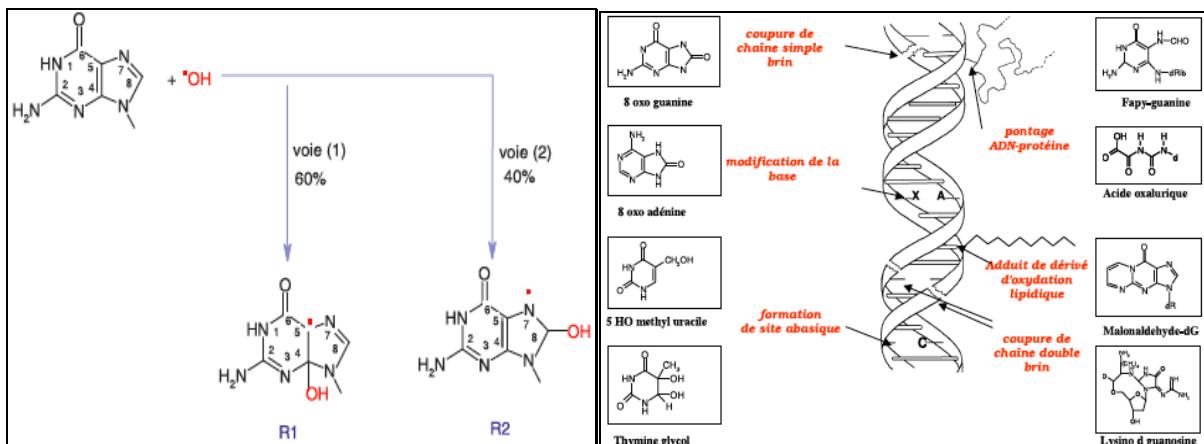
Les ROS attaquent l'ADN nucléaire et mitochondrial au niveau des bases azotées, qui sont très sensibles à l'oxydation. Le radical $\cdot OH$ s'additionne sur les doubles liaisons de ces bases généralement en C5 ou C8 et les oxyde. Un taux élevé de 8-oxo-guanine est un des principaux marqueurs d'agression oxydante dans l'ADN (Gardès-Albert et al. 2003).

L'attaque peut aussi porter soit sur la liaison située entre la base et le désoxyribose, exciser la base et former des sites abasiques, soit sur le sucre et provoquer une coupure de chaîne simple brin (Favier 2003). Des aldéhydes mutagènes produits par la peroxydation lipidique forment des adduits sur les bases nucléiques. Les histones interagissent avec l'ADN pour le protéger, les enzymes et facteurs de réPLICATION pour le lire, tout comme les facteurs de transcription pour synthétiser l'ARN. Leur attaque par les ROS entraîne la formation d'adduits sur les bases, le pontage entre protéines, la formation des ponts intercaténaires et des lésions subséquentes sur l'ADN (Fig. 10; Favier 2003, Valko et al. 2007). Les lésions non réparées, les mutations et l'altération de l'expression des gènes qui en découlent initient la carcinogenèse.

La croissance cellulaire est le résultat de mécanismes finement régulés par la signalisation cellulaire. En perturbant l'état rédox du milieu biologique, les ROS affectent la régulation de

cette signalisation et provoquent des altérations susceptibles d'initier la **formation des tumeurs** (Valko et al. 2007).

Fig. 10: Addition de $\cdot\text{OH}$ sur les bases nucléiques (cadran gauche) et lésions de l'ADN par oxydation des bases (cadran droit) (Gardès-Albert et al. 2003; Favier 2003)



Des systèmes perfectionnés assurent la réparation des lésions de l'ADN par excision des bases et/ou des nucléotides, par correction des « misappariements » (Baudin 2006) et par recombinaison (Gardès-Albert et al. 2003; Baudin 2006). Leur déficience et/ou une surcharge de lésions perturbent la réPLICATION : soit copier l'ADN devient impossible et le mécanisme d'**apoptose** se déclenche, soit des polymérasées peu rigoureuses lisent et synthétisent un ADN altéré, avec pour résultat une **mutation du génome**. Celle-ci, d'abord ponctuelle, se multiplie en des transversions des paires « guanine-cytosine » vers « thymine-adénine », et peut initier la **carcinogenèse** (Favier 2003 ; Valko et al. 2007).

La production des ROS dans les spermes a été associée à une baisse de motilité des spermes, de leur capacité de fusionner avec l'ovocyte et de le féconder (Griveau et Le Lannou 1997).

1.1.5.2 Effets sur les polysaccharides

Aux conditions physiologiques, le glucose s'oxyde en présence des traces métalliques et forme des cétoaldéhydes, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ (Favier 2003) et $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Dröge 2002). Les cétoaldéhydes se fixent aux protéines et forment des protéines « **glyquées** ». Les produits finals de glycation avancée des protéines (**AGEs**, de l'anglais « *Advanced Glycation Endproducts* ») caractérisent le plasma des **patients diabétiques** et contribuent à la fragilité de leur endothélium et de leur rétine (Dröge 2002; Favier 2003; Defraigne 2005; Houstis et al. 2006). Les dérivés de l'oxydation du glucose peuvent également cliver les protéines. Les ROS

attaquent les mucopolysaccharides, notamment les protéoglycans du cartilage (Favier 2003; Baudin 2006).

1.1.5.3 Oxydation et altération des protéines, perturbation des fonctions enzymatiques

Les ROS oxydent les résidus amino-acides responsables des activités des protéines, agissent sur les centres Fe-S de ces protéines ou sur les métaux qu'elles complexent. De cette manière, elles altèrent les structures des protéines, entre autres en les dimérisant, et perturbent leurs fonctions (Di Simplicio et al. 1991 ; Hunt et Wolff 1991 ; Thannickal et Fanburg 2000). Les protéines les plus sensibles à ces modifications sont celles qui portent une fonction sulfhydryle (-SH) : des enzymes, des protéines de transport, etc. La cystéine est oxydée en cystine ou en acide cystéique, la méthionine en sulfoxyde ou en sulfone.

Les acides aminés basiques sont transformés en dérivés carbonylés ou hydroxylés ; la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine, aromatiques, deviennent respectivement *o*-hydroxytyrosine, cynurénine et 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA). La tyrosine subit également la nitration (Baudin 2006). Dans le cytosol, les protéines modifiées sont reconnues par le système d'ubiquitination et éliminées dans le protéasome. Dans le milieu extracellulaire, les cellules phagocytaires qui ont des récepteurs membranaires aux "AGEs" (RAGE) reconnaissent les protéines modifiées et les phagocytent (Baudin 2006). À défaut, soit les protéines modifiées perdent leurs groupements amines, soit elles extériorisent leurs zones hydrophobes centrales, deviennent hydrophobes et forment des amas. L'association de ces amas aux lipides forme des dépôts de lipofuchsine caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier 2003).

1.1.5.4 Oxydation des lipides, des lipoprotéines et du cholestérol

La peroxydation des lipides forme des hydroperoxydes qui se décomposent en aldéhydes ou en composés volatils de courte chaîne (méthane, éthylène, pentane), des diènes conjugués, des radicaux peroxyyles et hydroperoxyyles, des peroxydes cycliques, des isoprostanes, etc. Elle joue un rôle capital dans la pathogenèse de l'**athérosclérose**. Le malondialdéhyde (MDA) et l'hydroxynonénal sont bien connus pour leur toxicité et leurs propriétés **carcinogènes**. L'oxydation du cholestérol forme de l'oxystérol.

Lorsque des lipoprotéines (surtout les LDL) traversent la membrane de la cellule endothéliale suite à un disfonctionnement de l'endothélium (p. ex. dû à une augmentation de perméabilité) ou par défaut des récepteurs aux LDL et parviennent à l'intérieur de cette cellule, elles sont oxydées par les lipoxygénases. Les ROS produites induisent l'expression des protéine kinases comme les kinases d'adhésion focale, des molécules d'adhésion intercellulaires comme ICAM-1 (Dröge 2002), des chimiokines, des cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs de l'inflammation (Libby et al. 2002). Sur la paroi endothéliale, les molécules d'adhésion, dont la concentration augmente rapidement, ralentissent les monocytes circulants, induisent leur adhésion et les activent. Cet événement déclenche une réaction inflammatoire et produit des ROS qui poursuivent l'oxydation des LDL (Dröge 2002 ; Libby et al. 2002 ; Baudin 2006) : soit les produits de l'oxydation des LDL adhèrent aux protéoglycans subendothéliaux, soit ils sont complètement phagocytés par les macrophages grâce à leurs récepteurs « scavenger » (Baudin 2006).

La fixation des LDL oxydées sur ces récepteurs active les monocytes, les macrophages, et stimule l'expression de la Mn-SOD, dont l'activité augmente la concentration de H_2O_2 et perturbe l'état redox. Cette cascade d'événements entraîne une apoptose massive des macrophages et participe à la formation des lésions dues à l'athérosclérose (Dröge 2002).

Si le système d'élimination des LDL oxydées est débordé, les macrophages se transforment en cellules spumeuses, s'accumulent, épaisissent l'intima, développent une plaque d'athérome et amplifient la réaction inflammatoire sous la participation des lymphocytes, des plaquettes et des cellules musculaires lisses (Libby et al. 2002; Dröge 2002 ; Cathcart 2004 ; Baudin 2006). HOCl et ses dérivés ont été associés à des maladies inflammatoires aiguës (chloration et nitrification de la tyrosine) et à la formation des plaques athéromateuses par chloration du cholestérol (Serteyn et al. 2002).

1.1.5.5 Implications dans d'autres pathologies

L'étiologie de la **maladie d'Alzheimer** implique une accumulation du peptide β -amyloïde, lequel induit l'oxydation des biomolécules et une production accrue des ROS (Butterfield et al. 2001) qui accélèrent la pathogenèse (Benzi et Moretti 1995 ; Stadtman et Berlett 1997). Les iNOS pourraient être impliquées dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, car dans les astrocytes, le peptide β -amyloïde, un composant majeur de la plaque amyloïde, entretient une synergie avec les cytokines pro-inflammatoires et induit avec elles l'expression des iNOS via un mécanisme dépendant de NF- κ B (Hobbs et al. 1999).

Les effets délétères des ROS sur l'ADN, les lipides et les protéines s'accumulent dans le temps. Les mécanismes très perfectionnés de réparation de l'ADN seraient beaucoup plus efficaces dans le noyau que dans la mitochondrie. L'accumulation des lésions sur l'ADN mitochondrial affaiblirait les mitochondries, provoquerait la mort cellulaire et le **vieillissement de l'organisme**. Les dérivés de l'oxydation des protéines joueraient également un rôle dans ce processus (Valko et al. 2007). Dans l'ADN, les télomères sont indispensables pour maintenir l'intégrité du génome. Ils sont associés à plusieurs protéines vulnérables à l'attaque des ROS, et dont le disfonctionnement jouerait un rôle dans le vieillissement cellulaire et le développement du cancer (Valko et al. 2007).

Les ROS sont associées à la genèse et au développement d'autres pathologies encore. Cependant, le vieillissement est un processus complexe et multifactoriel. Les lésions sur l'ADN et les altérations des protéines ne sauraient expliquer à elles seules tous les changements physiologiques et pathologiques observés lors du vieillissement (Dröge 2002 ; Valko et al. 2007). Cette réserve est également de mise pour d'autres pathologies auxquelles les ROS seraient associées. L'agression oxydante affecte une cascade d'événements biochimiques et physiologiques. Déterminer avec précision la part de responsabilité des ROS exige de bien distinguer d'une part l'étendue de l'agression oxydante et de ses effets délétères, d'autre part toutes les autres composantes de la cascade, surtout celles qui initieraient la production des ROS. Sous cette condition, on distingueraient les pathologies où les ROS sont cause (les lésions d'ADN dues aux ROS et le carcinome subséquent, etc), celles où elles sont conséquence, et celles où elles sont à la fois cause et conséquence (Valko et al. 2007).

1.1.6 Mise en évidence des ROS

Il est nécessaire de pouvoir mettre une agression oxydante en évidence et de mesurer la concentration des ROS qu'elle produit pour comprendre son rôle dans les diverses pathologies auxquelles elle est associée, et évaluer l'efficacité des traitements et régimes alimentaires antioxydants.

De nombreuses techniques sont disponibles (Favier 2002). Toutefois, la mise en évidence des ROS est confrontée à diverses difficultés, dont une des plus grandes est que les ROS ont une demi-vie très courte (Tab. 5); par conséquent, leur dosage direct est difficile.

Tab. 5 : Demi-vie des principales ROS biologiques (Jacob 1995)

Species	Common name	Half-life (37 °C)
HO^{\cdot}	Hydroxyl radical	1 nanosecond
HO_2^{\cdot}	Hydroperoxyl radical	unstable
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxide anion radical	enzymatic
${}^1\text{O}_2$	Singlet oxygen	1 microsecond
RO^{\cdot}	Alkoxy radical	1 microsecond
ROO^{\cdot}	Peroxy radical	7 seconds
NO^{\cdot}	Nitric oxide radical	1 – 10 seconds
H_2O_2	Hydrogen peroxide	stable
HOCl	Hypochlorous acid	stable
R = lipid, for example, linoleate		

Par contre, il est possible de mesurer des marqueurs spécifiques des ROS. Mais en milieu biologique, leur mesure peut être sujette à des artefacts dus à des espèces à réactivité semblable à celle des ROS, ou à des composés intermédiaires formés par l'échantillon analysé (Turrens 2003). En plus, certains réactifs de révélation des ROS peuvent enclencher un « *redox cycling* » (Rota et al. 1999). Ainsi, il serait utile de combiner plusieurs méthodes dont chacune mettrait à profit une source ou une propriété particulière de la ROS étudiée (Turrens 2003).

1.2 Les antioxydants (AOX) naturels

1.2.1 Notions préliminaires

La notion fondamentale d'AOX a été évoquée dans l'avant-propos. Les AOX neutralisent les espèces réactives en leur transférant un électron ou un atome H[•] (Rive-Evans et al. 1996 ; Prior et al. 2005). Une telle activité neutralisant directement une espèce réactive, est de type **stœchiométrique** (Deby 2009a). Les AOX agissent également en chélatant des ions métalliques (Fe, Cu etc) qui initieraient une chaîne d'oxydation (Rajalakshmi et al. 1996) et en régénérant d'autres AOX à partir de leur forme oxydée. À l'interface entre une phase aqueuse et une phase lipidique, l'ascorbate régénère le tocophérol (Niki 1995).

Les AOX participent aux réactions redox, maintiennent dans le milieu biologique un statut redox stable favorable à leur propre activité et à celle de nombreuses enzymes et cellules, mais défavorable pour d'autres. Ils modulent par là l'activité de diverses enzymes (Kim et al. 2004). Quand la modulation est défavorable à l'activité catalytique d'une enzyme, l'activité AOX est de type **anticatalytique** (Deby 2009a). C'est à ce titre que dans la prévention et le traitement des pathologies liées aux ROS, les enzymes oxydantes sont prises comme cible thérapeutique pour contrôler la production des ROS (Serteyn 2003; Malle et al. 2007). Les AOX peuvent développer une synergie entre eux (Vit E et Vit C) (St Angelo 1996). Mais dans certaines conditions, un effet antagoniste n'est pas exclu (Jørgensen 1998).

Il existe une multitude d'AOX naturels, endogènes et exogènes à l'organisme humain, que l'on répartit en différentes classes chimiques. On y compte des éléments inorganiques (Se), des amino-acides (L-histidine), des peptides (glutathion), des protéines (albumine), des vitamines (par exemple la Vit C et la Vit E), les caroténoïdes, les polyphénols (les phytostérols, les phytoœstrogènes, les stilbènes, les flavonoïdes, les lignanes etc..), les inhibiteurs de protéases etc... (Anand et al 2008).

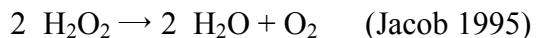
Notre travail s'intéresse essentiellement aux polyphénols de quelques plantes alimentaires du Bas-Congo et à leur activité AOX *in vitro*. Nous développerons principalement les polyphénols dérivés du benzophénol, des acides phénols et les flavonoïdes, et parlerons assez brièvement de la vitamine C, de la vitamine E et des caroténoïdes. Auparavant, nous évoquerons quelques-uns des nombreux AOX endogènes.

1.2.2 Les principaux antioxydants endogènes

Les AOX endogènes sont nombreux, soit enzymatiques, soit non enzymatiques.

➤ *Les antioxydants endogènes enzymatiques*

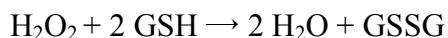
- La **catalase** transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.



- La dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène beaucoup plus stables et moins réactifs, est spontanée. Cependant, elle est accélérée par la **superoxyde dismutase (SOD)**.



- La **glutathion peroxydase Se - dépendante (GPx)** : Le glutathion est un tripeptide (γ -glutamylcystéinylglycine). Dans la structure de la GPx, un atome de sélénum (Se) remplace l'atome de soufre du groupe thiol (-SH) de la cystéine. L'enzyme catalyse notamment la transformation du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes de type lipidique (ROOH) :



- La **GSH réductase** regénère le glutathion dans sa forme active en transférant deux électrons sur le disulfure GS-SG (glutathion oxydé):



- Les **glutathion -S -transférases** : détoxifient les produits de la peroxydation comme les aldéhydes (Deby 2009a).

➤ *Les antioxydants endogènes non enzymatiques*

- Les **réducteurs physiologiques** NAD(P)H, FADH₂, FMNH₂ et CoQ regénèrent à l'état réduit les partenaires oxydés des couples rédox.
- Les **thioredoxines** sont des protéines à site actif dithiolé. Elles sont donneuses universelles d'atomes H, fournissent des électrons aux disulfures oxydés et les régénèrent dans leur forme active.
- La **N-acétylcystéine** porte également un groupe thiol (-SH) réducteur.
- Les **protéines thiols** développent un effet réducteur par leur groupe -SH (ex. Glutathion).
- L'**albumine** est un des AOX circulants les plus abondants. Elle dispose de nombreux sites pour fixer des ligands, notamment des cations métalliques. Elle contient un groupe cystéinyle réduit, par lequel elle fixe les radicaux hydroxyles (Roche et al. 2008).
- La **bilirubine**, métabolite liposoluble du catabolisme de l'hème, développe des activités anti-radicalaires (Minetti et al. 1998).
- La **transferrine** transporte le fer à travers l'organisme, la **ferritine** le stocke. L'une et l'autre sequestrent ce métal de transition dans des poches hydrophobes d'accès difficile. Ainsi, elles empêchent le fer de déclencher une chaîne d'oxydation. La **myoglobine** remplit cette propriété pour le fer dans le muscle, et la **céruloplasmine** pour le cation de cuivre.
- Le **sélénium** est un cofacteur de beaucoup d'enzymes à activité antioxydante (Jacob 1995; Minetti et al. 1998; Roche et al. 2008).

Beaucoup d'autres substances endogènes à l'organisme humain remplissent directement ou indirectement un rôle antioxydant (urate, mélatonine, acide dihydrolipoïque etc) (Jacob 1995).

1.2.3 Les polyphénols dérivés du benzophénol et des acides phénols

Les polyphénols sont constitués d'au moins un noyau aromatique portant au moins deux fonctions phénols. Parmi eux, les dérivés du benzophénol et des acides phénols se caractérisent par le squelette de base décrit dans le tableau 6.

Tab. 6: Squelettes de base, classes et exemples des polyphénols dérivés du benzophénol et des acides phénols

Le composé de base et son squelette	Exemple
Benzophénol (C6)	Pyrogallol (1, 2,3-trihydroxybenzene)
L'acide benzoïque (C6-C1)	Acide gallique (= acide 3,4,5- trihydroxybenzoïque)
L'acide cinnamique (C6-C3)	Acide caféïque (= acide 3,4- dihydroxycinnamique)

1.2.3.1 Les polyphénols dérivés du benzophénol

Ce sont des acides faibles. Ils peuvent libérer un proton et former des liaisons intra- et intermoléculaires (Hard 1989). Grâce à sa structure "*o*-dihydroxy", le catéchol peut chélater un ion métallique ; le pyrogallol a trois groupes hydroxyles qui se suivent et peut chélater un ion métallique de plus que le catéchol (Tab. 7).

Tab. 7: Quelques exemples de polyphénols dérivés du benzophénol

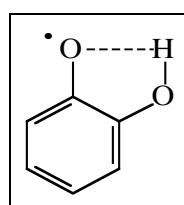
Le benzophénol	R2	R3	R4	Composé
	OH	H	H	Catéchol (<i>o</i> -dihydroxyphénol)
	H	OH	H	Résorcinol (<i>m</i> -dihydroxyphénol)
	H	H	OH	Hydroquinone (<i>p</i> -dihydroxyphénol)
	OH	OH	H	Pyrogallol

➤ Critères d'activité AOX des polyphénols dérivés du benzophénol

- L'efficacité de l'activité AOX dépend de la stabilité du radical phénoxyle qui se forme après la réaction du composé de base. Les doubles liaisons conjuguées délocalisent l'électron célibataire et créent une résonance qui stabilise le radical phénoxyle.

- Par contre, cette activité est inversement proportionnelle à l'énergie de dissociation nécessaire pour arracher l'atome H de son groupe phénol (Jørgensen 1998).
- La substitution sur le noyau influence aussi l'activité AOX. Il faut au moins deux fonctions phénols; le benzophénol lui-même, n'en ayant qu'une seule, ne développe pas d'activité AOX. Une deuxième fonction phénol en position *o*- stabilise le radical et permet d'établir une liaison H intramoléculaire (Fig. 11) (Shahidi et al. 1992).

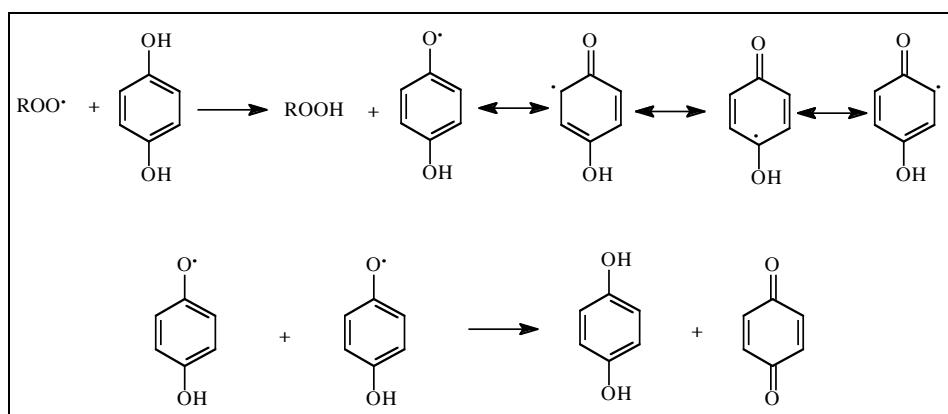
Fig. 11: Stabilisation du radical du cathéchol par un pont H intramoléculaire (Shahidi et al. 1992)



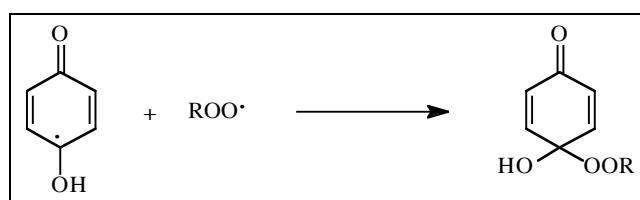
- En position *p*-, la deuxième fonction phénol forme un radical semiquinoyle intermédiaire et stable, capable de neutraliser un deuxième radical (semiquinoyle ou peroxyde), de régénérer la molécule de base (Fig. 12a) ou de former des adduits stables (Fig. 12b) (Shahidi et al. 1992).

Fig. 12a-b : Mécanismes de réaction de *p*-dihydroxybenzophénol :

12a : Formation, stabilisation et réaction du radical semiquinoyle



12b : Formation d'adduits stables



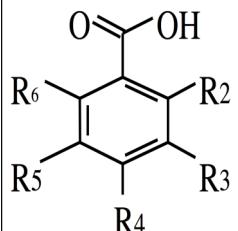
- La substitution d'un groupe phénol en position *o*- par un reste méthoxy- rend impossible la liaison H intramoléculaire, affaiblit la stabilité du radical et l'activité AOX (p. ex. guaiacol i.e. 2-methoxyphénol *vs.* catéchol) (Shahidi 1992 ; Rice-Evans 1996).
- Des substituants lourds et encombrants (alcyl ($C_nH_{2n+1}-$), éthyl (CH_3-CH_2-) ou butyl ($CH_3-(CH_2)_2-CH_2-$) en position *o*- créent un obstacle stérique autour du radical, empêchent la propagation de la chaîne d'oxydation, augmentent la densité électronique autour de la fonction phénol et l'activité AOX plus qu'un reste méthyl (CH_3-) (Shahidi et al. 1992).
- Une fonction phénol en position *m*- ne permet pas la liaison H intra-moléculaire et augmente l'activité AOX moins que l'hydroxy en position *o*-.
- Une troisième fonction phénol en position *m*- adjacente à une fonction *o*- n'augmente plus du tout l'activité AOX : pyrogallol (1,2,3-benzentriol) < catéchol (*o*-dihydroxybenzophénol).

Le facteur stœchiométrique maximal des diphénols est théoriquement de 2 ; en pratique, il se situe entre 1 et 2 (Rice-Evans et al. 1996).

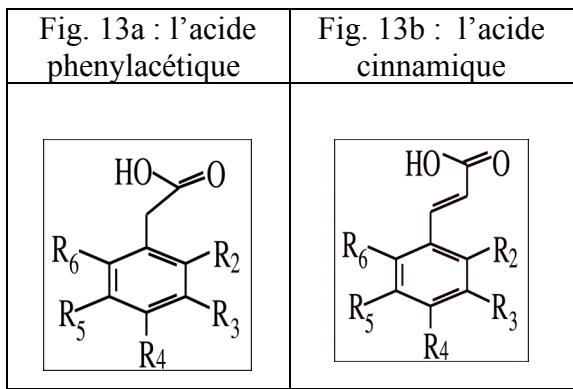
1.2.3.2 Les polyphénols dérivés des acides phénols

➤ Structure et subdivisions

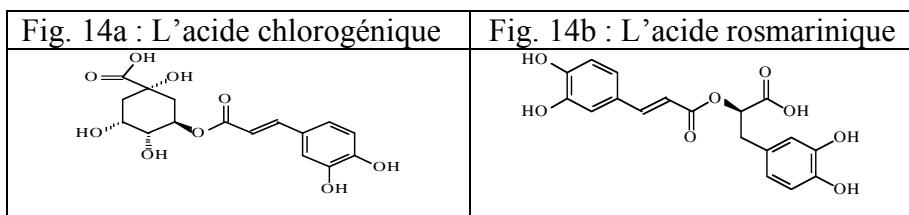
Les acides de base sont soit l'acide benzoïque (Tab. 8), soit l'acide phénylacétique (Fig. 13a), soit encore l'acide cinnamique (Fig. 13b). Des estérifications et autres substitutions forment les différents composés des 3 sous-familles.

Tab. 8: Quelques polyphénols dérivés de l'acide benzoïque					
L'acide benzoïque	Acide	R2	R3	R4	R5
	pyrocatechique	OH	OH	H	H
	protocatéchique	H	OH	OH	H
	gentisique	OH	H	H	OH
	α - résorcylique	H	OH	H	OH
	gallique	H	OH	OH	OH

L'acide homoprotocatéchique (3,4-dihydroxyphénylacétique) est un polyphénol courant dérivé de l'acide phénylacétique (Rice-Evans et al. 1996) ; l'acide caféïque (3,4-dihydroxycinnamique) est un polyphénol courant dérivé de l'acide cinnamique (Schulz et Herrmann 1980 ; Natella et al. 1999).



L'acide chlorogénique (Fig. 14a) (acide cafénylquinique) et l'acide rosmarinique Fig. 14b (ac. caféïque estérifié avec l'acide α – hydroxy-dihydrocaféïque) sont deux dérivés de l'acide cinnamique souvent présents dans les aliments d'origine végétale.



➤ Critères d'activité AOX des polyphénols dérivés des acides phénols

- le nombre des fonctions phénols sur le noyau aromatique est également déterminant pour l'activité AOX des polyphénols dérivés des acides phénols.
- la distance du groupe carboxyle par rapport à C1. Ce groupe a tendance à attirer vers lui la densité électronique et à la baisser dans le noyau. Plus il est proche de C1, plus il atténue l'activité AOX du composé (Rice-Evans et al. 1996).

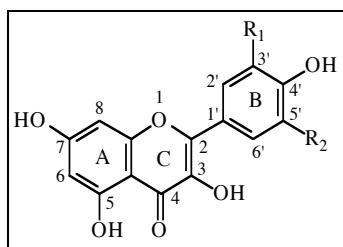
De manière générale, dans les mêmes conditions expérimentales, ces critères prédisent un ordre de grandeur de l'activité AOX attendue d'un composé. Cependant, l'activité réellement observée n'est pas obligatoirement l'addition de ces critères. En plus, la plupart d'études sur l'activité AOX des acides phénols ont été effectuées *in vitro*, en milieu aqueux et sont de type stoechiométrique. Leurs résultats varient d'une étude à l'autre et ne se prêtent ni à une transposition sur d'autres systèmes, ni à une généralisation (Rice-Evans et al. 1996).

1.2.4 Les flavonoïdes

1.2.4.1 Structure de base et subdivisions

La structure de base des flavonoïdes est présentée à la figure 15, à l'exemple de celle des flavonols. Elle est formée par cyclisation des chalcones. Les deux noyaux aromatiques sont désignés A (gauche) et B (droit) ; le noyau central O-hétérocycle est nommé C.

Fig. 15: Le noyau flavonol, une des génines les plus fréquentes



Les atomes d'oxygène et de carbone sont numérotés dans l'ordre repris dans la Fig. 15 (Rice-Evans et al. 1996; Beecher 2003). Le niveau d'oxydation du noyau C, i.e. la présence ou non d'une double liaison C2=C3, d'une fonction -OH en C3, et d'une fonction cétone en C4, détermine les différentes sous-classes; Tab. 9 et 10 en présentent les principales; en plus, Tab. 10 présente quelques composés courants de chaque principale sous-classe (Beecher 2000; Pietta 2000; Lotito et Frei 2006).

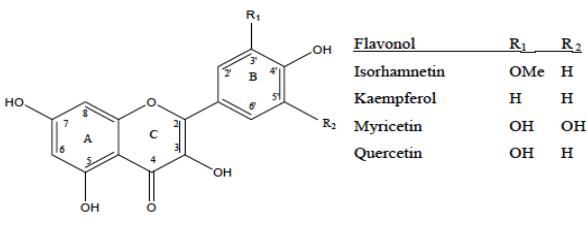
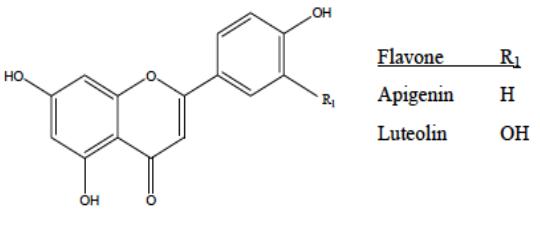
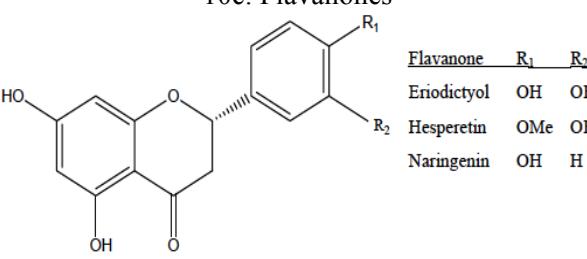
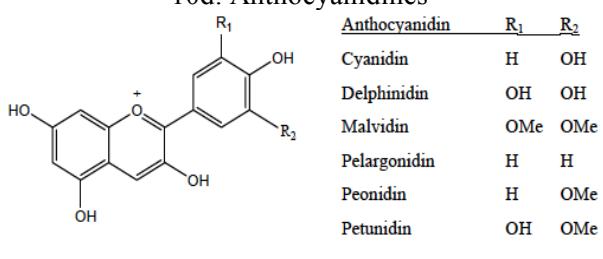
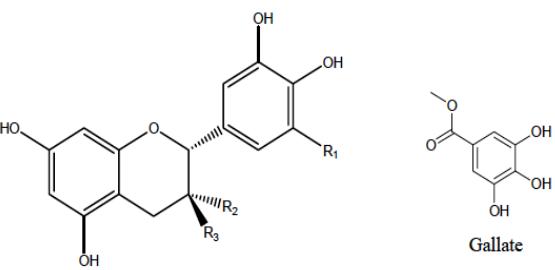
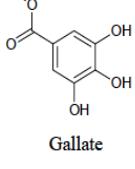
Tab. 9: Principales sous-classes des flavonoïdes et particularités de leur noyau C (Pietta 2000; Beecher 2000)			
Sous-classe	Particularités du noyau central C		
	Double liaison C2=C3	Groupe -OH en C3	Fonction cétone en C4
Flav-one	✓	-	✓
Flav-on-ol	✓	✓	✓
Dihydroflav-on-ol	-	✓	✓
Flavan-one	-	-	✓
Flavan-3-ol	-	✓*	-
Flavan-3, 4-diol	-	✓	Substituée par -OH
Isoflavone	✓	-	✓
	Noyau C lié au noyau B par 3→1' et non par 2→1'		
Anthocyanes (sels flavylium)	Charge positive sur l'atome O en 1; doubles liaisons O=C2 et C3=C4, pas de fonction cétone C4		
Proanthocyanidines	Di- ou trimères des flavan-3-ols		
Tanins condensés	Polymères des proanthocyanidines		

✓ = présent ; - = absent ; * = 3 -O-gallate pour les catéchine-gallates

Aux positions 3, 3', 4', 5, 5', 7 et 8, la substitution de -OH ou de -H par un groupe méthyle, acétyle ou alkyle, un mono-, un disaccharide ou un sulfate donne lieu à des hétérosides.

La liaison à un sucre augmente l'hydrosolubilité du flavonoïde; elle est généralement de type β -O-glycosidique ; parfois plutôt C-glycosidique (Pietta 2000, Beecher 2003). Dans les **tanins condensés** ou **catéchiques**, les flavan-3-ols sont le plus souvent liés les uns aux autres par des liaisons C4→C8, parfois par d'autres. Traités à chaud avec un acide, ils donnent naissance à une anthocyanidine colorée, d'où leur nom de proanthocyanidines.

Tab. 10a-e: Structure de quelques sous-classes et exemples de flavonoïdes (USDA Database 2007)

10a. Flavonols  <table border="0"> <tr> <td><u>Flavonol</u></td> <td><u>R₁</u></td> <td><u>R₂</u></td> </tr> <tr> <td>Iisorhamnetin</td> <td>OMe</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Kaempferol</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Myricetin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Quercetin</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </table>	<u>Flavonol</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	Iisorhamnetin	OMe	H	Kaempferol	H	H	Myricetin	OH	OH	Quercetin	OH	H	10b. Flavones  <table border="0"> <tr> <td><u>Flavone</u></td> <td><u>R₁</u></td> </tr> <tr> <td>Apigenin</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Luteolin</td> <td>OH</td> </tr> </table>	<u>Flavone</u>	<u>R₁</u>	Apigenin	H	Luteolin	OH															
<u>Flavonol</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>																																			
Iisorhamnetin	OMe	H																																			
Kaempferol	H	H																																			
Myricetin	OH	OH																																			
Quercetin	OH	H																																			
<u>Flavone</u>	<u>R₁</u>																																				
Apigenin	H																																				
Luteolin	OH																																				
10c. Flavanones  <table border="0"> <tr> <td><u>Flavanone</u></td> <td><u>R₁</u></td> <td><u>R₂</u></td> </tr> <tr> <td>Eniodictyol</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Hesperetin</td> <td>OMe</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Naringenin</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </table>	<u>Flavanone</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	Eniodictyol	OH	OH	Hesperetin	OMe	OH	Naringenin	OH	H	10d. Anthocyanidines  <table border="0"> <tr> <td><u>Anthocyanidin</u></td> <td><u>R₁</u></td> <td><u>R₂</u></td> </tr> <tr> <td>Cyanidin</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Delphinidin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Malvidin</td> <td>OMe</td> <td>OMe</td> </tr> <tr> <td>Pelargonidin</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Peonidin</td> <td>H</td> <td>OMe</td> </tr> <tr> <td>Petunidin</td> <td>OH</td> <td>OMe</td> </tr> </table>	<u>Anthocyanidin</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	Cyanidin	H	OH	Delphinidin	OH	OH	Malvidin	OMe	OMe	Pelargonidin	H	H	Peonidin	H	OMe	Petunidin	OH	OMe			
<u>Flavanone</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>																																			
Eniodictyol	OH	OH																																			
Hesperetin	OMe	OH																																			
Naringenin	OH	H																																			
<u>Anthocyanidin</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>																																			
Cyanidin	H	OH																																			
Delphinidin	OH	OH																																			
Malvidin	OMe	OMe																																			
Pelargonidin	H	H																																			
Peonidin	H	OMe																																			
Petunidin	OH	OMe																																			
10e. Flavan-3-ols (catéchines et épicatechines)																																					
 <table border="0"> <tr> <td><u>Flavan-3-ol</u></td> <td><u>R₁</u></td> <td><u>R₂</u></td> <td><u>R₃</u></td> </tr> <tr> <td>(+)-Catechin (C)</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>(+)-Catechin-3-gallate (CG)</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>Gallate</td> </tr> <tr> <td>(-)-Epicatechin (EC)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>(-)-Epicatechin-3-gallate (ECG)</td> <td>H</td> <td>Gallate</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>(-)-Epigallocatechin (EGC)</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)</td> <td>OH</td> <td>Gallate</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>(+)-Gallocatechin (GC)</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>(+)-Gallocatechin-3-gallate (GCG)</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>Gallate</td> </tr> </table>	<u>Flavan-3-ol</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	(+)-Catechin (C)	H	H	OH	(+)-Catechin-3-gallate (CG)	H	H	Gallate	(-)-Epicatechin (EC)	H	OH	H	(-)-Epicatechin-3-gallate (ECG)	H	Gallate	H	(-)-Epigallocatechin (EGC)	OH	OH	H	(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	OH	Gallate	H	(+)-Gallocatechin (GC)	OH	H	OH	(+)-Gallocatechin-3-gallate (GCG)	OH	H	Gallate	
<u>Flavan-3-ol</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>																																		
(+)-Catechin (C)	H	H	OH																																		
(+)-Catechin-3-gallate (CG)	H	H	Gallate																																		
(-)-Epicatechin (EC)	H	OH	H																																		
(-)-Epicatechin-3-gallate (ECG)	H	Gallate	H																																		
(-)-Epigallocatechin (EGC)	OH	OH	H																																		
(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	OH	Gallate	H																																		
(+)-Gallocatechin (GC)	OH	H	OH																																		
(+)-Gallocatechin-3-gallate (GCG)	OH	H	Gallate																																		

Parmi les sous-classes de tanins condensés, 3 sont importantes en alimentation humaine: les procyanidines (2 groupes -OH), les prodelphinidines (3 groupes -OH) et les propelargonidines (1 groupe -OH) sur le cycle B (Beecher 2003).

Les **tanins hydrolysables** (galliques et ellagiques) sont formés par l'estérification entre la fonction acide de plusieurs molécules d'acides phénols et le -OH d'un ose qui est habituellement le glucose. Ce sont des polyphénols, mais ne font pas partie des flavonoïdes.

Ils sont dits "galliques" s'ils portent comme acide phénol l'**acide gallique**, et "ellagiques" s'ils portent comme acide phénol l'**acide hexahydroxydiphénique**.

Les théasinensines du thé, les théaflavines et les théarubigines

Les théasinensines (Fig. 16; liaison C-C entre deux gallocatéchines, du C2' de l'une au C2' de l'autre) sont présentes dans la feuille de thé non fermenté (thé vert), les théaflavines (Fig. 17) et les théarubigines sont des produits d'oxydation (thé fermenté, thé noir).

Fig. 16: Structure de base des théasinensines (Santos-Buelga et Scalbert 2000)

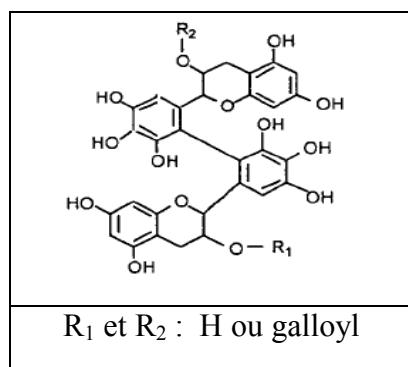


Fig. 17: Structure générale des théaflavines (Beecher 2003; USDA Database 2007)

La structure générale des théaflavines est un dérivé de la théasinensine où les deux unités de gallicate de thé sont reliées par un pont central contenant un atome d'oxygène. Les substituants OR₁ et OR₂ sont indiqués sur les deux unités.

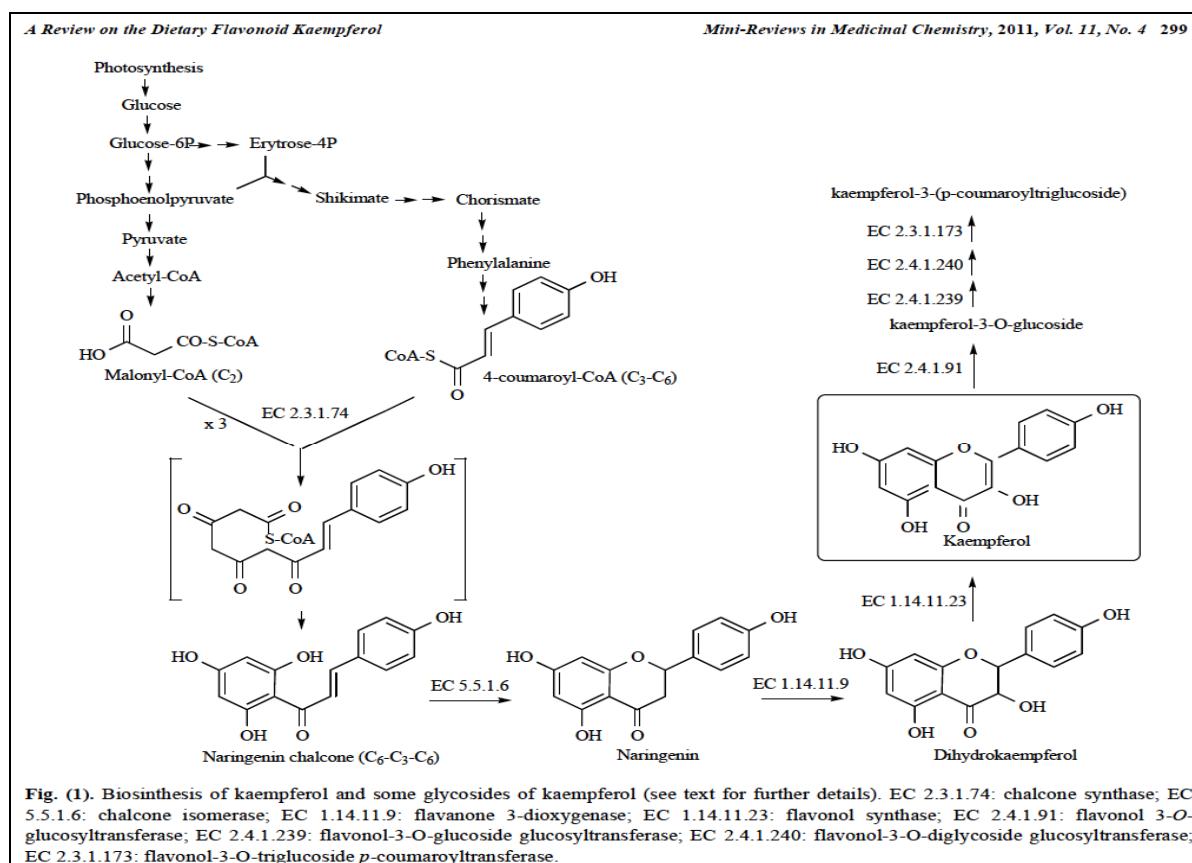
Composé	R1	R2
Théaflavine	H	H
Théaflavine-3-gallate	gallate	H
Théaflavine-3'-gallate	H	gallate
Théaflavine-3,3'-digallate	gallate	gallate

1.2.4.2 Biosynthèse

Les composés de base sont l'acide cinnamique (C₆-C₃) et 3 unités acétates. Le noyau B et les atomes C2, C3 et C4 de l'hétérocycle C proviennent de l'unité *p*-coumaryle issue d'une transformation de l'acide cinnamique en acide *p*-coumarique. Les unités acétates fournissent les 6 carbones qui constituent le noyau A, leurs fonctions carboxyles sont à l'origine des fonctions -OH que l'on retrouve en C5 et en C7, ainsi que de l'oxygène de l'hétérocycle en position 1.

Les diverses transformations enzymatiques passent par un produit intermédiaire C15 dont l'hydrogénéation en C9 permet la fermeture du noyau A par l'axe C9-C10, et forme une chalcone. La chalcone-isomérase catalyse la cyclisation de la chalcone en une flavanone (Fig 18).

Fig. 18: Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes
(Caldéron-Montano et al. 2011)



Des événements supplémentaires d'hydratation, de réduction, d'oxydation, d'hydroxylation etc, forment les sous-classes respectives (Harborne 2000; Winkel-Shirley 2001; Wheeler et Wheeler 2004; Winkel 2006; Caldéron-Montano et al. 2011). À ce jour, plus de 4000 flavonoïdes ont été isolés et identifiés (Ren et al. 2003).

1.2.4.3 Sources et apport alimentaire

La diversité structurelle des polyphénols et les différences de spécificité entre les nombreuses méthodes d'analyse rendent difficile l'estimation de la teneur en polyphénols de nos aliments. Les valeurs présentées dans la littérature (p. ex. Tab. 11) sont indicatives; dans une même espèce végétale, elles varient souvent très largement d'un cultivar à l'autre, jusqu'à un facteur de 1:4 pour les flavonoïdes et acides phénols de la pomme (Amiot et al. 1992, Hammerstone et al. 2000) et pour la quercétine dans les oignons jaunes et rouges (Tsushida et Sasaki 1996), tandis que les oignons blancs n'auraient pas de flavonols (Scalbert et Williamson 2000).

Tab. 11: Taux indicatif de flavonoïdes dans quelques aliments sélectionnés
(Lotito et Frei 2006)

Flavonoid subclass	Flavonoid	Flavonoid content of selected foods and beverages (mg/100 g edible portion or mg/100 ml) ^a
Flavonols	Quercetin Myricetin Kaempferol	Vegetables: capers (316), celery (3.50), chives (21.7), onions (15.4), red onions (38.8), dock leaves (120), fennel (84.4), hot peppers (16.0–50.0), cherry tomatoes (2.30–20.3), spinach (4.86), sweet potato leaves (30.2), lettuce (1.20–9.40), celery (3.50), broccoli (raw, 9.37; cooked, 2.44), Hartwort leaves (38.9), kale (34.5) Cereal: buckwheat (23.1) Fruits: apples (4.42), apricots (2.55), grapes (2.54), plums (1.20), bilberries (4.13), blackberries (1.10), blueberries (3.93), cranberries (18.4), elderberries (42.0), currants (13.5), cherries (1.25), black currant juice (3.01) Spices and herbs: dill weed (55.0) Others: red wine (1.50), tea (green, 2.69; black, 2.07), cocoa powder (20.3)
Flavanols	(–)-Epicatechin (+)-Catechin (–)-Epigallocatechin gallate	Fruits: apples (9.0), apricots (11.0), grapes (17.6), peaches (2.30), nectarines (2.75), pears (3.43), plums (6.19), raisins (3.68), raspberries (9.23), blackberries (18.7), blueberries (1.11), cranberries (4.20), cherries (11.7) Others: red wine (12.0), tea (green, 132; black, 33.0), chocolate (dark, 53.5; milk, 13.4)
Flavones	Apigenin Luteolin	Vegetables: hot peppers (5.40), celery hearts (22.6), fresh parsley (303) Spices and herbs: oregano (4.50), rosemary (4.00), dry parsley (13,506), thyme (56.0)
Flavanones	Naringenin Hesperetin Eriodictyol	CITRUS FRUITS AND JUICES: lemon (49.9), lemon juice (18.3), lime juice (11.5), orange (43.9), orange juice (15.0), grapefruit (54.5), tangerine juice (10.8) Spices and herbs: peppermint (20.0)
Anthocyanidins	Cyanidin Malvidin Delphinidin Pelargonidin	Fruits: blackberries (100–400), black currant (130–400), blueberries (25.0–500), black grape (30.0–750), elderberries (749), strawberries (15.0–75.0), cherries (35.0–450), plums (0.20–25.0) Others: red wine (20.0–35.0)

^a Data recompiled from Manach et al. [46] and the USDA Database for Flavonoid Content of Selected Foods [18].

Les sources principales sont les légumes et, parmi les fruits, les agrumes et les baies colorées (Beecher 2003 ; Chun et al. 2007 ; USDA Database 2007 ; Anand et al. 2008 ; Ovaskainen et al. 2008). Les fruits sont habituellement plus riches en polyphénols que les légumes ; ils peuvent atteindre, comme la prune, de 1 à 2 g de polyphénols totaux par 100 g de poids frais (Scalbert et Williamson 2000). La surface des fruits est riche en flavonoïdes, particulièrement en quercétine et en kaempférol. Le thé, le cacao, les jus de fruits et le vin rouge sont aussi de bonnes sources, tout comme les germes, les bourgeons, les épices et le soja (isoflavones). Le vin rouge et le thé vert ont une très grande concentration en polyphénols et en constituent un des apports alimentaires les plus importants. Un verre de vin rouge et une tasse de thé vert peuvent apporter chacun jusqu'à 200 mg de polyphénols totaux (Pietta 2000 ; Beecher 2003 ; Lotito et Frei 2006).

L'apigénine et la lutéoline sont répandues dans les graines de céréales et les herbes aromatiques; l'héspéridoside et le naringoside sont présents dans les agrumes.

Les isoflavones se rencontrent plus souvent dans les légumes, surtout le soja et les haricots. Les proanthocyanidines se trouvent dans les pommes, les raisins, les baies, les grains d'orge. Les anthocyanidines et leurs glycosides se retrouvent dans les baies et les raisins rouges (Pietta 2000).

Tab. 12: Apport journalier estimé en flavonoïdes pour certains pays (Beecher 2003)

Estimates of flavonoid consumption in several countries ¹				
Country	Population	Flavonoids evaluated	Intake ²	Reference
			<i>mg/d</i>	
Denmark	Danish Household Consumption Survey (dietary history) ³	3 Flavanones 1 Flavone 2 Flavonols Total	7–14 1–2 15–30 23–46	34
Finland	Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey-10,054 subset (dietary history)	3 Flavanones 2 Flavones 4 Flavonols Total	20 <1 4 24	35
Holland	Dutch National Food Consumption Survey (dietary history)	2 Flavones } 3 Flavonols } 6 Flavan-3-ols 4 Isoflavones Total	23 50 <1 73	36 37 38
Japan	115 Women (dietary history)	1 Flavone 4 Flavonols 2 Isoflavones Total	<1 16 47 63	39
United States	US Health Professionals (FFQ)	2 Flavones 3 Flavonols 4 Isoflavones 2 Isoflavones Total	<1 20–22 <1 12 20–34	40 41 42
	Framingham Offspring Study (FFQ)			
	1095 Asian-American women (dietary history)			

¹ The intake data in this table are representative values only and not intended to be an extensive review. Studies were generally selected based on a large number of subjects and/or a substantial number of subclasses of flavonoids evaluated.
² Intake data are based on aglycone form of each flavonoid.
³ Comment in parentheses indicates tool used to collect food intake information. FFQ, food frequency questionnaire.

L'**apport** journalier moyen en polyphénols totaux varie selon les régions, le régime alimentaire, la densité en polyphénols des aliments ingérés, la personne, le sexe, la méthode et l'époque de l'étude. Hertog et al. (1993) l'estimaient à 170 mg/j pour les Pays-Bas. Les données de Tab. 12 sont indicatives. Dans le régime occidental, les acides phénols apportent un tiers des polyphénols totaux, les flavonoïdes deux tiers (Scalbert et Williamson 2000).

1.2.4.4 Sort des flavonoïdes lors de la préparation culinaire

La transformation, la conservation et la préparation d'un aliment exercent une influence importante sur les liaisons intra- et intermoléculaires et l'activité AOX des substances qu'il contient. Beecher (2003) signale que lors du stockage des oignons, la dégradation de la quercétine atteint un taux de 25 à 33 % les douze premiers jours, mais s'arrête pratiquement dans la suite. Des enzymes hydrolysent certaines liaisons intra- et intermoléculaires et en forment d'autres plus ou moins capables de modifier l'activité AOX. La production du thé noir par fermentation du thé vert comprend beaucoup de processus d'oxydation et provoque une baisse de concentration en flavan-3-ols, mais la concentration en flavonoïdes totaux demeure plutôt constante. D'autres procédés courants de production des thés commerciaux diminuent soit le taux des flavanols, soit le transforment en produits plus oxydés (Beecher 2003).

Lors de la préparation culinaire, après rupture de la paroi de la cellule végétale, le contact entre le contenu cellulaire comme les enzymes, et les substances d'origine extracellulaire comme les polyphénols peut affecter les liaisons intra- et intermoléculaires ainsi que le taux des polyphénols actifs. La lumière et l'oxygène enclenchent dans l'aliment, des réactions redox auxquelles participent les polyphénols, ce qui peut sensiblement baisser la concentration des polyphénols actifs et augmenter celle des polyphénols oxydés.

Les conséquences du **traitement thermique** sur la concentration des polyphénols contenus dans un aliment et leur activité AOX dépendent de beaucoup de facteurs, principalement de la nature de l'aliment, de l'antioxydant considéré, de la température appliquée et du temps de chauffage. Dans la littérature, elles varient d'une étude à une autre, et dans une même étude, parfois d'un polyphénol à un autre. Jeong et al. (2004) signalent une augmentation de l'activité AOX des extraits de peau d'agrumes traités à la chaleur. Dans l'étude de Oboh (2004), pour six des huits légumes verts testés, la teneur en polyphénols totaux, calculés avec

le réactif de Folin-Ciocalteu, augmente de 33 à 200 % après 5 minutes de blanchiment dans de l'eau bouillie, mais ne varie pas pour deux autres légumes, tandis que le taux de vitamine C diminue dans tous les huits. L'activité AOX de la tomate augmente après un traitement thermique qui améliore la biodisponibilité de ses composants AOX notamment du lycopène, surtout en milieu lipidique (Dewanto et al. 2002). Le chauffage d'épices à 100 °C pendant une heure ou deux augmente le taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux de certaines, mais baisse celui d'autres (Tomaino et al. 2004 ; Temitope et al. 2010). L'activité AOX de la farine des graines d'*Abelmoschus* grillée 60 min à 160 °C augmente significativement (Adelakun et al. 2009). Dans une review récente, Ioannou et al. (2012) présentent des effets diversifiés du traitement thermique sur la concentration des flavonoïdes dans les aliments (Tab. 13).

Tab. 13 : Effets du traitement thermique sur la teneur en flavonoïdes des aliments
(Ioannou et al. 2012)

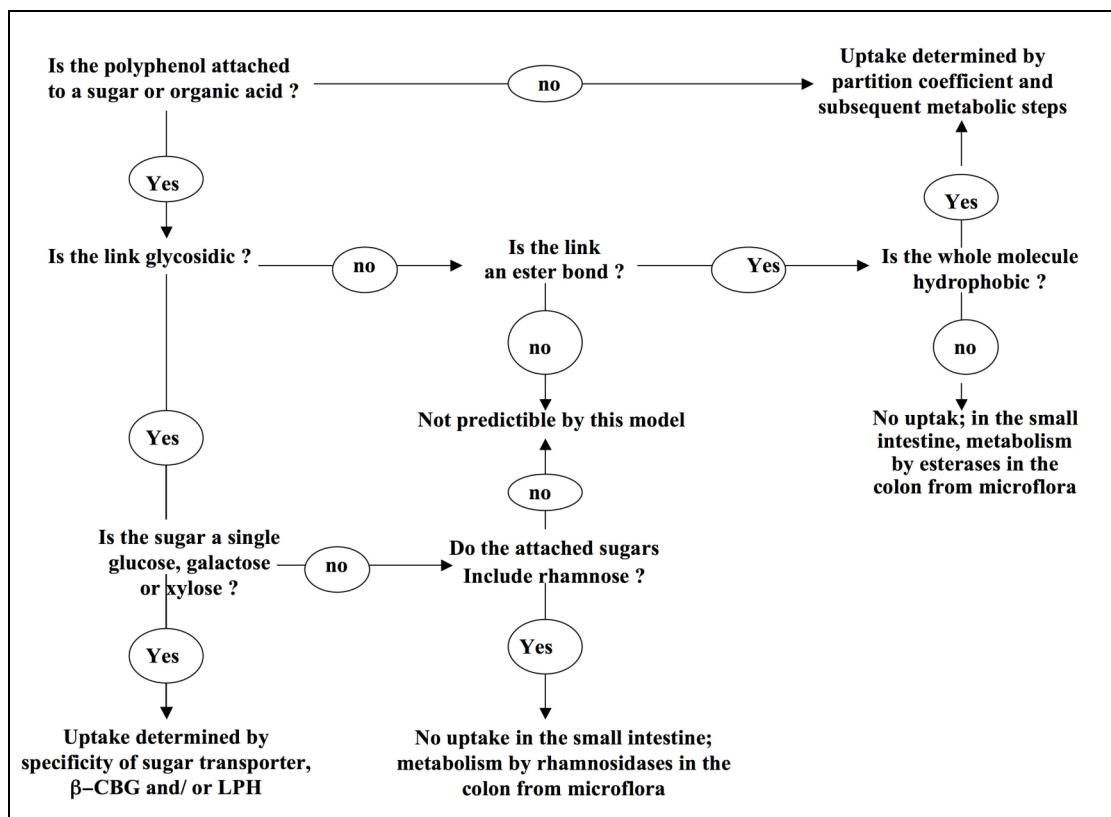
Heat treatment			
Food product/flavonoid	Processing conditions	Impact on flavonoid content	References
Food product/flavonoids			
<i>Total flavonoids</i>			
Eucommia male flower Tea Buckwheat	Microwave drying Roasting 20 min and 40 min at 80 °C and 120 °C Pressurized steam-heating (0.1 MPa, 20 min; 0.2 MPa, 40 min)	Stability of total flavonoid content 20–30% increases depending on the conditions 18–30% increases depending on the conditions	Dong et al., 2011 Zhang et al., 2010
Buckwheat seeds	Microwaving (700 W, 10 min)	20% increase	Zielinski et al., 2009
Buckwheat groats	Heating at 160 °C for 30 min	A 15.9% loss A 12.2% loss	Viña and Chaves, 2008
Celery	Dry air (48 °C, 1 h) /water immersion (50 °C, 90 s)	A 60% loss / A 22% loss	Viña et al., 2007
Brussels sprouts	Blanching (50 °C)	Stability of total flavonoid content	Choi et al., 2006
Mushroom (Shiitake)	Autoclave: (100, 121 °C, 10 or 30 min)	Increase of free flavonoids (64%). Decrease of bound flavonoids: 50% (100 °C, 30 min), 75% (121 °C, 10 min), 90% (121 °C, 30 min) Stability under (100 °C, 10 min)	Viña et al., 2007 Choi et al., 2006
Sweet potato	Steaming (40 min)	14% increase	Huang et al., 2006
Citrus peels	Heat treatment (50, 100, 150 °C during 60 min)	Increase of the antioxidant activity	Jeong et al., 2004
Apple juice	Heating (40–70 °C)	50% increase	Gerard and Roberts, 2004
	Heating (5–24 °C)	Increase of proanthocyanidins	Renard et al., 2011
<i>Individual flavonoid</i>			
Bean (Quercetin, kaempferol)	Atmospheric (100 °C) and pressure boiling (121 °C) with and without soaking and draining	Increases of 1–90% of quercetin and kaempferol derivatives with soaking and draining	Ranilla et al., 2009
Buckwheat (Vitexin, isovitexin, rutin)	Roasting at 160 °C for 30 min.	Losses of 80% of vitexin, isovitexin and rutin. Disappearance of homoorientin and orientin.	Zielinski et al., 2009
Strawberry juices (kaempferol, quercetin, myricetin, anthocyanins)	High-intensity pulsed electric fields	Stability of kaempferol, quercetin and myricetin.	Odriozola-Serrano et al., 2008
Clingstone Peaches	Pasteurization (90 °C, 60 s; 90 °C, 30 s) Thermal treatment (100 °C, 40 min; 105 °C, 10 min; 110 °C, 2.4 min)	10% increase of anthocyanins content (90 °C, 60 s) Increase of proanthocyanidins	Asami et al., 2003
Grape juices (catechins, procyanidins)	Pasteurization	Increase of catechins in cold-pressed juices/ Decrease of catechins in hot-pressed juices/increase of procyanidins.	Fuleki and Ricardo-Da-Silva, 2003
Buckwheat (Rutin, isovitexin)	Heating for (10,70, 130 min) to 150 °C then steaming (0.35 MPa, 20 min)	Increase of rutin and isovitexin Steaming induces more losses	Diertych-Szostak and Oleszek, 1999
Model solutions			
Aqueous flavonol solutions (quercetin and rutin)	Heating at 100 °C for 300 min under pH 5 and 8 with air or nitrogen perfusion	Quercetin is more sensitive to heat under weak basic pH The presence of oxygen accelerates the degradation of quercetin and rutin	Buchner et al., 2006
Aqueous flavonol solutions (quercetin and rutin)	Heating at 97 °C for 240 min under pH 8	Quercetin is more sensitive to heat than rutin The presence of oxygen accelerates the degradation of quercetin and rutin	Makris and Rossiter, 2000
Rutin, luteolin, luteolin-7-glucoside	Heating at 100 °C for 300 or 360 min Heating at 180 °C for 120 or 180 min	Flavonoids are generally stable at 100 °C Luteolin is more stable to heat than rutin and luteolin-7-glucoside (180 °C, 180 min)	Murakami et al., 2004
Aqueous flavonol solutions (quercetin and rutin)	Heating at 97 °C for 240 min under pH 8	Quercetin is more sensitive to heat than rutin The presence of oxygen accelerates the degradation of quercetin and rutin	Makris and Rossiter, 2000

1.2.4.5 Biochimie nutritionnelle des flavonoïdes

1.2.4.5.1 Absorption intestinale

Le taux de polyphénols trouvés intacts dans l'urine varie par composé et par sujet. Il est de 0.3 à 1.4 % pour la quercétine et la rutine, de 3 à 26 % pour les catéchines du thé vert, les isoflavones du soja, les flavanones des agrumes, les anthocyanidines du vin rouge, et de 5 à 57 % pour la naringine du jus de pamplemousse. Environ 75 à 99 % des polyphénols ingérés ne sont pas retrouvés dans l'urine (Scalbert et Williamson 2000; Rice-Evans et al. 2000 ; Manach et al. 2004 et 2005). Le tableau 14 propose certains critères d'absorption des flavonoïdes sur base d'études menées sur des cellules intestinales *in vitro* (Scalbert et Williamson 2000).

Tab. 14: Prédiction de l'absorption des polyphénols chez les humains
(Scalbert et Williamson 2000)



- La **glycosylation** d'un flavonoïde influence ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. Elle détermine également le coefficient de partition d'un composé, c-à-d son

affinité relative pour la phase aqueuse ou la phase organique, et sa capacité de diffuser à travers la membrane intestinale.

- Une **diffusion passive** à travers les microvilli de la paroi de l'intestin grêle suppose une hydrolyse préalable de la liaison glycosidique appelée aussi **déconjugaison** (Scalbert et Williamson 2000; Manach et al. 2004 et 2005). Il n'y a pas de déglycosylation non enzymatique (p. ex. due au pH gastrique acide) (Gee et al. 1998).

Les **β -glucosidases** et la **lactase phloridzine hydrolase (LPH)** sont les principales enzymes de la déconjugaison du sucre de son aglycone.

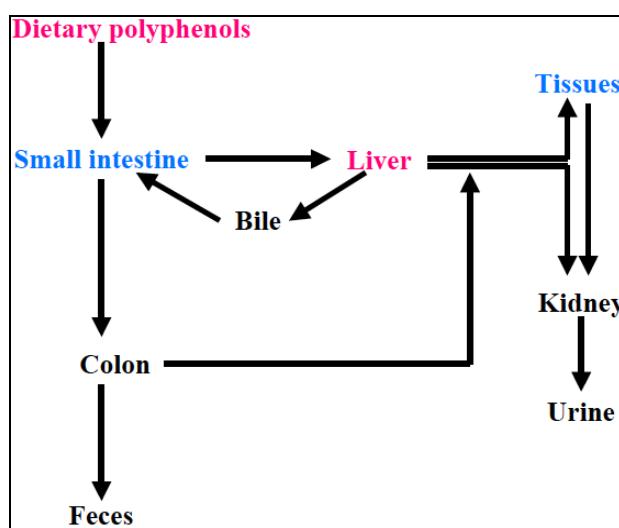
- La **β -glucosidase cytosolique (CBG)** est rencontrée dans une large variété des tissus, mais spécialement dans le foie et dans certaines cellules de l'intestin grêle.
- La LPH est une β -glycosidase présente à la surface luminaire des villosités de l'intestin grêle, mais absente des hépatocytes (Day et al. 2000). Elle catalyse l'hydrolyse du lactose, des glycosyl-, des lactosylcéramides et d'un très grand nombre de polyphénols glycosides.
- La β -glycosidase de la muqueuse gastro-intestinale, la CBG et la microflore du côlon, peuvent toutes cliver la liaison du glucose, de l'arabinose et du xylose à l'aglycone, mais pas celle du rhamnose et de la quercétine-3-*O*-glucoside.
- Le rhamnose est clivé de son aglycone par les **α -rhamnosidases** de la microflore du côlon (Scalbert et Williamson 2000), qui comme la LPH, hydrolysent également la quercétine-3-*O*-glucoside. Toutefois, Aziz et al. (1998) et Miyazawa et al. (1999) rapportent la présence dans le plasma, des glucosides n'ayant pas été déconjugués.
- L'**acylation** des flavonoïdes, notamment celle des flavanols avec l'acide gallique, n'influence pas leur coefficient de partition et leur biodisponibilité autant qu'une glycosylation.
- Les **flavanols** diffusent à travers les membranes et sont absorbés sans déconjugaison ni hydrolyse préalable. Dans leur étude, Nakagawa et al. (1997) rapportent qu'après ingestion de 2 à 3 tasses de thé, le taux d'épigallocatéchine et d'épigallocatéchine-gallate dans le plasma était de 0.2 à 3 %, sans dépendre d'une préalable dégalloylation. Toutefois, Yang et al. (1999) signalent une évidence de dégalloylation de (-)-épigallocatéchine-gallate dans la salive.
- L'**estérification** des **acides phénols** avec des sucres, des acides organiques ou des lipides a des conséquences sur leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques. Olthof et al. (2001) rapportent un taux d'absorption de $33 \pm 17\%$ pour l'acide chlorogénique, et de $95 \pm 4\%$ d'acide caféïque chez 7 sujets humains sains ; le taux d'excrétion urinaire était de 11 % pour l'acide caféïque, mais de l'ordre des traces pour l'acide chlorogénique. Cependant, les tissus humains ne disposant pas d'estérase capable de briser la liaison ester des acides

phénols, ceux-ci sont métabolisés par la microflore du côlon (Plumb et al. 1999; Scalbert et Williamson 2000).

- Les **tanins galliques** et **ellagiques** sont hydrolysés (Scalbert et Williamson 2000).
- L'absorption des **tanins catéchiques** dans l'intestin grêle n'est pas certaine, car leur poids moléculaire est très élevé (Santos-Buelga et Scalbert 2000).

Tous ces critères déterminent ensemble la voie de chaque flavonoïde à travers le corps humain (Scalbert et Williamson 2000 ; Rice-Evans et al. 2000) (Tab. 15).

Tab. 15: Parcours possibles des polyphénols alimentaires dans le corps humain (Modifié d'après Scalbert et Williamson 2000)

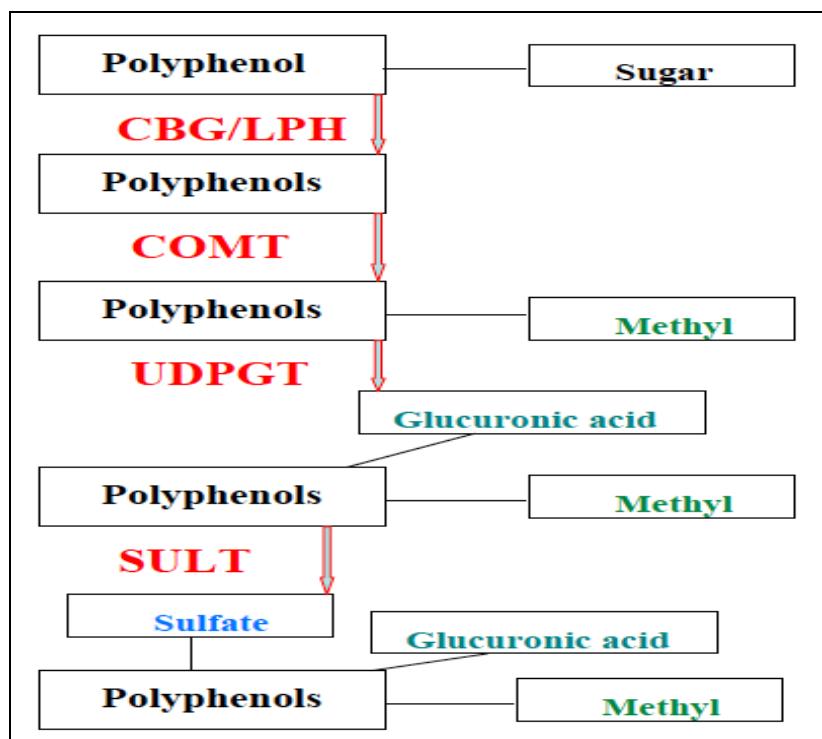


Une absorption partielle a lieu dans le côlon; le suc biliaire permet un cycle entéro-hépatique partiel qui augmente le taux d'absorption. L'élimination par voie rénale est beaucoup moins importante que par voie intestinale (Hollman et al. 1995; Hollman et Katan 1997; Scalbert et Williamson 2000).

1.2.4.5.2 Métabolisme et transport

Après déconjugaison du sucre, les aglycones sont méthylés, sulfatés et/ou glucuronés. Ces réactions sont contrôlées par la spécificité et la distribution des enzymes qui les catalysent dans la muqueuse intestinale, le foie et les reins (Scalbert et Williamson 2000) (Tab. 16).

Tab. 16: Schéma simplifié du métabolisme des polyphénols
(Scalbert et Williamson 2000)



CBG = β -glucosidase cytosolique; LPH = lactase phloridzine hydrolase;
COMT = catéchol-*O*- méthyltransférase; UDPGT = uridine diphosphate
glucuronosyl transférase; SULT = phénol-sulfotransférase

- La **catéchol-*O*- méthyltransférase (COMT)** est présente dans un grand nombre de tissus, où elle méthyle de manière spécifique des groupes hydroxyles des polyphénols (Scalbert et Williamson 2000).
- Les **uridine diphosphate (UDP) glucuronosyl transférases (UDPGT ou UGT)** sont une famille d'enzymes localisées dans le réticulum endoplasmique. La sous-famille UGT1A présente dans l'épithélium gastrique, l'intestin grêle, le côlon, les reins et surtout dans le foie, catalyse principalement la conjugaison des polyphénols à l'acide glucuronique. Les UGT1A sont inducibles par les aliments (Scalbert et Williamson 2000).

- Les **phénol-sulfotransférases (SULT)** constituent une petite famille d'enzymes cytosoliques largement répandues, notamment dans le côlon et le foie. Elles catalysent la sulfatation des polyphénols. Généralement, elles ne sont pas induites par les aliments, mais certaines sont inhibées par des polyphénols : la quercétine inhibe notamment la SULTA1A (Walle 2004).

Le côlon a une densité microbienne d'environ 10^{12} microorganismes/cm³. Il entretient une énorme activité catabolique et hydrolytique, et métabolise une quantité importante des polyphénols ingérés. Il en résulte des acides carboniques de courte chaîne (formiate, acéate, propionate, butyrate), des acides phénols (hydroxy- et méthoxyphénylbenzoates, -acétates), des valérolactones et d'autres métabolites, dont les structures et activités biologiques ne sont pas encore toutes connues. Une quantité de ces métabolites est absorbée au niveau du côlon et s'ajoute au taux d'absorption totale des polyphénols (Scalbert et Williamson 2000).

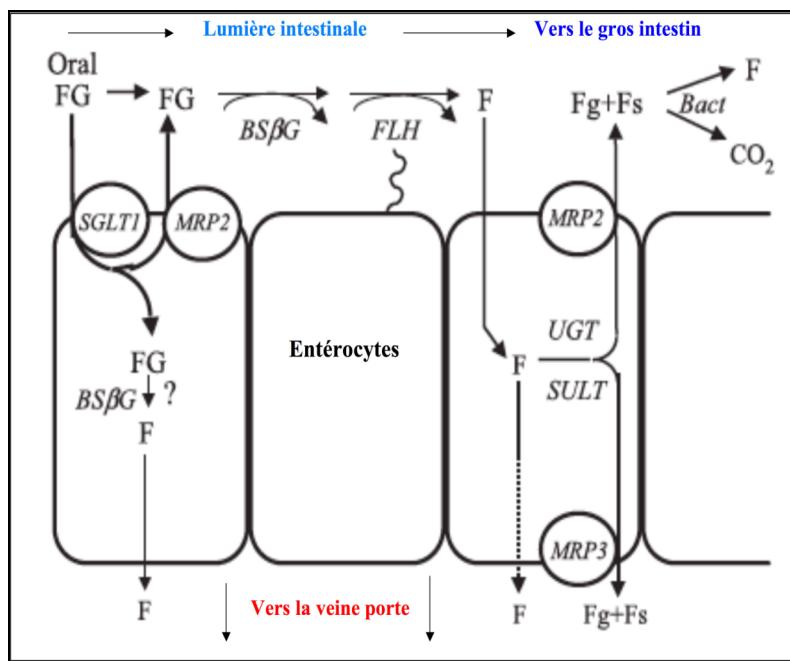
Diffusion passive

Une diffusion passive des aglycones a lieu après l'hydrolyse enzymatique (Walgren et al. 1998 et 2000). L'aglycone traverse ensuite les cellules intestinales où commence déjà la conjugaison (Day et al. 2000). Cependant, pour Hollman et Katan, (1997), la conjugaison a principalement lieu dans le foie.

Transport actif

Les polyphénols sont transportés de la muqueuse vers le compartiment séreux grâce à un "*sodium-dependent glucose cotransporter*" (**SGLT1**) situé dans les villosités de l'intestin grêle (Hollman et al. 1995; Walgren et al. 1998; Walle 2004). La "*multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)*" compétitive à SGLT1, remet dans la lumière intestinale des flavonoïdes déjà arrivés dans les cellules intestinales. Sur la surface basale, la "**MRP3**" transporte les flavonoïdes conjugués vers le sang portal (Fig. 19) (Walgren et al. 2000; Walle 2004).

Fig. 19: Schéma proposé pour le transport des flavonoïdes (Walle 2004)



FG: flavonoïdes glycosides;
 BS β G: "broad specific β -glucosidase";
 F: aglycone; Bact: bactéries;
 Fg: flavonoïde-glucuronide;
 Fs: flavonoïde-sulfate ;
 UGT: uridine diphosphate glucuronosyl transférase;
 SULT: phénol-sulfotransférase.

1.2.4.5.3 Biodisponibilité

La partie majeure des flavonoïdes ingérés est excrétée; une faible partie atteint le plasma. En régime occidental, la concentration des polyphénols intacts dans le plasma est en moyenne 1 à 1.7 μ M (Scalbert et Williamson 2000; Walle 2004 ; Manach et al. 2004 et 2005). Elle atteint son maximum 1-2 h après ingestion, mais après 9 h pour la quercétine de la rutine (Hollman et Katan 1997).

Toutefois, il n'est pas nécessaire que les polyphénols atteignent d'abord un site précis, comme le plasma, pour développer leurs activités biologiques. En plus, leurs produits conjugués et autres métabolites ainsi que les activités biologiques de ces derniers, seulement partiellement connues, s'ajoutent à la biodisponibilité et aux activités biologiques globales des polyphénols alimentaires (Rice-Evans et al. 2000 ; Scalbert et Williamson 2000 ; Walle 2004 ; Manach et al. 2004 et 2005).

1.2.5 Quelques autres antioxydants exogènes

Beaucoup d'autres composés végétaux développent également des activités AOX. C'est le cas du carvacrol, du thymol (Lagouri et al. 1993), et de beaucoup d'autres composés mono- et sesquiterpènes que l'on retrouve notamment dans les huiles essentielles (Ruberto et Baratta 2000), ainsi que des produits de la réaction de Maillard formés lors de la fumaison et/ou de la cuisson de nos aliments (Morales et Jiménez-Pérez 2000; Yilmaz et Toledo 2005).

Dans l'hémoglobine, la **L – histidine**, un acide aminé essentiel, donc généralement d'origine alimentaire, sert de tampon pour maintenir stable le pH sanguin. Un des deux atomes d'azote de son cycle imidazole sert à fixer des ions métalliques et permet leur complexation indispensable à l'activité de certaines protéines. Libre ou faisant partie des peptides ou des protéines, la L-histidine piège le radical hydroxyle (HO^\cdot), l'oxygène singulet, et intervient dans les réactions redox impliquant des ions métalliques (Wade et Tucker 1998).

La **curcumine** (Fig. 20a) et le **resvératrol** (Fig. 20b) font l'objet de beaucoup d'études pour leur activité AOX (Deby-Dupont et al. 2005; Kohnen et al. 2007; Frank et al. 2008).

Fig. 20a : la curcumine

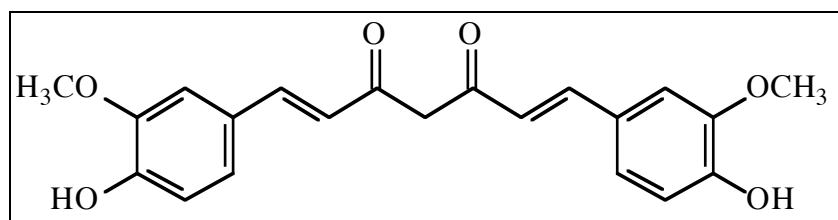
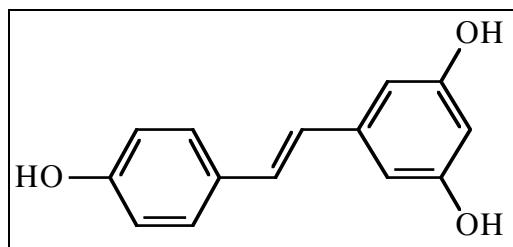


Fig. 20b : le resvératrol



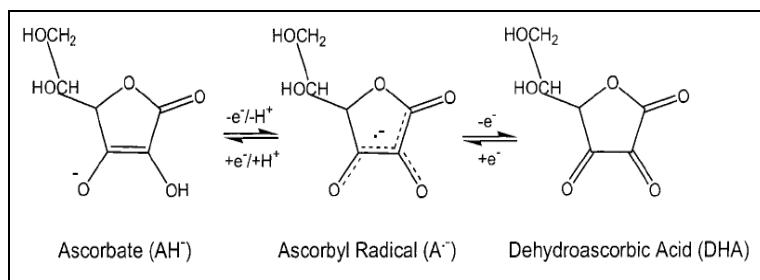
Certaines vitamines comme la Vit C et la Vit E développent également des activités AOX. Ci-dessous nous présentons brièvement les **vitamines C, E et les cartonéoïdes**.

- *La vitamine C (acide L- ascorbique)*

À l'état moléculaire, cette vitamine hydrosoluble présente une structure "ène - diol" qui lui permet de libérer un premier électron; le radical ascorbyle formé est stabilisé par la délocalisation du caractère radicalaire. La libération du second électron produit le déhydroascorbate (non acide) (Fig. 21).

La vitamine C piège les ROS et protège ainsi d'importantes macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines) contre les dégâts que provoquerait leur oxydation ; dans les sites actifs des enzymes spécifiques de biosynthèse, la vitamine C réduit les ions des métaux de transition.

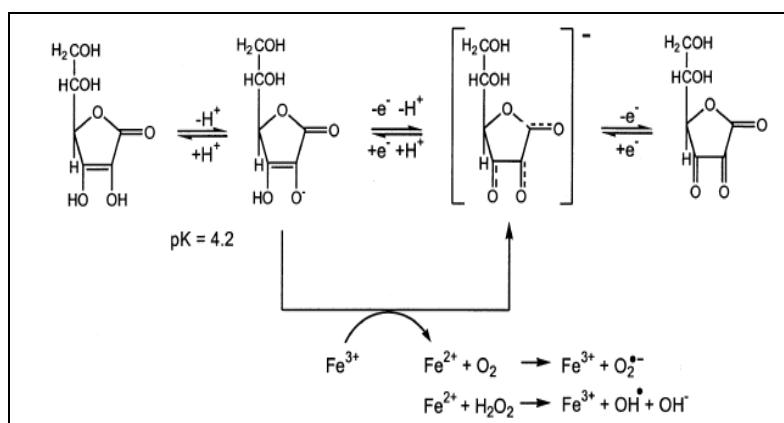
Fig. 21: Structure et cycle de l'acide L-ascorbique (Carr et Frei 1999)



In vitro, la vitamine C peut être pro - oxydante en interagissant avec les cations métalliques présents et en les faisant passer d'un état "low spin" vers un état "high spin" (Rietjens et al. 2002). C'est le cas du système Fe / ascorbate où le Fe^{3+} réduit en Fe^{2+} peut enclencher la peroxydation lipidique ou encore réagir avec O_2 et/ou H_2O_2 et mener à la production des ROS (Fig. 22).

Fig. 22: Effet pro-oxydant de la vitamine C en présence de Fe^{3+}

(Rietjens et al. 2002)

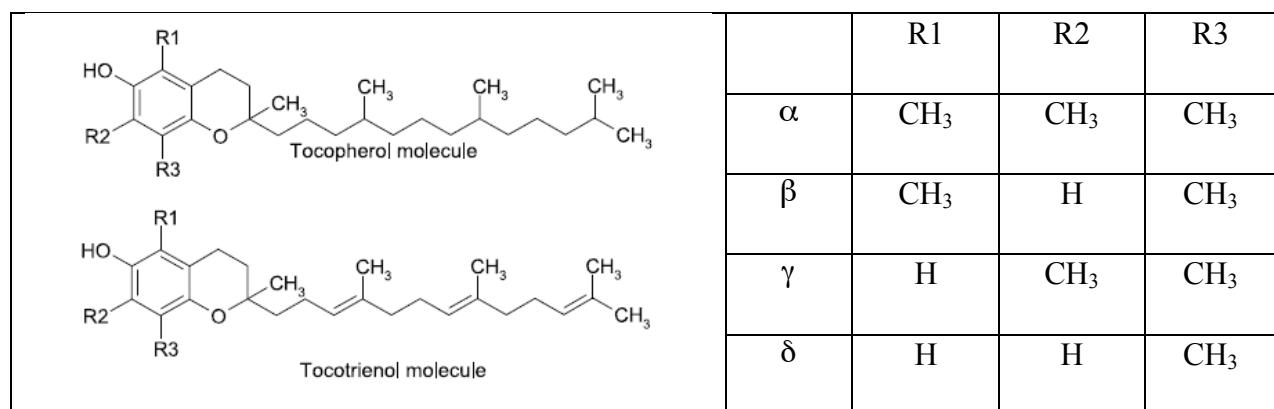


In vivo, les cations métalliques pro-oxydants ne sont pas transportés à l'état libre, mais sont séquestrés dans des "cages"; leur contact avec la Vit C est sous un contrôle physiologique qui protège l'organisme contre des oxydations excessives et incontrôlées (Carr et Frei 1999).

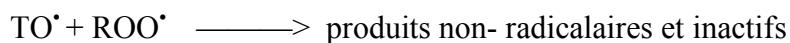
- *La vitamine E (les tocophérols /tocotrienols)*

Les tocophérols sont composés d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale isoprénoidé saturée de 16 C. Les tocotrienols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale. Selon la position et le nombre des groupes méthyles sur le noyau chromanol, on distingue les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et -tocotrienols (Fig. 23). Toutefois, α - tocophérol, plus généralement connu comme vitamine E, est le plus abondant et le plus important (Rietjens et al. 2002).

Fig. 23 : Structure des tocophérols et tocotrienols (Liang et al. 2006)



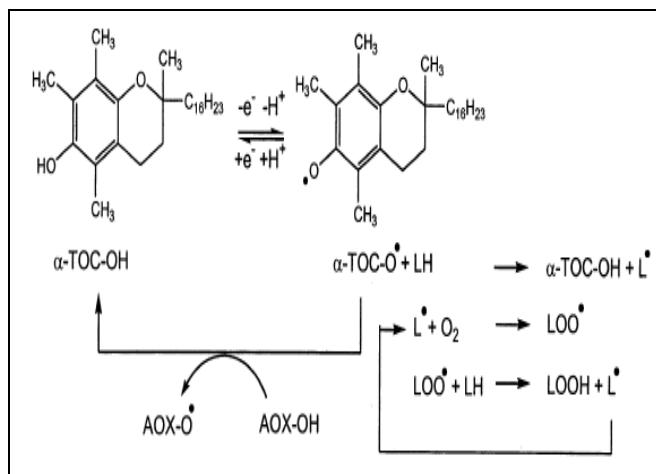
Cette vitamine liposoluble interrompt la propagation de la peroxydation lipidique et réagit avec les radicaux peroxydes (ROO $^{\cdot}$) avant qu'ils n'atteignent les acides gras non saturés de la membrane cellulaire. Des faibles concentrations de Vit E (1/1000) suffisent pour protéger des grandes quantités d'acides gras poly-insaturés. Les tocophérols (TOH) cèdent aux radicaux hydroperoxydes (ROO $^{\cdot}$) un atome d'hydrogène phénolique et sont transformés en radicaux tocophéryles (TO $^{\cdot}$) capables de réagir avec d'autres formes radicalaires pour former des produits stables et interrompre ainsi la chaîne de peroxydation (Rietjens et al. 2002).



Dans le Trolox, un analogue synthétique de la vitamine E, la substitution de la chaîne latérale isoprénoïde par une fonction carboxyle rend la molécule hydrosoluble. L'activité AOX de la Vit E réside dans le noyau chromanol; la chaîne latérale détermine la cinétique de transport et de rétention de la molécule dans les membranes cellulaires. La vitesse et la stœchiométrie de la réaction d'un AOX avec un radical libre déterminent son efficacité. À cet égard, la Vit E est un des AOX les plus efficaces à interrompre une chaîne de peroxydation: elle réagit avec les radicaux peroxyles 200 fois plus vite que le butylhydroxytoluène (BHT). Ses réserves sont fort mobilisées et doivent être régulièrement renouvelées (Burton et Traber 1990).

Bien qu'ils soient solubles dans des milieux différents, la vit C et les tocophérols peuvent développer une réelle synergie. *In vitro*, la Vit C régénère la Vit E à partir de sa forme radicalaire à l'interface de la phase aqueuse avec la phase lipidique; *in vivo*, cette condition devrait être plus limitée (Doba et al. 1985 ; Burton et Traber 1990; Niki et al. 1995). Les tocophérols sont les protecteurs majeurs des structures lipidiques contre l'oxydation dans le plasma, les érythrocytes et les tissus.

Fig. 24: Effet pro-oxydant de la vitamine E (Rietjens et al. 2002)



Cadran inférieur droit : le radical tocophéryle (α -TOC-O[•]) peut arracher un atome H à une molécule lipidique LH qui devient radicalaire L[•]. Ce dernier réagit avec O₂ pour former un radical peroxyde (LOO[•]) qui arrache un H[•] à une autre molécule lipidique LH et produit un radical L[•] capable de propager la formation des radicaux libres.

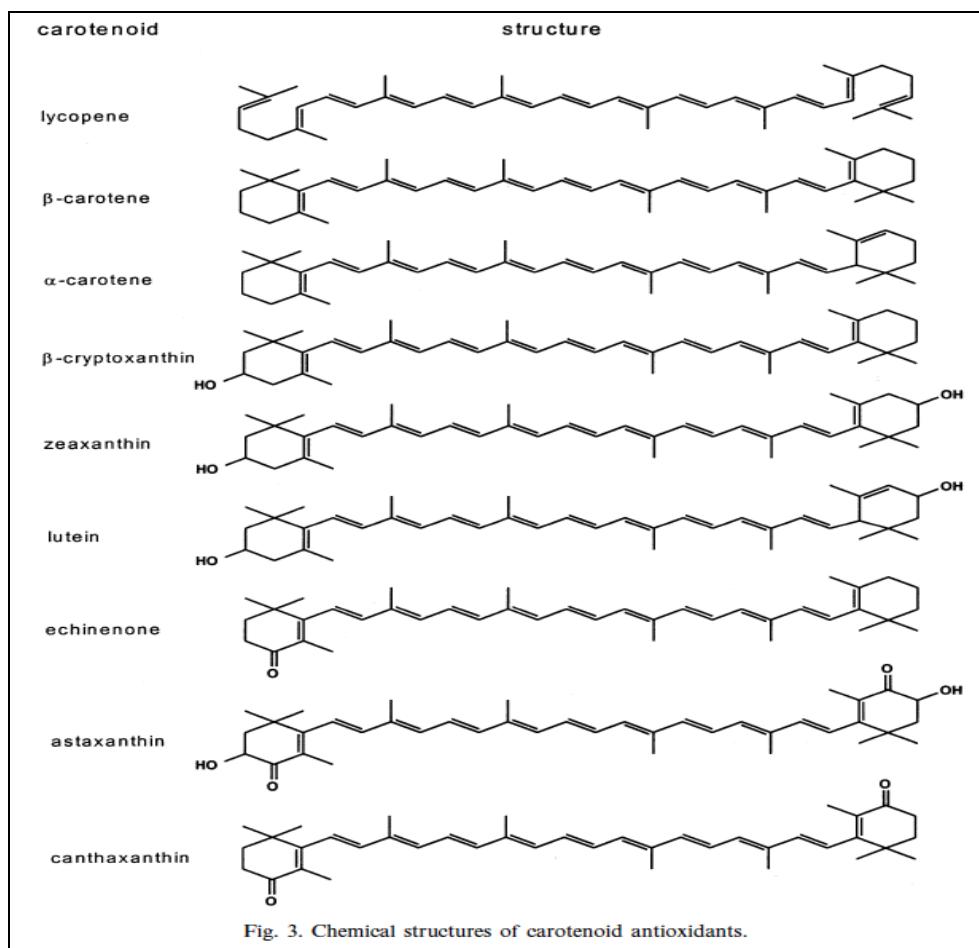
Lors d'une agression oxydante, un niveau élevé d' α -tocophérol mène à la formation d'un taux élevé de radicaux α -tocophéryles capables d'entretenir la propagation de la peroxydation (Fig. 24). Dans ce cas, d'autres AOX sont nécessaires pour ramener le radical tocophéryle à l'état de tocophérol.

- *Les caroténoïdes*

Le lycopène ($C_{40}H_{56}$) est constitué de l'enchaînement linéaire de 8 unités isoprènes associées en deux groupes de quatre unités (géranylgeranyl), et porte 13 doubles liaisons dont 11 sont conjuguées. Il est le composé de base dont dérivent les autres caroténoïdes par cyclisation aux deux extrémités, par déshydrogénération et oxydation (Fig. 25).

Les caroténoïdes sont subdivisés en hydrocarbures, les carotènes, et en leurs dérivés oxygénés, les xanthophylles. Les uns et les autres sont poly-insaturés. On en compte environ 600, dont une cinquantaine fait partie de l'alimentation humaine et une vingtaine a été détectée dans le sang et les tissus. Les carotènes se distinguent entre eux par la position de la 1^{ère} double liaison par rapport au noyau droit, et sont désignés par α - ou β - (Faure et al. 1999). Les liaisons adjacentes à chaque double liaison sont de configuration soit *trans* (ou E), soit *cis* (ou Z). La configuration *trans* donne lieu à une molécule globalement linéaire et stable, et en favorise l'insertion dans les bicouches et les parties lipidiques des liposomes ; la configuration *cis* donne lieu à de fortes contraintes stériques. Les caroténoïdes sont principalement de configuration *trans* (Faure et al. 1999; Rietjens et al. 2002).

Fig. 25: Structure des caroténoïdes (Rietjens et al. 2002)



La plupart des caroténoïdes sont liposolubles. Les groupes hydroxyles des xanthophylles entraînent des interactions avec les têtes polaires des phospholipides, déplacent le cycle des xanthophylles vers la zone hydrophile de la membrane et les rendent légèrement hydrosolubles.

Cependant, la liaison avec un ose baisse la liposolubilité des carotènes et augmente leur hydrosolubilité. La crocine est un des caroténoïdes principaux de *Crocus sativus* L. (le safran) (Crozet 2012_a et 2012_b). Il est un dérivé de la crocétine, un composé liposoluble portant sept doubles liaisons conjuguées et une fonction carboxylique à chacune de ses deux extrémités. L'estérification des fonctions carboxyles de la crocétine avec le gentiobiose met fin à la liposolubilité et rend le composé hydrosoluble.

Les caroténoïdes développent diverses activités biologiques, dont des activités AOX et anti-radicalaires, par lesquelles ils protègent les LDL de la peroxydation: leurs nombreuses doubles liaisons conjuguées font d'eux de bons piégeurs des radicaux libres. Ceux de plus de 9 doubles liaisons sont les plus efficaces; le lycopène en a 13 et est le plus actif (Faure et al. 1999; Rietjens et al. 2002). Les caroténoïdes désactivent l'oxygène singulet et d'autres molécules réactives en absorbant leur supplément d'énergie, mais ils restent eux-mêmes énergétiquement stables car ils retransmettent ce supplément d'énergie à leur environnement sous forme de chaleur, par rotation et /ou par vibration (Krinsky 1989; Palozza et Krinsky 1992).

1.2.6 Activités AOX des polyphénols à l'exemple des flavonoïdes

En tant que polyhydroxyphénols polycycliques, les flavonoïdes partagent avec les polyphénols dérivés du benzophénol et des acides phénols les mêmes critères fondamentaux d'activité AOX. Les types d'activité stœchiométrique et anticatalytique ont été présentés en début de chapitre. L'un et l'autre se déroulent selon des mécanismes différents, mais se basent sur l'énergie d'activation, de dissociation, le potentiel d'ionisation et le potentiel rédox propres à chaque AOX (Mahgoub et Hudson 1985; Komatsu et al. 1993; Lucarini et al. 1996; Rice-Evans et al. 1996; Pietta 2000; Wright et al. 2001; Lemanska et al. 2001; Prior et al. 2005).

1.2.6.1 Principes fondamentaux : énergie d'activation et de dissociation, potentiel rédox

Dans un système donné, l'**énergie d'activation** d'une réaction est celle qui doit être fournie au système pour déclencher cette réaction. *In vivo*, elle est souvent abaissée par l'activité catalytique des enzymes. Dans un système qui regroupe à la fois des espèces réactives, des radicaux libres, des AOX et d'autres substances, sous des conditions précises, les radicaux libres et les autres substances peuvent réagir de manière opposée à l'activité des AOX. Comme toutes les réactions possibles sont soumises à un contrôle cinétique, au point de vue thermodynamique, la réaction qui exige l'énergie d'activation la plus faible sera la plus favorisée. Dans ce cas, l'activité AOX ne peut être efficace que si l'énergie d'activation des polyphénols pour leur réaction avec les ROS est plus basse que celle de toutes les réactions imaginables dans ce système (Komatsu et al. 1993, Jørgensen 1998).

L'**énergie de dissociation** est celle que doit apporter un radical libre pour arracher un atome H à un des groupes hydroxyles d'un AOX présent dans son environnement. Ce mécanisme suppose que le radical libre est en mesure de développer une énergie supérieure ou égale à celle avec laquelle l'atome H à arracher est attaché à sa molécule. Les AOX dont les énergies de dissociation sont les plus faibles sont les meilleurs donneurs d'atomes H ; leurs radicaux phenoxyles sont les plus stables.

Le **potentiel d'ionisation** prend de l'importance lorsque l'activité AOX se déroule non pas par donation d'un atome H entier, mais par transfert d'un électron (*single electron transfer*), et suppose une ionisation préalable de l'AOX.

Les deux mécanismes aboutissent aux mêmes résultats sur l'espèce radicalaire, mais l'influence du pH, de la structure et des propriétés de l'AOX joue différemment sur l'un et

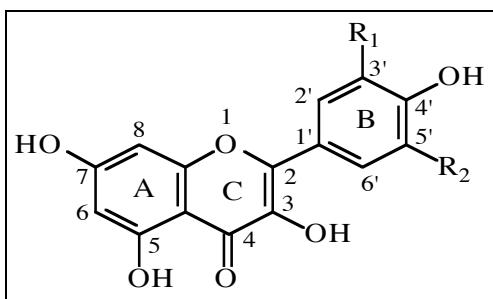
l'autre. Les réactions à transfert d'électron dépendent plus directement de la déprotonation (Lucarini et al. 1996; Jørgensen 1998; Wright et al. 2001; Lemanska et al. 2001; Prior et al. 2005).

Le potentiel rédox désigne la capacité d'un composé AH de donner un électron à B. Pour y arriver, le potentiel réducteur de AH doit être inférieur à celui de B (AH situé plus à gauche que B sur l'échelle des potentiels rédox). Le potentiel réducteur des flavonoïdes est inférieur à celui des radicaux alkyles, peroxyles et de $O_2^{\cdot-}$ et leur permet de neutraliser ces espèces réactives. Les radicaux phénoxyles formés sont stabilisés par résonance des doubles liaisons conjuguées et délocalisation du caractère radicalaire (Rice-Evans et al. 1996).

1.2.6.2 Critères structurels de l'activité AOX des flavonoïdes

Les critères structurels suivants, associés aux noyaux aromatiques, permettent aux flavonoïdes d'atteindre la plus haute activité AOX (Fig. 26):

Fig 26 : Critères structurels d'activité AOX des flavonoïdes



- a) la présence de deux groupes -OH en position *o*- sur le noyau B,
 - b) une double liaison C2=C3 dans le noyau C, conjuguée avec une fonction cétone en C4,
 - c) un groupe -OH en C3,
 - d) le groupe -OH en C5 augmente la capacité de chélater les ions métalliques (Bors et al. 1990; Shahidi et al. 1992; Rice-Evans et al. 1996; Pietta 2000; Wright et al. 2001).
 - e) l'angle de rotation entre le noyau B et le reste de la molécule: plus il est faible, plus l'activité AOX est élevée (van Acker et al. 1996).
- Les **flavonols** remplissent au moins les critères **b**, **c** et **d**. Les **flavones** n'ont pas de groupe -OH en C3. Cependant le critère b leur permet une délocalisation continue du caractère radicalaire du noyau A jusqu'au noyau B, stabilise leurs formes radicalaires et assure une activité AOX efficace.

- Les **flavanones** ont une fonction cétone en C4, mais pas de double liaison C2=C3, ni de groupe –OH en C3. Cette structure brise la conjugaison des doubles liaisons entre les 3 noyaux et affaiblit l'activité AOX (Rice-Evans et al. 1995 et 1996).

Dans la structure des **anthocyanidines**, malgré l'absence de fonction cétone en C4, la double liaison C3=C4 permet une conjugaison continue des doubles liaisons du noyau A jusqu'au noyau B, une délocalisation complète de l'électron célibataire, et stabilise davantage le radical (Rice-Evans et al. 1996; Wright et al. 2001).

- Les **catéchines** (flavan-3-ols) ont un groupe –OH constitutif en C3, mais ni double liaison C2=C3, ni fonction cétone en C4. Une délocalisation complète du caractère radicalaire n'est pas réalisable. Leur activité AOX se base sur le nombre de groupes –OH qui peut augmenter par estérification avec l'acide gallique en C3. Elles développent ainsi des activités AOX parmi les plus élevées que l'on ait observées chez les flavonoïdes (Rice-Evans et al. 1996).

Les critères structurels de l'activité AOX des flavonoïdes en **phase lipidique** sont les mêmes qu'en phase aqueuse (Frankel et al. 1995 ; Rice-Evans 1996, Cook et Samman 1996). Toutefois, l'activité en phase lipidique pourrait avoir des particularités encore mal connues. En tout cas, la solubilité des flavonoïdes en milieu aqueux ou lipidique varie selon les substitutions. Pour beaucoup de flavonoïdes, on constate qu'en milieu lipidique, l'activité AOX baisse et exige de plus grandes concentrations (Yao et al. 2004).

Les radicaux alkoxyles (LO^\bullet) et/ou peroxyles (LOO^\bullet) produits lors d'une peroxydation lipidique sont transformés en alkoxydes (LOH) et en hydroperoxydes (LOOH) qui propagent la peroxydation et "consomment" davantage d'AOX (Frankel et al. 1995).

Contrairement aux interactions en phase aqueuse, la présence de la double liaison C2=C3 semble moins importante en milieu lipidique (Cook et Samman 1996 ; Rice-Evans 1996).

Les flavonoïdes régénèrent α -tocophérol à partir du radical l' α -tocophéryle (Pedrielli et Skibsted 2002).

1.2.6.3 Mécanismes réactionnels proposés pour l'activité stoechiométrique

◆ Neutralisation d'espèces réactives par transfert d'un électron ou d'un atome H

Selon le pH, la structure de la molécule, ses propriétés et l'énergie de dissociation, la désactivation d'espèces réactives a lieu à travers un transfert soit d'un électron seul ("single electron transfer"), soit d'un atome entier d'hydrogène ("hydrogen atom transfer") (Rice-Evans et al. 1996; Pietta 2000 ; Wright et al. 2001 ; Prior et al. 2005). Ce transfert a pour effet de mettre fin à l'existence de la réactivité ("scavenge") et de rompre la chaîne d'oxydation ("chain breaking"). Le caractère radicalaire est transféré sur le composé "scavenger" qui, lui, reste stable généralement grâce à ses doubles liaisons conjuguées.

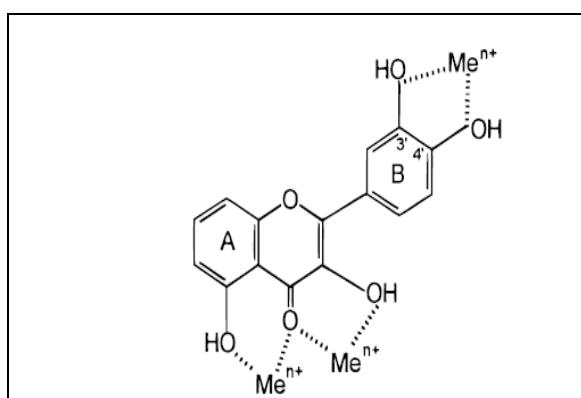
Aux conditions physiologiques, le potentiel de réduction standard des flavonoïdes est proche de celui d'importants couples rédox biochimiques et leur énergie d'activation pour la libération d'électrons est basse. Ainsi, les flavonoïdes sont des donneurs efficaces d'électrons et neutralisent les espèces réactives formées lors des processus physiologiques, p. ex. dans la chaîne respiratoire, lors des oxydations catalysées par les oxygénases, et lors des irradiations. Le "scavenging" est le plus efficace lorsque l'électron non apparié du radical libre se trouve en face du noyau aromatique ou d'une structure catéchol (Rice-Evans et al. 1995 et 1996).

◆ Complexation de cations métalliques

Ce mécanisme est privilégié par une structure *o*- sur le noyau B et/ou deux groupes -OH en C3 et C5 juxtaposés à une fonction cétone en C4 (Fig. 27).

Fig. 27: Modèle de complexation des cations métalliques par un flavonoïde

(Jørgensen 1998; Pietta 2000)



Cette structure permet aux flavonoïdes de chélater des cations de Fe, Cu, Ni, Co, etc... qui, à l'état libre, déclenchaient des réactions pro-oxydantes, et renforce ainsi leur activité AOX.

La structure d'un polyphénol détermine le nombre maximal de cations que ce polyphénol peut à la fois chélater et la force de la liaison qui s'établit entre lui et les cations qu'il complexe (Mahgoub et Hudson 1985; Pietta 2000).

◆ *Protection des ascorbates, des tocophérols et d'autres réducteurs biologiques*

Le caractère réducteur et la complexation des cations pro-oxydants permettent aux flavonoïdes de protéger efficacement les réducteurs biologiques (l'ascorbate, les tocophérols, l'urate, etc...) et de remplir une importante fonction physiologique. En chélant les cations métalliques, les flavonoïdes inhibent ou retardent l'initiation d'une chaîne d'oxydation qui consommerait des réducteurs. Par la donation d'électrons, ils régénèrent des réducteurs à partir de leurs formes oxydées (Frankel et al. 1995; van Acker et al. 1996 ; Meyer et al. 1998).

1.2.6.4 Mécanismes proposés pour l'activité anticatalytique et modulatrice

L'activité anticatalytique directe des flavonoïdes consiste soit en une inhibition directe du site actif d'une enzyme oxydante, soit en un empêchement allostérique de l'enzyme, soit encore en une neutralisation du substrat de l'enzyme. En plus, les flavonoïdes influencent le déroulement des fonctions enzymatiques et cellulaires par divers mécanismes dûs à leur interaction avec le milieu biologique, comme la stabilisation du statut rédox de ce milieu.

◆ *Modulation de la transduction du signal et de l'expression génique*

Les flavonoïdes modulent la transduction du signal en agissant sur le statut rédox de la cellule. Par là-même, ils agissent également sur des fonctions cellulaires. On signale leur action sur l'activation des kinases et donc sur les phosphorylations qui dépendent de ces enzymes. Par cette voie, les flavonoïdes modulent l'expression de plusieurs gènes du cycle et de la survie de la cellule (Soobrattee et al. 2005; Seifried et al. 2007). En inhibant les kinases, les flavonoïdes modulent aussi la capacité de certains facteurs de transcription (NF-κB, activator protein-1, "AP-1", etc...) de se fixer sur l'ADN et de le lire, et régulent ainsi l'expression des gènes, comme, par exemple, ceux codant pour l'expression de la cyclooxygénase-2 (**COX-2**) et des NOS inducibles (Liang et al. 1999; Chen et al. 2000 ; Cheon et al. 2000; Raso et al. 2001; Kim et al. 2004).

Les flavonoïdes, particulièrement le kaempférol, la quercétine et la myricétine (flavonols), modulent également les **phospholipases A₂**. La ginkgetine, la bilobétine et l'amentoflavone (biflavonoïdes) inhibent les phospholipases encore plus que les flavonols et les flavanones (Bauman et al. 1980; Kim et al. 2004; Ghedira 2005). L'activité modulatrice des flavonoïdes sur les enzymes a été observée *in vitro* sur une vingtaine d'autres enzymes ou systèmes d'enzymes (Havsteen 2002).

◆ *Activités anti-inflammatoires*

Des études effectuées sur modèle cellulaire concluent que les flavonoïdes inhibent la production des médiateurs de l'inflammation, comme les cytokines pro-inflammatoires. Leur utilisation dans le traitement d'inflammations chroniques de la muqueuse intestinale a eu des effets thérapeutiques (Nijveldt et al. 2001; Havsteen 2002; Kim et al. 2004; Seifried et al. 2007).

La plante *Ribes nigrum* L. (Grosulariaceae) est d'usage médicinal dans certains pays européens (France, Belgique). Tits et al. (1991) signalent que les extraits aqueux des feuilles de cette plante développent des effets anti-inflammatoires dose-dépendants, et que cette activité est principalement due à la présence d'oligomères des prodelphinidines dans l'extrait. Garbacki et al. (2002) rapportent que les prodelphinidines de ces feuilles baissent la production des prostaglandines par les chondrocytes et développent ainsi des effets anti-inflammatoires. Dans une étude menée sur des animaux traités aux proanthocyanidines isolées des feuilles de la même plante, Garbacki et al. (2004) ont observé une baisse significative du taux des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1 β , ainsi que des chemo-attractants des neutrophiles induits par les cytokines.

La figure 28 schématise un modèle d'intégration de la modulation de la transduction du signal, des fonctions enzymatiques et cellulaires, de l'expression des gènes codant pour des enzymes oxydantes et l'inhibition de la production des médiateurs de l'inflammation par les flavonoïdes (Kim et al. 2004).

Fig.28: Schéma proposé pour les mécanismes modulateurs globaux des flavonoïdes (Kim et al. 2004)

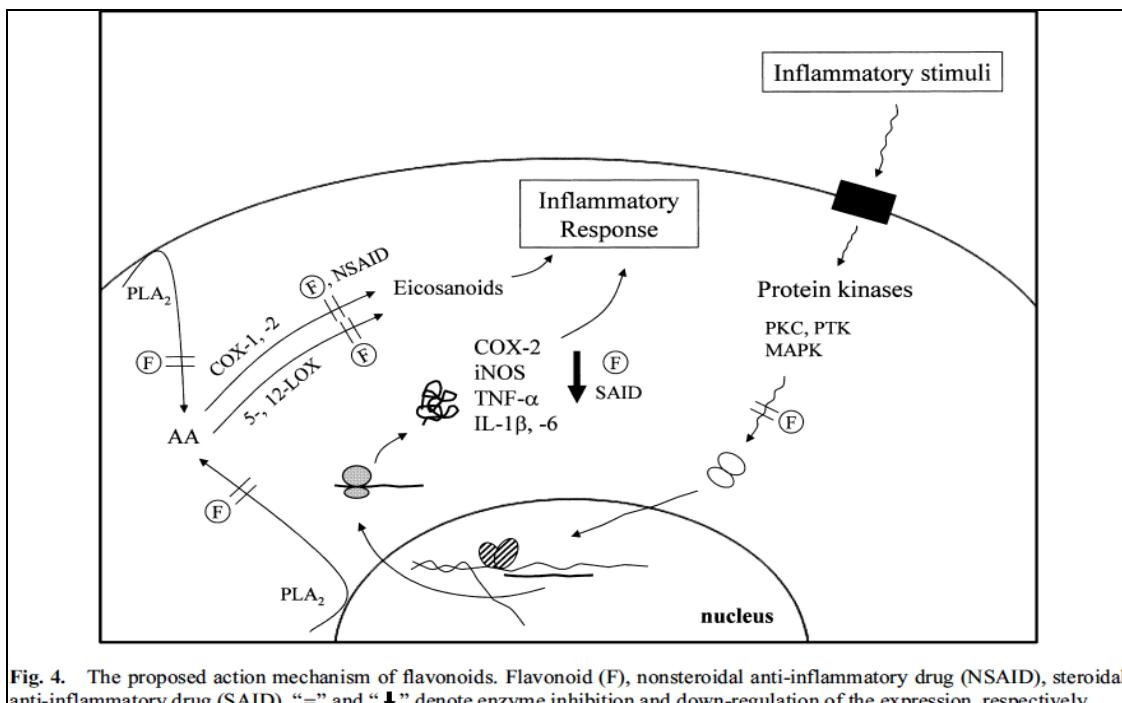


Fig. 4. The proposed action mechanism of flavonoids. Flavonoid (F), nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), steroid anti-inflammatory drug (SAID), “=” and “↓” denote enzyme inhibition and down-regulation of the expression, respectively.

AA = acide arachidonique ; COX = cyclo-oxygénase ; LOX = Lipooxygénase ; MAPK = « mitogen activated » protéine kinase ; PLA₂ = phospholipase 2 ; PKC = protéine kinase C.

◆ Modulation des événements de l'apoptose

En participant au statut rédox et en modulant diverses fonctions cellulaires et enzymatiques, les flavonoïdes favorisent l'apoptose des cellules indésirables ou irréparablement endommagées, mais défavorisent celle d'autres (Ren et al. 2003 ; Serteyn et al. 2003).

À forte concentration, les ROS perturbent l'homéostasie cellulaire en provoquant des lésions sur la mitochondrie. Le cytochrome C et des facteurs initiateurs de l'apoptose (AIF) sont alors libérés de la membrane mitochondriale vers le cytosol. Ces événements, suivis de l'activation des caspases-3 et -9, initient irréversiblement l'apoptose (Wang et al. 1999; Soobrattee et al. 2005). La perméabilité accrue de la membrane mitochondriale provoque la translocation de la protéine cytosolique Bak dans la matrice mitochondriale, où les protéines Bcl-2 et Bcl-XL responsables de la stabilité de la mitochondrie, dimérisent avec Bak et n'assurent plus cette stabilité.

Les flavonoïdes empêchent l'ouverture des pores mitochondriaux en inhibant à la fois la production des ROS et l'expression des protéines Bax et Bak (Mandel et Youdin 2004 ; Soobrattee et al. 2005) ; ils baissent par là le taux d'apoptose.

Par contre, des études rapportent que les flavonoïdes stimulent l'apoptose des cellules cancéreuses (Traganos et al. 1992; Hirano et al. 1994 et 1995) notamment en régulant l'expression des "heat shock proteins" (Wei et al. 1994; Rong et al. 2000; Havsteen 2002), la libération extra-mitochondriale du cytochrome C, l'activation des caspases-9 et -3 (Wang et al. 1999) et en abaissant l'expression des facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X(L) (Wenzel et al. 2000).

◆ *Propriétés anti-cancérigènes*

Les flavonoïdes contribuent à la prévention du cancer en modulant le métabolisme des carcinogènes. Les mécanismes proposés sont multiples et ciblent différentes étapes de la carcinogenèse (Wattenberg 1992 ; Calomme et al. 1996).

Dans la phase I de la carcinogenèse, ils inhibent les activités de certaines mono-oxygénases cytochrome P450-dépendantes (Le Marchand et al. 2000 ; Tsyrlov et al. 1994), génératrices de produits hydroxylés dont l'accumulation forme des composés procancérogènes (Depeint et al. 2002).

Les flavonoïdes induisent aussi l'expression d'enzymes qui, dans la phase II, amènent la détoxicification et l'élimination des substances procarcinogènes (Talaly 1989; Talaly et al. 1995; Sun et al 1998; Birt et al. 2001; Depeint et al. 2002; Ren et al. 2003). Les flavonoïdes inhibent aussi l'aromatase, une enzyme cytochrome P450-dépendante active dans la synthèse de l'œstradiol (Pouget et al. 2002). Ce dernier est actif dans le cancer du sein (Ren et al. 2003).

L'étiologie des cancers est souvent associée à des maladies inflammatoires chroniques comme la gastrite et la pancréatite (Gerhäuser 2001). Les cyclo-oxygénases et les lipoxygénases, qui interviennent dans le métabolisme de l'acide arachidonique et produisent des médiateurs d'inflammation, ainsi que les xanthine- oxydases, sont induites ou activées par des promoteurs de tumeurs (Ren et al. 2003). La quercétine et d'autres flavonoïdes inhibent ces trois familles (Chang et al. 1993; Welton et al. 1998; Havsteen 2002; Kim et al. 2004).

Diverses études montrent que les flavonoïdes inhibent la prolifération de beaucoup de types des cellules humaines cancéreuses, mais ne sont pas toxiques pour des cellules normales (Kuntz et al. 1999; Wang 2000; Wenzel et al. 2000). C'est le cas de la quercétine, la génistéine, la diadzéine (Cook et Samman 1996), la silymarine, la lutéoline, le kaempférol,

l’apigenine et l’épigallocatéchine-3-gallate (Casagrande et Darbon 2001; Choi et al. 2001; Ren et al. 2003).

1.2.7 Autres activités biologiques des polyphénols

Elles sont nombreuses, mais nous n’en citerons que quelques-unes :

- **Protection cardio-vasculaire et anthithrombotique** : l’oxydation des LDL est un facteur déterminant dans la genèse de la plaque d’athérome. En la prévenant, les flavonoïdes baissent le risque d’athérosclérose et assurent une bonne protection cardiovasculaire (Havsteen 2002 ; Libby et al. 2002; Ghedira 2005). Certains flavonoïdes (comme l’hespéritine et l’ériddictiol) abaissent la perméabilité et la fragilité des capillaires et maintiennent au système vasculaire sa performance (Torel et al. 1986). D’autres induisent l’augmentation des taux de cAMP plaquettaires. Par cette voie, ils préviennent l’aggrégation et l’adhésion des plaquettes et, par là, les risques de thrombose (Cook et Samman 1996).
- **Protection anti-allergique** : la cAMP phosphodiésterase et la Ca^{2+} -ATPase induisent ou favorisent la libération d’histamine par les mastocytes et les basophiles. Les flavonoïdes inhibent ces enzymes et assurent ainsi une bonne protection contre les allergies (Havsteen 2002; Ghedira 2005).
- **Protection antivirale et antibactérienne** : Kaul et al. (1985) rapportent que la quercétine baisse la virulence des virus *Herpes simplex* Type 1, des poliovirus type 1, des rhinovirus, des virus de la grippe type 3 et leur réplication intracellulaire. Les flavonoïdes agissent sur la réplication du virus HIV (Brinkworth et al. 1992; Fesen et al. 1993; Middleton et al. 2000). La quercétine est efficace contre l’infection aux *Helicobacter pylori* (Ghedira 2005) ; elle diminue la croissance des bactéries Gram-négatives et d’actinomycètes de la cavité buccale (Narayana et al. 2001 ; Cushnie et Lamb 2005). Les procyanidines et les anthocyanes du jus de Cranberry diminuent le risque d’inflammation des voies urinaires (Avron et al. 1994 ; Howell 2002) ; celles de *Pelargonium sidoides* combattent les infections respiratoires en empêchant efficacement la bactérie d’adhérer sur la paroi des voies respiratoires (Agbabiaka et al. 2008).

- **Activité hormonale**: la génistéine et la diadzéine, désignées aussi comme "phytoœstrogènes", peuvent se fixer sur le récepteur à œstrogènes, moduler l'activité et contrôler ainsi le métabolisme des hormones (Manach et al. 2004; Ghedira 2005).

En inhibant l'aromatase et la 17- β -hydroxystéroïde oxydoréductase, les flavonoïdes contrôlent le taux d'œstrogènes (Middleton et al. 2000; Skibola et Smith 2000; Ghedira 2005).

En bref, les flavonoïdes modulent l'activité d'une multitude d'enzymes, mais grâce à leur faible solubilité en milieu aqueux, à leur faible concentration et à leur courte demie-vie, ils sont largement tolérables et limitent leur influence à des domaines restreints.

1.2.8 Le caractère pro-oxydant, la mutagénicité et la toxicité des AOX

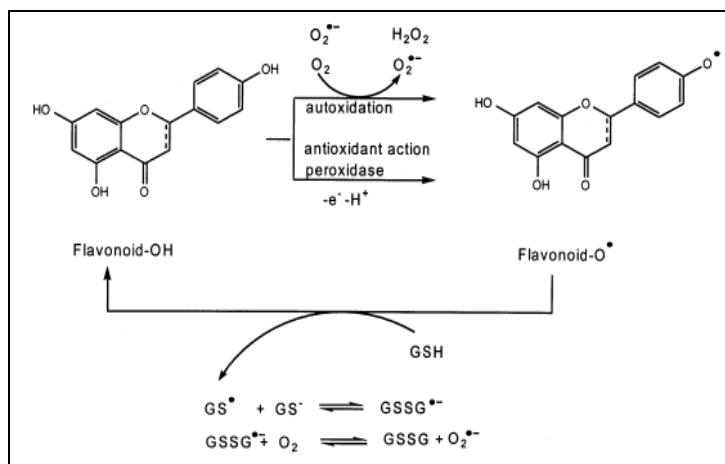
Beaucoup d'études menées auprès de sujets supplémentés en AOX (Vit. C, Vit. E, β -carotène,...) ou en éléments AOX à l'état de trace (par ex. Se) ne confirment pas les effets bénéfiques des AOX contre les lésions dues aux ROS. Elles ont au contraire observé que l'administration d'AOX n'avait conduit à aucun effet d'amélioration et qu'une supplémentation alimentaire en AOX ne diminuait pas le risque d'athérosclérose contrairement à la consommation régulière de fruits et légumes. Dans ces études, le tocophérol, même en association avec le β -carotène, n'a ni amélioré l'athérosclérose, ni inhibé la formation des cellules spumeuses à partir des macrophages, ni amélioré les maladies coronariennes chez des patients fumeurs (Brown et al. 2002, Törnwall et al. 2004).

La diversité des méthodes et des conditions dans lesquelles se déroulent les différentes études, la disparité dans les doses et les modes d'administration des AOX testés, la différence de type d'activité AOX (stoechiométrique, anticatalytique, ou l'un et l'autre) qu'ils développent sont autant de facteurs qui peuvent justifier, au moins partiellement, la divergence et la contradiction des résultats. Robaszkiewicz et al. (2007) rapportent qu'à faible concentration, la quercétine stimule la croissance des cellules A549, mais est cytotoxique aux concentrations élevées.

En plus, dans certaines conditions, la chimie même de certains AOX n'exclut pas l'éventualité d'effets pro-oxydants et toxiques comme des lésions et autres dégâts sur l'ADN qui peuvent provoquer des mutations. Lorsque la Vit. C se trouve en présence des cations métalliques pro-oxydants ou lorsque la Vit. E est à une concentration élevée, elles peuvent provoquer des oxydations.

Les flavonoïdes peuvent également avoir des effets pro-oxydants et former des radicaux libres au lieu de les neutraliser (Laughton et al. 1989; Cao et al. 1997; Rietjens et al. 2002). Ceux dont le **noyau B est de type monophénol** (p. ex. le kaempférol, l'apigénine et la naringénine) peuvent former des quantités importantes de ROS lorsqu'ils sont incubés en présence de GSH d'enzymes oxydantes (Galati et al 2001) (Fig. 29).

Fig. 29: Caractère pro-oxydant des flavonoïdes à noyau B monophénol (Rietjens et al. 2002)



Le radical phénoxyle « Flavonoid-O[•] » oxyde GSH en radical glutathiyle GS[•] et retourne à l'état moléculaire. GS[•] dimérisé avec GS⁻ en formant GSSG^{•-} (anion radical disulfide), lequel réduit O_2 en $O_2^{•-}$ et devient GSSG. L'anion superoxyde ($O_2^{•-}$) est un réducteur et peut à son tour soit réduire GSSG en GSSG^{•-} soit former H_2O_2 par dismutation et donner lieu à une production des ROS.

Les radicaux phénoxyles que forment les flavonoïdes ont un potentiel rédox mono-électronique élevé, qui est en corrélation partielle avec leur comportement pro-oxydant (Rietjens et al. 2002).

Par contre, les flavonoïdes dont le **noyau B est de type catéchol** en 3' et 4' ont un potentiel rédox mono-électronique assez bas (Galati et al. 1999). À l'état intermédiaire de sémi-quinone, ils n'oxydent pas le GSH ; mais après donation d'un second électron, ils sont oxydés en quinones capables d'attaquer l'ADN, de conjuguer GSH en 2' et de former des adduits toxiques (Galati et al. 2001 ; Rietjens et al. 2002).

La capacité des radicaux phénoxyles d'initier une peroxydation lipidique, de former des adduits d'ADN et de provoquer des mutations peut être significative en milieu biologique (Rietjens et al. 2002). La quercétine est un des flavonoïdes les plus étudiés; sa mutagénicité a été observée notamment sur des cellules CHO et des lymphocytes humains (Skibola et Smith

2000). Dans les noyaux des cellules hépatiques isolées des rats traités à la myricétine, la naringénine et la morine, les dégradations observées sur l'ADN pourraient être dues aux ROS formées au cours du « redox cycling » des radicaux phenoxyles (Sahu et Gray 1993 et 1999).

En conclusion, les conséquences délétères des flavonoïdes sont associées à des concentrations fréquemment élevées ou à la présence des facteurs pro-oxydants. Les effets protecteurs sont associés à une consommation régulière de fruits, légumes et produits de soja. Ils ont été le plus observés chez les asiatiques et les végétariens (Skibola et Smith 2000). Les asiatiques atteindraient un apport journalier moyen de 68 mg de flavonols et de 20-240 mg d'isoflavones; il est peu vraisemblable que des apports journaliers semblables à ces moyennes provoquent des effets délétères à la santé (Skibola et Smith 2000; Rietjens et al. 2002). La mutagénicité et cytotoxicité supposent l'apport régulier et prolongé de grandes quantités de flavonoïdes qu'un régime alimentaire équilibré et diversifié ne saurait pas atteindre (Cook et Samman 1996 ; Skibola et Smith 2000; Rietjens et al. 2002).

1.2.9 Critères d'un bon antioxydant exogène

Un bon AOX (d'origine alimentaire) devrait remplir certaines conditions minimales :

- Il doit être facilement soluble (hydrosoluble ou liposoluble) dans le milieu biologique, résister aux conditions de transformation et de préparation culinaire, aux enzymes des voies digestives, atteindre un taux suffisant d'absorption et garder sa forme active jusqu'au site où il doit développer son activité.
- Il doit agir à faible concentration par rapport au substrat oxydable à protéger et être présent assez tôt au site à protéger pour y prévenir efficacement l'initiation de l'oxydation.
- Aux conditions physiologiques, il doit réagir avec les ROS et autres radicaux libres beaucoup plus vite que ceux-ci ne le feraient avec les molécules à protéger. Il doit développer une activité à la fois stœchiométrique, anticatalytique et modulatrice, et retarder ou inhiber de manière significative l'oxydation du substrat à protéger.
- Le radical libre qu'il forme après sa réaction doit être stable et ses dérivés ne doivent être ni réactifs ni toxiques (Rice-Evans et al.1996 ; Halliwell 1990 ; Deby 2009a).

1.2.10 Types de techniques de mesure de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes mesurent l'activité AOX d'un composé. Si le système expérimental est acellulaire et non-enzymatique, les méthodes ciblent l'**activité stœchiométrique**, qui inclue l'**activité antiradicalaire**; si l'étude s'applique sur des enzymes ou des cellules, les méthodes peuvent cibler à la fois l'**activité stœchiométrique** et l'**activité anticatalytique**. Il est également possible de mesurer l'activité AOX de type **métabolique**.

Les méthodes les plus courantes sont stœchiométriques; elles analysent la capacité des AOX présents dans un système de neutraliser les espèces réactives qui y sont produites. Par contre, les méthodes anticatalytiques étudient si les AOX présents dans un système peuvent abaisser la production de ces espèces en agissant sur les enzymes oxydantes présentes dans ce système.

Ci-dessous, nous présentons brièvement à titre d'exemple, le principe de base de quelques techniques de mesure de l'activité AOX de type :

- **stœchiométrique** comme la technique à la N-N'-**diméthyl-p-phénylène diamine (DMPD)**,
- **antiradicalaire** comme le **test au radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH·)** et la **résonance paramagnétique électronique (RPE)**,
- **métabolique** comme le **test ELISA** qui mesure l'ampleur de la dégranulation des neutrophiles activés et la quantité MPO qu'ils libèrent en milieu extracellulaire ;
- **stœchiométrique et anticatalytique** comme le test de chimioluminescence (CL),
- **anticatalytique** comme la technique SIEFED.

➤ *Méthode de détection d'une activité stœchiométrique*

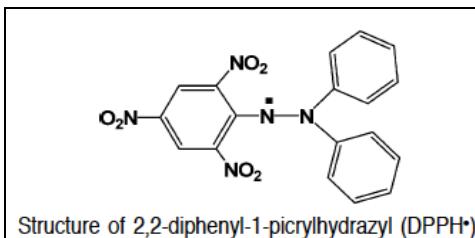
• *Test à la N-N'-diméthyl-p-phénylène diamine (DMPD)*

Dans une solution oxydante (FeCl_3) et à un pH acide, la DMPD est oxydée en DMPD^{++} , un cation radical stable et de coloration caractéristique ($\lambda = 505 \text{ nm}$). Plus l'activité AOX du composé étudié est élevée, moins il y aura coloration et absorbance (Sánchez-Moreno 2002).

➤ **Méthode de détection d'une activité antiradicalaire**

- *Test au radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•])*

Fig. 30: Structure du radical DPPH[•] (Prior et al. 2005)



Le DPPH[•] est un radical stable de coloration violette (λ 515 nm). La capacité de l'échantillon de réduire DPPH[•] est mesurée soit par résonance paramagnétique électronique (RPE), soit en suivant la baisse de l'absorbance en spectrophotométrie (Antolovich et al. 2001; Prior et al. 2005).

- *Résonance paramagnétique électronique (RPE)*

Cette technique mesure la concentration d'espèces radicalaires dans un échantillon placé dans l'entre-fer d'un aimant, après les avoir "stabilisées" sur des "spin trap" (5,5-diméthyl-pyrroline-N-oxyde, **DMPO** ; α -(4-pyridyl-1-oxyde)-N-tert-butylnitron, **POBN** ; *tert*-nitrosobutane, tNB ; α -phényl-*tert*-butylnitron, PBN ; etc). Au passage d'une onde à travers l'échantillon, la présence d'espèces radicalaires donne lieu à un signal qui est présenté sur écran sous forme de raie. L'activité AOX du composé qui est étudié neutralise les espèces radicalaires et abaisse de manière proportionnelle l'amplitude des raies enregistrées (Antolovich et al. 2001; Böhm et Schlesier 2004 ; Mouithys-Mickalad 2007).

➤ **Méthode de détection d'une activité stoichiométrique et / ou anticatalytique**

- *Test de chimioluminescence (CL)*

Le luminol, la lucigénine, la pholazine (une protéine luminescente), etc réagissent avec les ROS en formant des dérivés d'un état énergétique excité et dont le passage à l'état de base est accompagné de luminescence. Toute inhibition de cette réaction abaisse la luminescence.

La lucigénine (Bis-*N*-méthylacridinium) réagit avec O₂^{•-} en se clivant en deux molécules symétriques de 2 *N*- méthylacridone dont l'une est à l'état excité. Cette réaction est mise à

profit pour mesurer l'activité oxydante globale des cellules productrices des ROS en présence d'un AOX (Yunbo et al. 1998, Prior et al. 2005). Dans ce cas, l'activité AOX observée pour un composé ou un extrait est de type aussi bien stoechiométrique qu'anticatalytique.

➤ ***Méthode de détection d'une activité métabolique***

• *Le test ELISA de la MPO*

Lorsque leur activation est très forte et/ ou dure longtemps, les neutrophiles peuvent libérer le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire, y compris des enzymes oxydantes. Cette dégranulation est le résultat des métabolismes complexes. Le test **ELISA de la MPO** (Franck et al. 2005) mesure la capacité des AOX d'inhiber ces métabolismes et d'abaisser la quantité de MPO libérée.

➤ ***Méthode de détection d'une activité anticatalytique***

• *La méthode SIEFED*

Cette technique capture la MPO sur des anticorps immobilisés au fond des plaques et analyse son activité après avoir éliminé tous les autres composants du milieu réactif et écarté toute source d'interférence (Franck et al. 2006).

Avant sa capture par les anticorps, la MPO est pré-incubée avec l'AOX. *N*-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red[®]) sert de réducteur pour révéler l'activité de l'enzyme. Le produit de son oxydation est coloré et très fluorescent (λ_{excit} 530 nm, $\lambda_{\text{ém}}$ 590 nm ; Dikalov et al. 2007). Si une baisse d'activité de l'enzyme est observée alors que l'AOX a été éliminé avec le milieu réactif avant révélation de l'activité enzymatique, c'est la preuve que l'AOX s'est fixé sur le site actif de l'enzyme ou en tout cas a induit une altération de la structure de l'enzyme de manière à modifier l'activité enzymatique.

En conclusion, chaque méthode a des avantages et pourrait avoir des inconvénients. Combiner plusieurs méthodes permet des résultats plus diversifiés. La RPE a l'avantage d'immobiliser le radical libre dans le "spin trap" lors de l'enregistrement de la raie. Le SIEFED élimine du milieu réactif tous les composés pouvant interférer avec l'enzyme avant d'en révéler l'activité : il constitue la seule méthode indiscutable d'action anticatalytique pour un antioxydant.

1.3 Références bibliographiques

- Adelakun O E, Oyelade O J, Ade-Omowaye B I O, Adeyemi I A, Van de Venter M (2009) Chemical composition and the antioxidative properties of Nigerian Okra Seed (*Abelmoschus esculentus* Moench) flour. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1123-26
- Agbabiaka T B, Guo R, Ernst E (2008) *Pelargonium sidoides* for acute bronchitis : a systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine* 15, 378-85
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H (2003) Phosphorylation of p47^{phox} directs phox homology domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4474-79
- Alderton W K, Cooper C E, Knowles R G (2001) Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615
- Amiot M J, Tacchini M, Aubert S, Nicolas J (1992) Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* 57, 958-62
- Anand P, Kunnumakara A B, Sundaram C, Harikumar K B, Tharakan S T, Lai O S et al. (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 25(9), 2097-116
- Antolovich M, Prenzler P D, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2001) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-98
- Aruoma O I (1994) Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Meth. in Enzymol.* 233, 57-66
- Avron J, Monane M, Gurwitz J H, Glynn R J, Choodnovsky I, Lipsitz L A (1994) Reduction of bacteriuria und pyuria after ingestion of cranberry juice. *Jama* 271, 751-54
- Aziz A A, Edwards C A, Lean M E J, Crozier A (1998) Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-β-glucoside and isorhamnetin-4'-O-β-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Rad. Res.* 29, 257-69
- Babior B M, Kipnes R S, Curnutte J T (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *T Clin Invest* 52, 741-44
- Babior B M (1999) NADPH oxidase : An Update. *Blood* 93(5), 1464-76
- Baudin B (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, 2 (1), 43-52
- Bauman J, Bruchhausen F V, Wurm G (1980) Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* 20, 627-39
- Beck K-F, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer U K, Mühl H, Pfeilschifter J (1999) Inducible NO Synthase : Role in cellular signaling. *J. Experimental Biol* 202, 645-53
- Beecher G R (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* 133, 3248S - 54S

- Benzi G, Moretti A (1995) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease ? *Neurobiol. Of Aging* 16(4), 661-64
- Biesalski H K, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pölert W, Puchstein C, Stähelin H B (2004) Ernährungsmedizin. Thieme 3. Auflage Stuttgart p. 81
- Birt D H, Hendrich S, Wang W (2001) Dietary agents in cancer prevention : flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90, 157-77
- Böhm V, Schlesier K (2004) Methods to evaluate the antioxidant activity, in Dris R, Jain S M (Eds) Production practices and quality assessment of food crops, Vol 3 "Quality handling and evaluation", Kluwer Academic publishers, Netherlands, pp 55-71
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants. Determination of radical-scavenging efficiencies. *Meth. Enzym.* 186, 343-55
- Brand M D, Affourtit C, Esteves T C, Green K, Lambert A J, Miwa S, Pakay J L, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide : production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Rad Biol Med* 37, 755-67
- Brinkworth R T, Stoermer M J, Fairlie D P (1992) Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2, 631-37
- Brown B G, Cheung M C, Lee A C, Zhao X-Q, Chait A (2002) Antioxidant vitamins and lipid therapy. End of a long romance ? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1535-46
- Burton G W, Traber M G (1990) Vitamin E : antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 357-82
- Butterfield D A, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid b-peptid. *Trends in Molec. Med.* 7(12), 548-54
- Calderón-Montano J M, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro (2011) A review of the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Rev. in Med. Chem.* 11, 298-344
- Calomme M, Pieters L, Vlentinck A, Vanden Berghe D (1996) Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med.* 62, 222-26
- Cao G, Alessio H M, Cutler R G (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 303-11
- Cao G, Sofic E, Prior R L (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids : structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* 22, 749-60
- Carr A, Frei B (1999) Does vitamin C act as a pro-oxidant in physiological conditions? *FASEB J* 13, 1007-24
- Casagrande F, Darbon J M (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells : Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 61, 1205-15
- Cathcart M K (2004) Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages. Contributions to Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vacs Biol.* 24, 23-28

- Chang W S, Lee Y J, Lu F J, Chiang H C (1993) Inhibitory effect of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 13, 2165-70
- Chen Y C, Yang L L, Lee T J F (2000). Oroxylin A-inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX – 2 gene expression via suppression of nuclear factor κ-B activation. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1445-57
- Cheon B S, Kim Y H, Son K H, Chang H W, Kang S S, Kim H P (2000) Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7. *Planta Med.* 66, 596-600
- Choi J A, Kim J Y, Lee J Y, Kang C M, Kwon H J, Yoo Y D et al. (2001) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J. Oncol.* 19, 837-44
- Chun O K, Chung S J, Song W O (2007) Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *J. Nutr.* 137, 1244–52
- Cook N C, Samman S (1996) Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7, 66-76
- Cox J A, Jeng A Y, Sharkey N A, Blumberg P M, Tauber A I (1985) Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J. Clin. Invest.* 76, 1932-38
- Crozet A, de Sus-Rousset H, de Durfort S-J (2012_a) *Crocus sativus* L. (Iridaceae), le safran (I) *Phytother.* 10, 121-25
- Crozet A, de Sus-Rousset H, de Durfort S-J (2012_b) *Crocus sativus* L. (Iridaceae), le safran (II) *Phytother.* 10, 186-93
- Curnutte J T (1993) Chronic granulomatous disease : the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 67 (Issue 3, Part 2), S2-15
- Cushnie T P, Lamb A J (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 343-56
- Day A J, Canada F J, Diaz J C, Kroon P A, McLauchlan W R, Faulds C B et al. (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468, 166-70
- Deby C (2009a) Initiation au métabolisme de l’oxygène. www.2/ulg.ac.be/cord/initiation au met oxygene/sommaire.html/
- Deby C (2009b) L’oxygène en pathologie des mammifères. Partim I. www2/ulg.ac.be/cord/oxygene pathologie mammifères/oxypath.html/
- Deby-Dupont G, Deby C, Lamy M (1999) Neutrophil myeloperoxidase : its role in health and disease. *Intensivmed* 36, 500-13
- Deby-Dupont G, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D, Lamy M, Deby C (2005) Resveratrol and curcumin reduce the respiratory burst of *Chlamydia*-primed THP-1 cells. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 333, 21-27
- DeCoursey T E, Ligeti E (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci* 62, 2173-93

- Defraigne J O (2005) Un mécanisme physiologique central à l'origine des complications du diabète ? *Rev. Méd. Liège* 60 (5-6), 472-78
- Dekker L V, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J (2000) Protein kinase C- β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J* 347, 285-89
- DeLeo F R, Quinn M T (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase : molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol.* 60, 677-91
- Depeint F, Gee J M, Williamson G, Johnson I T (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 97-103
- Dewanto V, Wu X, Adom K K, Liu R H (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 50, 3010-14
- Dikalov S, Griendling K K, Harrison D G (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49, 717-27
- Di Simplicio P, Cheeseman K H, Slater T E (1991) The reactivity of the SH group of bovine serum albumine with free radicals. *Free Rad Res Comm* 14, 253-62
- Doba T, Burton G W, Ingold, K U (1985) Antioxidant and co-antioxidant effect of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analog, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 835, 298-303
- Doussiere J, Gaillard J, Vignais P V (1996) Electron transfer across the $O_2^{\bullet-}$ generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry* 35 (41), 13400-10
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47-95
- Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier P, Le Moël G, Steghens J-P, Van Kappel A, Nabet F (1999) Les caroténoïdes. *Annales de Biologie Clinique* 57 (2), 169-83
- Faurschou M, Borregaard (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5 (14), 1317-27
- Favier A (2002) Comment mettre en évidence le stress oxydant chez l'homme sain ou malade. *Myalgies International* 2 (3), 4-9
- Favier A (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique - novembre décembre*, 108-15
- Fesen M R, Kohn K W, Leutertre F, Pommier Y (1993) Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2399-2403
- 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

- Franck T, Kohnen S, Grulke S, Neven P, Goutman Y, Peters F, Pirotte B, Deby-Dupont G, Serteyn D (2008) Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and myeloperoxidase activity. *Physiol. Res.* 57, 577-87
- Frankel E N, Waterhouse A L, Teissedre P L (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agr. Food Chem.* 43, 890-94
- Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien P J (1999) Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 521-25
- Galati G, Moridani M Y, Chan T S, O'Brien P J (2001) Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin : glutathion oxidation and conjugation. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 370- 82
- Garbacki N, Angenot L, Bassleer C, Damas J, Tits M (2002) Effects of prodelphinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365, 434-41
- Garbacki N, Tits M, Angenot L, Damas J (2004) Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacology* 4, 25. doi : 10.1186/1471-2210-4-25
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D (2003) Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique, novembre – décembre*, 91-96
- Gee J M, Dupont M S, Rhodes M J C, Johnson I T (1998) Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Rad. Biol. Med.* 25, 19-25
- Gerhäuser C (2001) Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe. *Aktuel. Ernaehr. Med.* 26, 137-43
- Ghedira K (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4, 162-69
- Goldsby R, Kindt T J, Osborne B A (2001) Immunologie, 4^{ème} éd. Dunod, Paris
- Grennberg S, Silverstein S C (1993) Phagocytosis, in Paul W E (Ed.) Fundamental Immunology, *Third ed.*, Raven Press, New York, p 941-64
- Griveau J F, Le Lannou D (1997) Reactive oxygen species and human spermatozoa : physiology and pathology. *Int. J. Andrology* 20, 61-69
- Groemping Y, Rittinger K (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase : a structural perspective. *Biochem J* 386, 401-16
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J O, Charlier C, Chapelle J P (2007) Le stress oxydant. *Rev. Méd. Liège* 62(10), 628-38
- Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 9 (1),1-32
- Hammerstone J F, Lazarus S A, Schmitz H H (2000) Proanthocyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.* 130, 2086S-95S

- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557-63.
- Handelman G J, Cao G, Walter M F, Nightingale Z D, Paul G L, Prior R L, Blumberg J B (1999) Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J. Agr. Food Chem.* 47, 4888-93
- Harborne J B, Williams C A (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504
- Hard H (1989) Organische Chemie : ein kurzes Lehrbuch. VHC Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany
- Havsteen B H (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67-202
- Hertog M G L, Hollman P C H, Katan M B, Kromhout D (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer* 20, 21-29
- Heyworth P G, Cross A R, Curnutte J T (2003) Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.* 15(5), 578-84
- Hirano T, Gotoh M, Oka K (1994) Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci.* 55, 1061-69
- Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K (1995) Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less citotoxicity on normal lymphocytes. *Br. J. Cancer* 72, 1380-88
- Hobbs A J, Higgs A, Moncada S (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 191-220
- Hollman P C, de Vries J H M, van Leeuwen S D, Mengelers M J B, Katan M B (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1276-82
- Hollman P C, Katan M B (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. & Pharmacother.* 51, 305-10
- Howell A B (2002) Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 273-78
- Houstis N, Rosen E D, Lander, E S (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944-48. doi : 10.1038/nature04634
- Hunt J, Wolff S (1991) The role of histidine residues in the non-enzyme covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *Free Rad Res* 14(4), 279-87
- Ioannou I, Hafsa I, Hamdi S, Charbonnel C, Ghoul M (2012) Review of the effects of food processing anf formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *J. of Food Engineering* 111, 208-17
- Jacob R A (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* 15 (5), 755-66

- Jeong S M, Kim S Y, Kim D R, Jo S C, Nam K C, Ahn D U, Lee S C (2004) Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts of citrus peels. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3389-93
- Ørberg L V (1998) Flavonoids and other naturally occurring antioxidants. Physico-chemical aspects of their antioxidant mode of action. The Danish Veterinary and Food Administration. Søeberg DK
- Kaul T M, Middleton E, Ogra P L (1985) Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* 15, 71-79
- 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
- Klebanoff S J (2005) Myeloperoxidase : friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598-625
- Kohnen S, Franck T, van Antwerpen P, Boudjeltia K Z, Mouithys-Mickalad A, Deby C, Moguilevsky N, Deby-Dupont G, Lamy M, Serteyn D (2007) Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8080-87
- Komatsu Y, Suematsu S, Hisanobu Y, Saigo H, Matsuda R, Hara K (1993) Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Biosci. Biotechnol. and Biochem.* 57, 907-10
- Krinsky N I (1989) Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. & Med* 7, 617-35
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J. Nutr.* 38, 133-42
- Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D (1993) Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *Z. Lebensm Unters Forsch* 197, 20-23
- Lambeth J D, Kawaahara T, Diebold B (2007) Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Rad. Biol. & Med* 43, 319-331
- Laughton M J, Halliwell B, Evans P J, Hoult J R S (1989) Antioxidant and pro-oxidant actions of the phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.* 38, 2859-65
- Lee W L, Harrison R E, Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 5, (14), 1299-1306
- Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffer A E M F, Rietjens I M C M (2001) The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 869-81
- Le Marchand L, Murphy S P, Hankin J H, Wilkens L R, Kolonel L N (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92, 154-60
- Liang Y C, Huang Y T, Tsai S H, Lin Shiao S Y, Chen C F, Lin J K (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945-52

- Liang Y C, May C Y, Foon C S, Ngan M A, Hock C C, Basiron Y (2006) The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. *Fuel* 85, 867-70
- Libby P, Ridker P M, Maseri A (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-43
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780-87
- Lotito S B, Frei B (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans : Cause, consequence, or epiphenomen? *Free Rad. Biol. & Med* 41, 1727-46
- Lucarini M, Pedrielli P, Pedulli G F (1996) Bond dissociation energies of O-H bonds in substituted phenols from equilibration studies. *J. Organic Chem.* 61, 9259-63
- Mahgoub S E O, Hudson, B J F (1985) Inhibition of the pro-oxidant activity of copper by primary antioxidants in lard. *Food Chem.* 16, 97-101
- Malle E, Furtmüller P G, Sattler W, Obinger C (2007) Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br. J. Pharmacol.* 152, 838-54
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémy C, Jiménez L (2004) Polyphenols : food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-47
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Nutr.* 81, 230S-42S
- Mandel S, Youdin M (2004) Catechin polyphenols : neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 304-17
- Meyer A S, Heinonen M, Frankel E N (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.* 61, 69-80
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T C (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-75
- Miller N J, Diplock A T, Rice-Evans C, Davies M J, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407-12
- Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi A M M, Pietraforte D (1998) Bilirubin Is an Effective Antioxidant of Peroxynitrite- Mediated Protein Oxidation in Human Blood Plasma. *Arch. Biochem. & Biophysics* 352 (2), 165-74
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K (1999) Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1083-91
- Morales F J, Jiménez-Pérez S (2000) Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry* 72, 119-25

Mouithys-Mickalad A A (2007) Détection spécifique et fiable des espèces activées de l'oxygène et de l'azote *in vitro* et *in vivo* par résonance paramagnétique électronique (RPE). Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur. Université de Liège.

Murphy M P (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13

Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T (1997) Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-) - epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1981-85

Narayana K R, Reddy M S, Chaluvadi M R, Krishna D R (2001) Bioflavonoids classification : pharmacological, biochemical effects, therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 33, 2-16

Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants : structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1453-59

Nijveldt R J, van Nood E, van Hoorn D EC, Boelens P G, van Norren K, van Leeuwen P AM (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418-25

Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E and β-carotene. *Am J Clin Nutr* 62 (suppl), 1322S-6S

Oboh G (2004) Effect of blanching on the antioxidant activity of some tropical green leafy vegetables. *LWT* 39, 513-17

Olthof M R, Hollman P C H, Katan M B (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131, 66-71

Orrenius S (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metabolism Rev* 39, 443-55

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007) Mitochondrial oxidative stress : Implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 143-83

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-22

Ovaskainen M -L, Törrönen R, Koponen J M, Sikkon H, Hjellström J, Reinivuo H, Mattila P. (2008) Dietary intake and major food sources of polyphenols in finnish adults. *J. Nutr.* 138, 562-66

Palozza P, Krinsky N I (1992) Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro* : an overview. *Methods in Enzymology* 213, 403-20

Pedrielli P, Skibsted L H (2002) Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)catechin on α-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7138-44

Pietta P-G (2000) Flavonoids as antioxidants. *J.Nat. Prod.* 63, 1035-42

Plumb G W, Garcia Conessa M T, Kroon P A, Rhodes M, Ridley S, Williamson G (1999) Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J. Sci. Food Agric.* 79, 390-92

- Pouget C, Fagnere C, Basly J P, Besson A E, Champavier Y, Habrioux G, Chulia A J (2002) Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. *Pharm. Res.* 19, 286-91
- Prior R L, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem* 53, 4290-4320
- Rajalakshmi D, Narasimhan S. Food antioxidants : sources and methods of evaluation. In Madhavi D L, Despande S S, Salunke D K (Eds) Food antioxidants : Technological, toxicological and Health perspectives. Marcel Dekker, New York 1996
- Raso G M, Meli R, Di Carlo G, Pacillio M, Di Carlo R (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 68, 921-31
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L (2003) Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med. Res. Reviews* 23, 519-34
- Rice-Evans C A, Miller N J, Bolwell P G, Bramley P M, Pridham J B (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* 22, 375-83
- Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20 (7), 933-56
- Rice-Evans C, Spencer J P E, Schroeter H, Rechner A R (2000) Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms *in vivo*. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 17, 1-4
- Rietjens I M C M, Boersma M G, de Haan L, Spenkelink B, Awad H M, Cnubben N H P et al. (2002) The pro-oxidant chemistry of natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11, 321-33
- Robaszkiewicz A, Balcerzyk A, Bartosz G (2007) Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology Int.* 31, 1245-50
- Roche M, Rondeau P, Singh N R, Tarnus E, Bourdon E (2008) The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582, 1783-87
- Rong Y, Yang E B, Zhang K, Mack P (2000) Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U 937 *in vitro* and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res.* 20, 4339-45
- Rosenberg H F, Gallin J I (1999) Inflammation, in Fundamental Immunology 4th ed. W E Paul Editor, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, p 1051-66
- Rota C, Fann Y, Mason R P (1999) Phenoxy free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7' dichlorofluorescein by horseradish peroxidase : possible consequences for oxidative stress measurements. *J Biologic Chem* 274, 28161-68
- Ruberto G, Baratta M T (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69, 167-74
- Sahu S C, Gray G C (1993) Interaction of flavonoids, trace metals, and oxygen : nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett.* 70 (1,2), 73-79
- Sahu S C, Gray G C (1999) Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol.* 35 (5), 443-47

- Sánchez-Moreno C (2002) Review : Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.* 8 (3), 121-37
- Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Food Sci. Agric.* 80, 1094-1117
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 30, 2073S-85S
- Schulz J M, Herrmann K (1980) Über das Vorkommen der Hydroxybenzoësäuren und Hydroxyzimtsäuren in Gewürzen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 171, 193-99
- Seifried H E, Anderson D E, Fisher E I, Milner J A (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 18, 567-79
- Serteyn D, Mouithys-Mickalad A, Franck T, Grulke S, Lamy M, Deby C, Deby-Dupont G (2002) La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Ann. Méd. Vét.* 146, 137-53
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G (2003) La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét* 147, 79-93
- Shahidi F, Janitha P K, Wanasundara P D (1992) Phenolic antioxidants. *Cr. Rev. in Food Sc. Nutr.* 32 (1), 67-103
- Shivaprasad H N, Mohan S, Kharya M D, Shiradkar M R, Lakshman K (2005) *In vitro* models for antioxidant activity evaluation : a review. *Latest Reviews*, Vol 3, Issue 4. www.pharmainfo.net/volumes-and-issues/2005/vol-3-issue-4
- Skibola C F, Smith M T (2000) Potential Health impact of excessive flavonoid intake. *Free Rad. Biol. Med.* 29 (3-4), 375-83
- Soobrattee M A, Neergheen V S, Luximon-Ramma A, Aruoma O I, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : Mechanisms and actions. *Mutation Research* 579, 200-13
- Stadtman E R, Berlett B S (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 485-94
- St Angelo A J (1996) Lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36 (3), 175-224
- Sumimoto H, Sakamoto N, Nozaki M, Sakaki Y, Takeshige K, Minakami S (1992) Cytochrome b₅₅₈, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Comm* 186, 1368-75
- Sun X Y, Plouzek C A, Henry J P, Wang T T, Phang J M (1998) Increased UDP-glucuronyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 58, 2379-84
- Takeya R, Sumimoto H (2003) Molecular mechanism for activation of superoxide – producing NADPH – oxidases. *Molecules and Cells* 16 (3), 271 - 77
- Talaly P (1989) Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* 28, 237-50

- Talaly P, Fahey J W, Holtzclaw W D, Prestera T, Zhang Y (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.* 82-83, 173-79
- 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
- Thannickal V J, Fanburg B L (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 279, L1005-28
- Tits M, Angenot L, Damas J, Dierckxsens Y, Poukens P (1991) Anti-Inflammatory Prodelphinidins from Black Current (*Ribes nigrum*) Leaves. *Planta Med.* 57, Supplement Issue 2, 24
- Törnwall M E, Virtamo J, Korhonen P A, Virtanen M J, Taylor P R, Albanes D, Huttunen J K (2004) Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *Eur. Heart J* 25(13), 1171-78
doi :10.1016/j.ehj.2004.05.007
- 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
- Torel J, Cillard J, Cillard P (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. *Phytochemistry* 25, 383-85
- Traganos F, Ardel B, Halko M, Bruno S, Darzynkiewicz Z (1992) Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res.* 52, 6200-08
- Tsushida T, Svzuki M (1996) Content of flavonol glucosides and some properties of enzymes metabolizing the glucosides in onion. 3. Flavonoids in fruits and vegetables. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 43, 642-49
- Tsyrlov I B, Mikhailenko V M, Gelboin H V (1994) Isozyme and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYPA1 P-450s to different flavonoids. *Biochem. Biophys. Acta* 1205, 325-35
- Turrens J F (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol* 552 (2), 335-44
- USDA Database for the flavonoid content of selected foods ; Release 2.1, January 2007.
<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
- 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. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 39, 44-84
- van Acker S A B E, van den Berg D, Tromp M N J L, Griffioen D H, van Bennekom W P, van den Vijgh W J F, Bast A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. & Med* 20, 331-42
- Wade A M, Tucker H N (1998) Antioxidant characteristics of L-hisidine. *J. Nutr. Biochem* 9, 308-15
- Walgren R A, Walle U K, Walle T (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacol.* 55, 1721-27

- Walgren R A, Lin J T, Kinne R K H, Walle T (2000) Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics* 294, 837-43
- Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad. Biol. & Med.* 36 (7), 829-37
- Wang I K, Lin-Shiau S Y, Lin J K (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome C release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1517-25
- Wang H K (2000) The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Invest Drugs* 9, 2103-19
- Wattenberg L W (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.* 52, 2085s-91s
- Wei Y O, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Ulchida A (1994) Induction of apoptosis by quercetin : involvement of heat shock protein. *Cancer Res.* 4, 4952-57
- Welton A F, Hurley J, Will P (1998) Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280, 301-12
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel M D, Daniel H (2000) Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 60, 3823-31
- Wheeler D S, Wheeler W (2004) The medicinal chemistry of tea. *Drug Develop. Res.* 61, 45-65
- Winkel B S J, The biosynthesis of flavonoids, in Grotewold E (Ed) The Science of flavonoids. Springer, New York 2006, Ch 3, pp 71-95
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126, 485-93
- Wood P M (1987) The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *Trend Biochem Sci* 12, 857-78
- 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, 1173-83
- www.chups.jussieu.fr/polys/anapath
- Yang C S, Lee M J, Chen L S (1999) Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 8, 83-89
- Yao L H, Jiang Y M, Shi J, Tomás-Barberán F A, Datta N, Singanayagam R, Chen S S (2004) Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for Hum. Nutr.* 59, 113-22
- Yilmaz Y, Toledo R (2005) Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry* 93, 273-78
- Yunbo L, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Jay L, Zweier J L, Trush M A (1998) Validation of lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J. Biologic. Chem.* 273 (4), 2015-23

2 Présentation des plantes sélectionnées

Au départ de notre travail, onze plantes alimentaires avaient été sélectionnées. Leurs polyphénols sont étudiés au Ch 3. Après un screening biochimique, nous avons retenu quatre d'entre-elles pour effectuer des études biochimiques plus poussées. Il s'agit d'*Abelmoschus esculentus*, d'*Hibiscus acetosella*, de *Manihot esculenta* et de *Pteridium aquilinum*.

Cette présentation décrit quelques aspects de ces quatre plantes du point de vue de l'alimentation humaine et de leur usage dans la médecine traditionnelle, pour les cas où cet usage est signalé dans la littérature. Pour les aspects botaniques, nous nous limiterons à présenter la classification de chacune de ces plantes dans la systématique du règne végétal.

Pour le manioc, dont les feuilles et les racines sont des denrées alimentaires de base pour les populations du Bas- Congo (et d'autres encore), nous présenterons brièvement l'importance économique. Les aspects toxicologiques du gombo (*Abelmoschus esculentus*), du manioc (genre *Manihot*) et de la fougère - aigle (*Pteridium*) seront également abordés.

2.1 *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench

Fig. 1: <i>Abelmoschus esculentus</i> (Linn) Moench (www.jardinsdumonde.org)	Tab. 1: Classification (USDA Natural Resources Conservation Service, http://plants.usda.gov)																				
	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%;">Règne</td><td><i>Plantae</i></td></tr> <tr> <td>Sous-règne</td><td><i>Tracheobionta</i></td></tr> <tr> <td>Superdivision</td><td><i>Spermatophyta</i></td></tr> <tr> <td>Division</td><td><i>Magnoliophyta</i></td></tr> <tr> <td>Classe</td><td><i>Magnoliopsida</i></td></tr> <tr> <td>Sous-classe</td><td><i>Dilleniidae</i></td></tr> <tr> <td>Ordre</td><td><i>Malvales</i></td></tr> <tr> <td>Famille</td><td><i>Malvaceae</i></td></tr> <tr> <td>Genre</td><td><i>Abelmoschus</i> Medik.</td></tr> <tr> <td>Espèce</td><td><i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench</td></tr> </table>	Règne	<i>Plantae</i>	Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>	Superdivision	<i>Spermatophyta</i>	Division	<i>Magnoliophyta</i>	Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>	Ordre	<i>Malvales</i>	Famille	<i>Malvaceae</i>	Genre	<i>Abelmoschus</i> Medik.	Espèce	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench
Règne	<i>Plantae</i>																				
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>																				
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>																				
Division	<i>Magnoliophyta</i>																				
Classe	<i>Magnoliopsida</i>																				
Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>																				
Ordre	<i>Malvales</i>																				
Famille	<i>Malvaceae</i>																				
Genre	<i>Abelmoschus</i> Medik.																				
Espèce	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench																				

Nom français : Gombo

Nom vernaculaire : Dongo - dongo

Utilisation en alimentation humaine

Au Bas-Congo, au Cameroun, au Nigéria, ainsi qu'en Asie (Bandyukova et Ligai 1987; Ansari et al. 2005; Gacche et al. 2010), après cuisson, les jeunes feuilles et les fruits d'*Abelmoschus esculentus* sont consommés comme des légumes verts.

Données nutritionnelles

Les parties aériennes contiennent du phosphore, du calcium, des acides aminés et de la vitamine C (Gacche et al. 2010).

Usage médicinal et propriétés pharmacologiques

La plante se distingue notamment par ses mucilages acides, polysaccharides associés à l'acide galacturonique, à l'acide glucuronique, à des protéines et à des minéraux. Leurs propriétés laxatives sont bien connues. En plus, le fruit de la plante, macéré dans de l'eau tiède, développe des effets émollients et antibactériens.

En Indonésie, les feuilles sont couramment utilisées pour lutter contre la diarrhée et la nausée; certaines variétés développent également une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae* (Grosvenor et al. 1995a et 1995b).

En Inde, les racines, les graines et les fruits sont utilisés en médecine traditionnelle aussi pour leurs effets hépatoprotecteurs (Govind 2011).

Toxicologie

Chez les ouvriers agricoles, il a été observé que le contact avec la plante peut provoquer des allergies (Matsushita et al. 1989 ; www.jardinsdumonde.org).

Tab. 2 : Quelques données sur les polyphénols et autres composés d'*Abelmoschus esculentus*

Partie de la plante	Composés	Référence
Gousse	Calcium, fer, magnésium, manganèse, potassium, sodium, zinc, fibres, vitamine C, acide folique	Bandyukova et Ligai 1987; Glew 1997; Cook et al. 2000; Moyin-Jesu 2007; Kumar et al. 2009
Mésocarpe et graines	Zinc, oligomères des catéchines, dérivés des flavonols	Glew 1997; Cook et al. 2000 Arapitsas 2008
Mésocarpe, gousse et graines	Dérivés d'acide hydroxycinnamique et de quercétine	Arapitsas 2008
Graines et péridcarpe	Catéchines; kaempférol, miricitrin et leurs glycosides; isorhamnétine-glucosides; dérivés hydroxycinnamiques; quercétine et -glucosides	Bandyukova et Ligai 1987; Sakakibara et al. 2003; USDA Database 2007; Arapitsas 2008
Graines	Mucilage ; acides gras poly-insaturés ; protéines	Savello et al. 1980
Gousse : endocarpe	Mucilages, protéines	Shengkhamparn et al. 2009

2.2 *Hibiscus acetosella* Welw ex Hiern

Fig. 2: *Hibiscus acetosella* Welw ex Hiern
 (www.jardinsdumonde.org)

Tab. 3: Classification (USDA Natural Resources Conservation Service, http://plants.usda.gov)	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>
Ordre	<i>Malvales</i>
Famille	<i>Malvaceae</i>
Genre	<i>Hibiscus</i> L.
Espèce	<i>Hibiscus acetosella</i> Welw. ex Hiern



Nom vernaculaire : Ngai – ngai

Usage alimentaire et données nutritionnelles

Dans le Bas-Congo, au Cameroun, au Nigéria etc, les feuilles hachées, pilées, cuites à l'eau et assaisonnées de divers ingrédients, sont consommées comme légumes. Les fleurs et feuilles servent à la fabrication d'une boisson courante au Nigéria. L'aliment apporte des vitamines comme la thiamine (Vit. B₁), la riboflavine (Vit. B₂), la Vit. C, la niacine (Vit. B₃ ou PP) et des minéraux (Ca, Fe, P) (Salawu 2006).

Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces du genre *Hibiscus* développent des activités antimicrobiennes contre *Staphylococcus aureus*, des activités antivirales contre *Herpes simplex* type II, des activités antibactériennes, antifongiques, antispasmodiques, soulagent la fièvre, les foulures et combattent les vers intestinaux. D'autres usages de médecine traditionnelle sont signalés au

Mexique, en Thaïlande et en Indonésie (Grosvenor 1995_a et 1995_b; Farombi 2003; Olatunde 2003).

Les fleurs sont riches en anthocyanes (Chang et al. 2006), en acides phénols (Olatunde 2003; Salawu 2006) et en flavonols (Sayago-Ayerdi et al. 2007).

Les extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux des fleurs et des feuilles du genre *Hibiscus* développent des effets antihypertenseurs, antiœstrogènes, anticonvulsifs, hypoglycémiques (anti-diabétiques). Ils sont également hypolipidémiants, hypocholestérémiants, cardioprotecteurs et utilisés dans le traitement de la constipation et de la diarrhée.

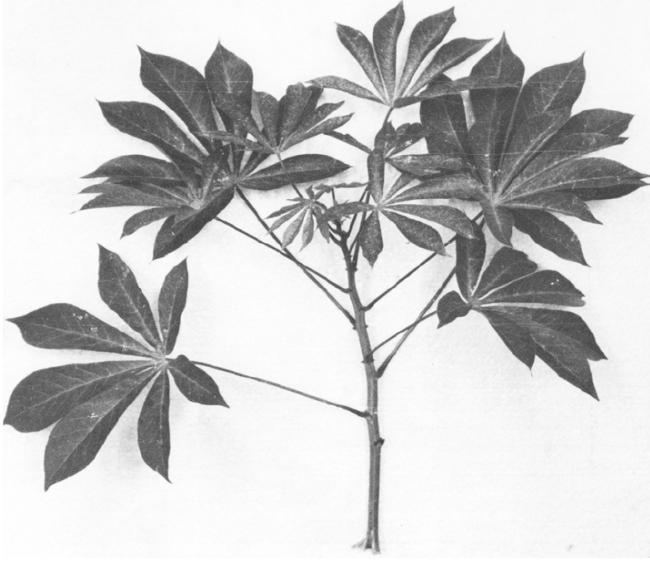
L'extrait des fleurs est employé dans le traitement contre l'épilepsie, la lèpre, le catarrhe bronchique et contre les calculs rénaux.

Les feuilles sont employées dans le traitement contre la fatigue et les maladies de la peau; le jus des racines fraîches dans le traitement de la gonorrhée, la poudre des racines sert dans le traitement des ménorrhagies (Hirunpanich et al. 2005; Prenesti et al. 2007; Sayago-Ayerdi et al. 2007; Venkatesh et al. 2008).

Tab. 4 : Quelques données sur les polyphénols et autres composés d' *Hibiscus sabdariffa*,
l'espèce probablement la plus étudiée du genre *Hibiscus*

Partie	Composé	Référence
Feuilles	Quercétine, acide L-ascorbique, acide protocatéchique	Tseng et al. 1996; Farombi 2003; Hirunpanich et al. 2005
Fleurs	Quercétine, luteoline, acide chlorogénique, anthocyanes	Du et Francy 1973
Calices des fleurs, fleurs et leurs pétales	Dérivés d'acides hydroxybenzöïques, d'acide hydroxycinnamique , anthocyanes (delphinidine, cyanidine et leurs dérivés), flavonoïdes et leurs hétérosides	Sayago-Ayerdi et al. 2007
	Cyanidine-3-glucoside, malvidine, myricétine, kaempférol, luteoline, acide chlorogénique, acide citrique	Ali et al. 2005
	Acide citrique, acide malique, acide oxalique	Khafaga et Koch 1980
Calices des fleurs et fleurs	Acide cafényhydroxicitrique, acide de l'hibiscus et leurs esters ; cyanidine, delphinidine et leurs dérivés, acide chlorogénique ; quercétine, myricétine et leurs dérivés, kaempférol – 3- <i>O</i> – rutinoïde, kaempférol – 3- <i>O</i> – sambubioside, prodelphinidine, acide coumarylquinique, acide cafényshikimique	Herranz-López et al. 2012

2.3 *Manihot esculenta* Crantz

<p>Fig. 3 : Feuilles de <i>Manihot esculenta</i> (Lancaster et Brooks 1983)</p>  <p>Fig. 1. Typical cassava leaves (copyright D. G. Coursey).</p>	<p>Tab. 5: Classification (USDA Natural Resources Conservation Service, http://plants.usda.gov)</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Règne</td><td><i>Plantae</i></td></tr> <tr> <td>Sous-règne</td><td><i>Tracheobionta</i></td></tr> <tr> <td>Superdivision</td><td><i>Spermatophyta</i></td></tr> <tr> <td>Division</td><td><i>Magnoliophyta</i></td></tr> <tr> <td>Classe</td><td><i>Magnoliopsida</i></td></tr> <tr> <td>Sous-classe</td><td><i>Rosidae</i></td></tr> <tr> <td>Ordre</td><td><i>Euphorbiales</i></td></tr> <tr> <td>Famille</td><td><i>Euphorbiaceae</i></td></tr> <tr> <td>Sous-famille</td><td><i>Crotonideae</i></td></tr> <tr> <td>Genre</td><td><i>Manihot</i> Mill.</td></tr> <tr> <td>Espèce</td><td><i>Manihot esculenta</i> Crantz</td></tr> </tbody> </table>	Règne	<i>Plantae</i>	Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>	Superdivision	<i>Spermatophyta</i>	Division	<i>Magnoliophyta</i>	Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Sous-classe	<i>Rosidae</i>	Ordre	<i>Euphorbiales</i>	Famille	<i>Euphorbiaceae</i>	Sous-famille	<i>Crotonideae</i>	Genre	<i>Manihot</i> Mill.	Espèce	<i>Manihot esculenta</i> Crantz
Règne	<i>Plantae</i>																						
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>																						
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>																						
Division	<i>Magnoliophyta</i>																						
Classe	<i>Magnoliopsida</i>																						
Sous-classe	<i>Rosidae</i>																						
Ordre	<i>Euphorbiales</i>																						
Famille	<i>Euphorbiaceae</i>																						
Sous-famille	<i>Crotonideae</i>																						
Genre	<i>Manihot</i> Mill.																						
Espèce	<i>Manihot esculenta</i> Crantz																						

Nom français : (feuilles de) manioc

Noms vernaculaires :

Les feuilles : Tsaka (Kiyombe), Saka-saka (Kikongo), Pondu (Lingala)

Le tubercule : didioko, diyaka, phanza (Kiyombe), didioko (Kikongo), Songo (Lingala)

Importance économique

En Afrique tropicale et dans beaucoup de pays d'Asie comme d'Amérique latine, le manioc est un aliment de base pour plus de cinq cents millions de personnes. En Afrique, il joue un rôle majeur dans la sécurité alimentaire, particulièrement pour les populations urbaines et rurales de faible revenu, pour qui l'amidon des racines de manioc constitue la plus importante source d'énergie.

Usage alimentaire

On distingue le manioc doux et le manioc amer, selon la teneur en composés cyanogènes.

Les racines sont comestibles sous plusieurs formes :

- soit elles sont immédiatement bouillies dans l'eau et ainsi prêtes à la consommation,
- soit elles sont d'abord trempées pendant quelques jours dans l'eau avant d'être soumises à l'un ou l'autre des traitements suivants :
 - consommation immédiate ;
 - séchage et transformation en farine ("fufu") pour la production d'une pâte alimentaire;
 - cuisson et fabrication des bâtons de manioc.

Les feuilles détachées de leur pétiole, humectées d'eau puis préchauffées avant d'être pilées, cuites et assaisonnées de divers ingrédients, servent de légumes de base à de nombreuses populations.

Les feuilles de manioc contribuent à l'apport alimentaire en minéraux (Ca, Mg, Zn, Na, K, P, Fe, Cu) (Fasuyi 2005). Leur teneur en protéines varie de 12 % à 36.9 % pour la matière sèche; tous les acides aminés y sont présents, à différents taux (Lancaster et Brooks 1983 ; Ngudi et al 2003, Fasuyi 2005), mais ceux qui portent un groupe thiol notamment la méthionine et la cystéine, pourraient constituer un facteur limitant (Ngudi et al 2003).

Usage en médecine traditionnelle

Au Nigeria, l'extrait aqueux des feuilles de manioc est utilisé dans le traitement d'épisodes inflammatoires et des douleurs (Adeyemi et al. 2008). En RDC, les feuilles sont utilisées contre les dermatoses, les morsures de serpent, les palpitations cardiaques, les maux de dents et des yeux, la blennorragie et les céphalées; les tubercules sont utilisés contre la toux, les plaies, les varicelles, la constipation, l'indigestion et la diarrhée (Pharmacopée Traditionnelle de la RDC 2009)

Tab. 6 : Quelques données sur les polyphénols et autres composés du genre *Manihot*

Espèce	Partie	Composé	Référence
<i>Manihot utilissima</i>	Feuilles	Acide férulique	Salawu et al. 2009
		Amentoflavone ; kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoïse ; kaempférol-4'- <i>O</i> -rutinoïse	Prawat et al. 1995; Salawu et al. 2009, 2011 _a et 2011 _b ;
		Traces d'acide gentésique, d'acide gallique, d'épicatéchine et de catéchine; acide phénylacétique, vanilique, protocatéchique, siringique, <i>p</i> -coumarique, férulique et caféïque	Salawu et al. 2006
<i>Manihot esculenta</i>	Feuilles	Quercétine; rutine	Kubo et al. 2006; Salawu et al 2009, 2011 _a et 2011 _b
		Acide L-ascorbyque	Lancaster et Brook 1983; Oteng-Giang et Machu 1987
	Racines et feuilles	α -, β – carotène et autres caroténoides	Lancaster et Brook 1983; Zacharia-Rungkat et al. 2000; Nagib et al. 2007; de Almeida et al. 2007; Lakó et al.

Toxicologie du manioc

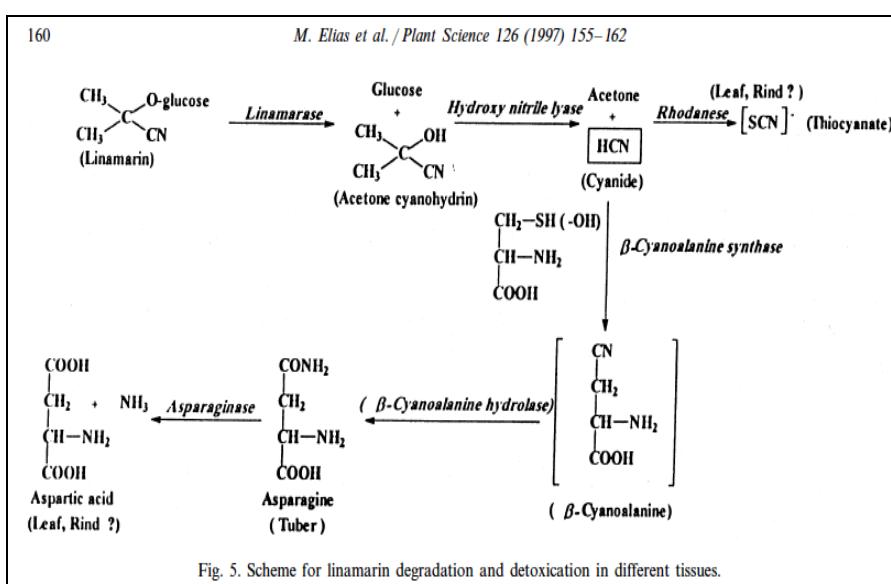
Le manioc contient des glycosides cyanogènes sous forme de linamarine et/ ou de lotaustraline, la forme méthylée. Le manioc doux en contient moins que le manioc amer. La teneur en cyanogènes est plus élevée dans les feuilles que les racines (Bokanga 1994), et devient encore plus importante lors des carences de pluviosité (Cardoso et al. 2005).

La linamarase, présente dans toutes les parties de la plante, hydrolyse la linamarine et la lotaustraline en glucose et en acétone cyanohydrine. Le second dérivé se dégrade en HCN et en acétone, soit de manière spontanée (30 à 65 °C; pH 3.5-6), soit sous l'activité de l'hydroxynitrile lyase (Fig. 4).

In vivo, la thiosulfate sulfurtransférase (rhodanese) détoxifie HCN en le transformant en thiocyanate (Fig 4). Cependant, ce dernier inhibe la capture de l'iode par la glande thyroïdienne et est associé à la pathogénèse du goitre endémique et du crétinisme, lorsque l'apport journalier en iodé est insuffisant.

À défaut de sa conversion en thiocyanate, HCN s'associe aux enzymes de la respiration et se fixe sur l'ion ferrique du cytochrome *c*. Cette liaison inhibe la cytochrome *c* oxydase, une enzyme cruciale de la respiration et induit des phases d'anoxie délétères à la cellule, ce qui provoque une forte production mitochondriale des ROS (McMahon et al. 1995).

Fig. 4 : Dégradation enzymatique de la linamarine (Elias et al. 1997)



À concentration élevée, HCN provoque des pathologies neurologiques et locomotrices observées dans des régions où l'alimentation est principalement composée des produits de

manioc préparés de manière inadéquate et l'apport en protéines à groupes thiols insuffisant, notamment une ataxie chronique (*Konzo*). Une concentration de 0.5-3.5 mg HCN/kg de poids corporel est considérée comme dose létale minimale chez le sujet humain (Fokunang et al. 2001). Les feuilles peuvent contenir de 8.3 à 146.4 mg HCN par 100 g de poids frais (Bourdoux et al. 1982; Lancaster et Brooks 1983; Oke 1994; Ngudi et al 2003; Fasuyi 2005).

HCN est très instable face aux procédés de préparation des parties comestibles de *Manihot* (Fasuyi 2005). Dans la plante, la linamarase plus abondante dans les feuilles que dans les racines, et son substrat se trouvent dans des tissus séparés (Mkpong et al. 1990). La rupture des tissus due à la transformation et à la préparation culinaire libère l'enzyme et lui permet de dégrader son substrat.

Une cuisson de 15 min à 100 °C baisse la teneur en HCN des feuilles fraîches de 68.8 à 3.7 mg/kg (de 100 à 5.4 %) ; après 30 min de cuisson à la même température, la teneur résiduelle est de 1.2 mg/ kg (1.7 %) (Bourdoux et al. 1982; Oke 1994). Dans l'aliment préparé de manière adéquate, la teneur baisse jusqu'à moins de 10 mg d'équivalent HCN par kg de poids sec d'aliment (Tab. 7), norme fixée par l'OMS/FAO (Ngudi et al. 2003; Cardoso et al. 2005). Dans la fabrication des bâtons de *Manihot* à partir des racines, les diverses étapes baissent la teneur en équivalents HCN de 511 mg à 6.4 par kg de la matière première (de 100 à 1.25%), et de 798 à 2.8 (de 100 à 0.35 %) lors de la fabrication de gari (Agbor-Egbe et Mbome 2006).

Tab. 7 : Teneur en HCN des feuilles de *Manihot* avant et après cuisson (Ngudi et al. 2003)

Table 1 Cyanogen content in raw and cooked cassava leaves (mg HCN equivalent kg ⁻¹ dry weight) ^a										
	Dampoort		Foreign		Congo		Chateau		Ghana	
	Raw (n=4)	Cooked (n=4)								
Total cyanogens	35.9b±0.4	1.3a±0.3	107.5d±0.8	0.8a±1.1	87.9c±4.5	0.30a±0.04	83.7c±2.4	0.7a±0.1	86.1c±3.1	1.9a±0.2
Acetone cyanohydrin + HCN/CN ⁻	5.7ab±1.9	ND ^b	24.2d±4.5	ND	15.3c±0.3	ND	10.5bc±2.5	ND	15.0c±3.9	ND
Linamarin	30.2b±2.4	1.3a±0.3	83.4d±5.3	0.8a±1.1	72.7c±4.2	0.30a±0.04	73.2c±4.9	0.7a±0.1	71.1c±0.8	1.9a±0.2

Letter same within a row means no significant difference ($P>0.05$).

^a Values are means± standard deviation.

^b Not detected.

Les procédures traditionnelles de préparation des feuilles et de production de bâtons et de farine de manioc pour la consommation humaine sont efficaces et bien appropriées pour atteindre le plus grand taux de détoxification (Padmaja et al. 1995; Ngudi et al. 2003).

2. 4 *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

Fig. 5: <i>Pteridium aquilinum</i> (Yamada et al. 2006)	Tab. 8: Classification (USDA Natural Resources Conservation Service, http://plants.usda.gov)	
	Règne	<i>Plantae</i>
	Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
	Division	<i>Pteridophyta</i>
	Classe	<i>Filicopsida</i>
	Ordre	<i>Polypodiales</i>
	Famille	<i>Dennstaedtiaceae</i>
	Genre	<i>Pteridium</i> Gleditsch ex Scop.
	Espèce	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn

Nom français: Fougère – aigle

Nom vernaculaire: Misili

Usage alimentaire

Les jeunes feuilles et crosses de *Pteridium aquilinum* cuites à l'eau sont consommées comme légumes par les populations notamment du Bas- Congo ainsi que par leurs voisins, et au Cameroun.

Tab. 9 : Quelques données sur les polyphénols et autres composés de *Pteridium aquilinum*

Espèce	Partie	Composé	Référence
		Apigénine, astragaline, trifoline ; kaempférol, quercétine, rutine ; rhamnétine, isorhamnétine et autres hétérosides	Pamukcu 1980 Imperato 1995; 1996; 1997 ^a ; Calderón-Montano et al. 2011;
<i>Pteridium aquilinum</i>	Feuilles et crosses	Acide férulique, <i>p</i> -coumarique, caféïque, acide 3,4-dimethoxycinnamique ; dihydro - <i>p</i> -coumarique et dihydroférulique	Imperato 1997 ^b ; 1998 Mendez 2005

Toxicologie

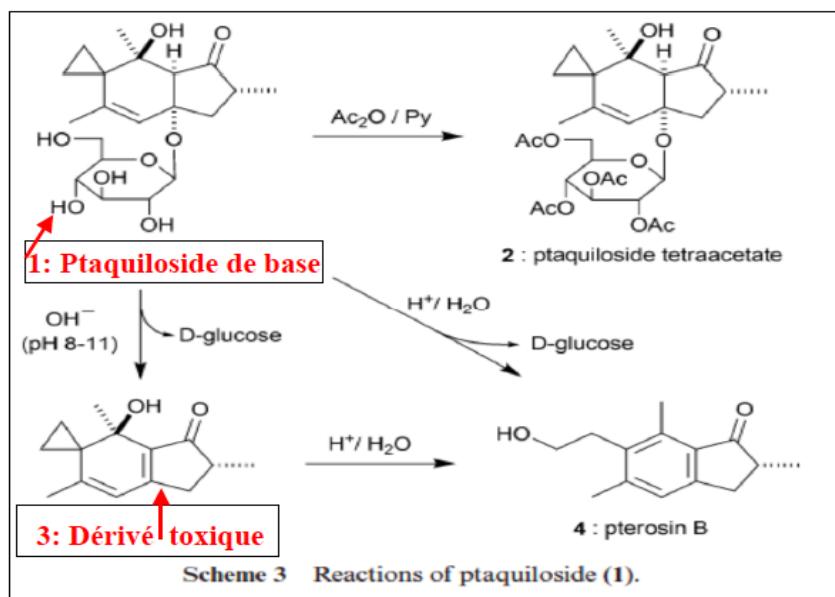
Chez le sujet humain, la consommation de cet aliment peut provoquer des épisodes aigus de diarrhée, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et des céphalées, si la préparation n'a pas été adéquate.

La plante synthétise des composés cyanogènes (Alonso-Amelot et Oliveros 2000) et des ptaquilosides (norsesquiterpènes) à dérivés toxiques. La toxicité des composés cyanogènes a été abordée dans la présentation de *Manihot esculenta*.

Le ptaquiloside de base est stable (Fig.6, chiffre 1). L'hydrolyse de la liaison glycosidique libère un aglycone de structure diénone, qui porte un anneau cyclopropane nucléophile et réactif (Fig. 6, chiffre 3).

Fig. 6 : Structure et transformation des ptaquilosides

(Modifié d'après Yamada et al. 2007)



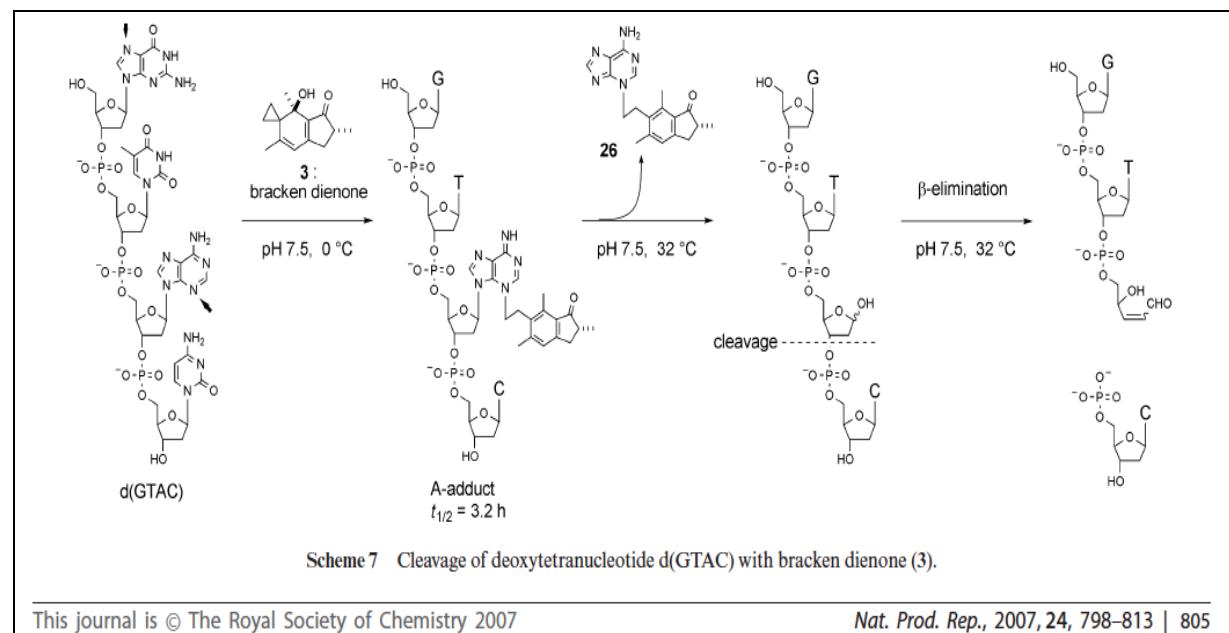
Réactions de transformation des ptaquilosides [1]: sous conditions alcalines (pH>7), l'hydrolyse de la liaison glycosidique donne lieu à une structure diénone instable [3], dont le cyclopropane persistant est responsable d'attaques délétères contre l'ADN (Fig. 7).

Ce dérivé est cancérogène : son anneau cyclopropane a une haute affinité pour les groupes thiols (-SH) et sulfides des acides aminés, clive l'ADN (Fig. 7) et induit des mutations et des cancers (Oelrichs et al. 1995; Wilson et al. 1998; Rasmussen et al. 2005 ; Yamada et al. 2006).

Ce fait serait la raison de la localisation des tumeurs dans la vessie des ruminants et dans l'iléum des souris nourries avec des aliments contenant du *Pteridium*. Dans les régions où la fougère est consommée comme aliment, les ptaquilosides peuvent être transmis à l'homme, et

provoquer le cancer de l'œsophage. De pareils cas ont été observés au Japon, où la consommation de la fougère est parmi les plus élevées du monde. Là où la fougère n'est pas consommée comme aliment, les ptaquilosides peuvent parvenir dans l'organisme humain à travers le lait des vaches qui broutent du *Pteridium* dans leur pâture, et provoquer le cancer. De tels cas ont été observés dans les régions rurales d'Amérique du Sud. 9 % des ptaquilosides contenus dans les frondes consommées par les vaches sont excrétés dans le lait (Pamukcu et al 1978 ; Rasmussen et al. 2005).

Fig. 7 : Attaque de l'ADN par le dérivé réactif des ptaquilosides (Yamada et al. 2007)



Scheme 7 Cleavage of deoxytetranucleotide d(GTAC) with bracken dienone (3).

Dans le cas des femmes enceintes, il y a non seulement un risque pour la maman, mais aussi pour le fœtus, car des expérimentations effectuées chez les souris (Venezuela, Costa Rica, Colombie), ont notamment montré que ces substances peuvent traverser la barrière placentaire (Wilson et al. 1998). L'eau potable peut également être une voie de contamination aux ptaquilosides. La concentration maximale tolérable dans l'eau potable est de 0.5-16 ng/l (Rasmussen et al. 2005).

Les ptaquilosides se retrouvent dans toutes les fougères à des concentrations pouvant atteindre 1300 µg/g. En milieu aqueux, leur dégradation dépend de divers facteurs comme le pH, la température etc; au pH physiologique, elle est très lente (Rasmussen et al. 2005).

2.5 Références bibliographiques

- Adeyemi O O, Yemitan O K, Afolabi L (2008) Inhibition of chemically induced inflammation and pain by orally and topically administered leaf extract of *Manihot esculenta* Crantz in rodents. *J. of Ethnopharmacology* 119 (1), 6-11
- Agbor-Egbe T, Mboma I L (2006) The effects of processing techniques in reducing cyanogen levels during the production of some Cameroonian cassava foods. *J. of Food Composition and Analysis* 19, 354-63
- Ali B H, Waleb N A, Blunden G (2005) Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: a review. *Phytother. Res.* 19, 369-75
- Alonso-Amelot M E, Oliveros A (2000) A method for the practical quantification and kinetic evaluation of cyanogenesis in plant material. Application to *Pteridium aquilinum* and *Passiflora capsularis*. *Phytochem. Analysis* 11, 309-16
- 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
- Arapitsas P (2008) Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. *Food Chemistry* 110, 1041-45
- Bandyukova V A, Ligai L V (1987) Chemical investigation of the fruit of *Abelmoschus esculentus*. Translated from Khimiya Prirodnykh Soedinenii No 3, pp 451-452
- Bokanga M (1994) Processing of Cassava leaves for human consumption. International Workshop on Cassava safety. *Acta Hort.* (ISHS) 375, 203-208.
www.achort.org/books/375/375_18.htm (ISHS)
- Bourdoux P, Seghers P, Mafuta M, Vanderpas J, Vanderpas-Rivera M, Delange F et al (1982) Cassava products : HCN content and detoxification processes. In : Delange F, Iteke F B, Ermans A M (Eds) Nutritioinal factors involved in the goitrogenic action of cassava, IDRC-184^e. IDRC, Ottawa, Canada, pp 51-58
- Calderón-Montano J M, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro (2011) A review of the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Rev. in Medicinal Chem.* 11, 298-344
- Cardoso A P, Mirione E, Ernesto M, Massaza F, Cliff J, Haque M R et al (2005) Processing of cassava roots to remove cyanogens. *J. Food Comosition and Analysis* 18, 451-60
- 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
- Cook J A, Vander Jagt D J, Pastuszyn A, Mounkaila G, Glew R S, Millson M, Glew R H (2000) Nutrient and chemical composition of 13 wild plant foods of Niger. *J. Food Comp. Anal.* 13, 83-92.
- de Almeida E M S, Arruda S F, de Vargas R M, de Souza E M T (2007) β -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats. *Comparative Biochem. and Physiol., Part C* 146, 235-40

- Du C T, Francis F J (1973) Anthocyanins of rosella (*Hibiscus sabdariffa*, L.). *J. Food Sci* 38, 810–12
- Elias M, Nambissan B, Sudhakaran P R (1997) Catabolism of linamarin in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Sci.* 126, 155-62
- Fasuyi A O (2005) Nutrient composition and processing effects on cassava leaf (*Manihot esculenta* Crantz) antinutrients. *Pakistan J. of Nutr.* 4(1), 37-42
- Fokunang C N, Tomkins P T, Dixon A G O, Tembe E A, Salwa B, Nukenine E N, Horan I (2001) Cyanogenic potential in food crops and its implication in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) production. *Pakistan J. of Biological Sciences* 4 (7), 926-30
- 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.
- Glew R H, Vander Jagt D J, Lockett C, Grivetti L E, Smith G C, Pastuszyn A, Millson M (1997) Amino acid, fatty acid and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina-Faso. *J. Food Comp. Anal.* 10, 205-17.
- Govind P (2011) Medicinal plants against liver diseases. *Int. Res. J. Pharmacy* 2(5), 115-21
- Grosvenor P W, Gothard P K, McWilliam N C, Supriono A, Gray D O (1995_a) Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 1: Uses. *J. of Ethnopharmacology* 45, 75-96
- Grosvenor P W, Supriono A, Gray D O (1995_b) Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. *J. of Ethnopharmacology* 45, 97-111
- Herranz-López M, Fernández-Arroyo S, Pérez-Sánchez A, Barrajón-Catalán E, Beltrán-Debón R, Menéndez J A, Alonso-Villaverde C, Segura-Carretero A, Joven J, Micol V (2012) Synergism of plant – derived polyphenols in adipogenesis : Perspectives and implications. *Phytomedicine* 19, 253-61
- 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'- feruloylapioside) from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 43(6), 1421-23
- Imperato F (1997_a) Kaempferol 3-O-(6''- caffeoylglucoside) 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

Jardins du monde. www.jardinsdumonde.org/

Khafaga E-S R, Koch H (1980) Stage of maturity and quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). 1. Organic acids. *Angew. Bot* 54, 287-93.

Kubo I, Masuoka N, Nihei K-I, Burgheim B (2006) Maniçoba, a quercetin-rich Amazonian dish. *J. of Food Composition and Analysis* 19(6-7), 579-88

Kumar R, Patil M B, Patil S R, Paschapur M S (2009) Evaluation of *Abelmoschus esculentus* mucilage as suspending agent in paracetamol suspension. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 1(3), 658-65

Lako J, Trencerry V C, Wahlqvist M, Wattanapenpaiboon N, Soheeswaran S, Premier R (2007) Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry* 101, 1727-41

Lancaster P A, Brooks J E (1983) Cassava leaves as human food. *Economic Botany* 3 (3), 331-48

Matsushita T, Aoyama K, Manda F, Ueda A, Yoshida M, Okamura J (1989) Occupational dermatoses in farmers growing okra (*Hibiscus esculentus* L.) *Contact Dermatitis* 25(5), 321-25

McMahon J M, Wanda L B W, Sayre R T (1995) Cyanogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. of Experimental Botanic* 46, 731-41

Mendez J (2005) Dihydrocynnamic acids in *Pteridium aquilinum*. *Food Chemistry* 93, 251-52

Ministère de la santé publique de la RDC (Éd) Pharmacopée Traditionnelle de la RDC, éditions Science et Tradition 1^{ère} éd. Kinshasa 2009

Mkpong O E, Yan H, Chism G, Sayre R T (1990) Purification, characterisation and localisation of linamarase in cassava. *Plant Physiology* 93, 176-81

Moyin-Jesu El (2007) Use of plant residues for improving soil fertility pod nutrients root growth and pod weight of okra *Abelmoschus esculentum* L. *Bioresour. Tech.* 98, 2057-64

Nagib N, Vizzotto C S, Schwatz C A and Pires O.R. Junior (2007) Cassava diversities in Brasil: the case of carotenoid-rich landraces. *Genetics and Molecular Res.* 6(1): 116-27

Ngudi D D, Kuo Y-H, Lambein F (2003) Cassava cyanogens and free amino acids in raw and cooked leaves. *Food and Chemical Toxicology* 41, 193-97

Oelrichs P B, Ng J C, Bartley J (1995) Purification of ptaquiloside, a carcinogen from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 40(1), 53-56

Oke O L (1994) Eliminating cyanogens from cassava through processing: technology and tradition. *Acta Horticulture* 375, 163-74

Olatunde F E (2003) African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *Afr. J. Biotechnol.* 2 (12), 662-71

- Oteng-Gyang K, Mbachu J I (1987) Changes in the ascorbic acid content of some tropical leafy vegetables during traditional cooking and local processing. *Food chemistry* 23 (1), 9-17.
- Padmaja G, Steinkraus K H (1995) Cyanide detoxification in cassava for food and feed uses. *Crit. Rev. in Food Sc. And Nutr.* 35(4), 299-339
- Pamukcu A M, Erûrk E, Yalçiner S, Milli U, Bryan G T (1978) Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.* 38, 1556-60
- Pamukcu A M, Yalçiner S, Hatcher J F, Bryan G T (1980) Quercetin, a rat and bladder carcinogen present in Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.* 40, 3468-71
- Prawat H, Mahidol C, Ruchirawat S, Prawat U, Tuntiwachwut-Tikul P, Tooptakong U et al. (1995) Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry* 40, 1167-73
- Prenesti E, Berto S, Daniel P G, Toso S (2007) Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry* 100, 433-38
- Rasmussen L H, Hansen H C B, Lauren D (2005) Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere* 58, 823-35
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem* 51, 571-81
- 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, Akindahunsi A A, Mulinacci N (2009) HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chemistry* 115, 1568-74
- Salawu S O, Akindahunsi A A, Sanni D M, Decorti G, Cvorovic J, Tramer F et al (2011_a) Cellular antioxidant activities and cytotoxic properties of ethanolic extracts of four tropical green vegetables. *Afr. J. Food Sci* 5(4), 267-75
- Salawu S O, Ongudare A O, Ola-Salawu B B, Akindahunsi A A (2011_b) Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables. *Afr. J. Pharmacy and Pharmacology* 5 (4), 486-92
- Savello P A, Martins F, Hull W (1980) Nutrition composition of okra seed meals. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1163-66
- Sayago-Ayerdi S G, Arranz S, Serrano J, Göni I (2007) Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7886-90
- Shengkhamparn N, Verhoef R, Schols H A, Sajjaanantakul T, Voragen A G J (2009) Characterization of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Carbohydr. Res.* 344, 1824-32

Thakkar S K, Huo T, Maziaya-Dixon B, Failla M L (2009) Impact of style of processing on retention and bioavailability of b-carotene in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). *J. Agric. Food Chem.* 57, 1344-48

Tseng T H, Wang C J, Kao E S, Chu C Y (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by *ter*-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact* 101, 137-48

U.S. Department of Agriculture (Ed) USDA Database for the flavonoid content of selected foods. Release 2.1, Beltsville, Maryland 2007.

USDA Natural Resources Conservation Service, <http://plants.usda.gov>

Venkatesh S, Thilagavathi J, Sunadar D S (2008) Anti-diabetic activity of flowers of *Hibiscus rosasinensis*. *Fitoterapia* 79, 79-81

Wilson D, Donaldson L J, Sepai O (1998) Should we be frightened of bracken? A review of the evidence. *J. Epidemiol Community Health* 52, 812-17

Yamada K, Ojika M, Kigoshi H (2007) Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Nat. Prod. Rep.* 24, 798-813

Zacharia-Rungkat Z, Djaelani M, Setiana, Rumondang E, Nurrochmach (2000) Carotenoid bioavailability of vegetables and carbohydrate-containing foods measured by retinol accumulation in rat livers. *J. Food Composition and Analysis* 13, 297-310

3. Étude des polyphénols des plantes sélectionnées

3.1 Matériel végétal

Les feuilles de 10 plantes couramment consommées au Bas-Congo comme légumes (Tab. 1, N^{ros} 1-9, 11), ainsi qu'une autre plante consommée comme tisane (Tab. 1, N^{ro} 10), ont été cueillies dans la région de Kisantu (Bas-Congo, RDC).

Tab 1: Liste des plantes sélectionnées

N°	Famille	Nom scientifique
1	Amaranthaceae	<i>Amaranthus cruentus</i> L.
2	Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i> L.
3	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i> Crantz
4	Solanaceae	<i>Solanum macrocarpon</i> L.
5	Araceae	<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott
6	Fabaceae	<i>Psophocarpus scandens</i> (Endl.) Verdc.
7	Malvaceae	<i>Hibiscus acetosella</i> Welw. Ex Hiern
8	Malvaceae	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench
9	Gnetaceae	<i>Gnetum africanum</i> Welw.
10	Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf
11	Dennstaedtiaceae	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn

Ces plantes ont été identifiées et séchées à l'Institut National d'Études et de Recherches Agronomiques (INERA) de l'Université de Kinshasa. Un herbier a été établi par l'INERA et joint aux différentes plantes.

Nous avons complété le séchage au laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg : les feuilles ont été placées dans une étuve à flux d'air horizontal, à 45 °C pendant 72 h. Ensuite, elles ont été broyées. Les différentes poudres ont été tamisées (180 µm de diamètre). Chaque poudre a ensuite été gardée dans des récipients hermétiques et opaques jusqu'aux extractions respectives.

Concernant leur consommation par la population, les feuilles de ces plantes sont d'abord légèrement préchauffées à sec, pour les rendre un peu molles avant de les hacher finement. Après l'ajout d'ingrédients, elles sont soumises à une cuisson adéquate dans l'eau. Les fruits d'*Abelmoschus esculentus* et les crosses de *Pteridium aquilinum* sont également consommés sous la même forme.

3.2 Méthodes et résultats des analyses sur les plantes sélectionnées

Pour étudier les polyphénols de plantes sélectionnées, nous avons effectué des analyses en deux parties :

- les **analyses** portant sur toutes les plantes sélectionnées,
- les **analyses** effectuées sur *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella*.

3.2.1 Préparation et rendements des extraits aqueux

Les extraits aqueux ont été obtenus par macération pendant 6 heures à température du laboratoire et sous agitation magnétique de 100 g de poudre de plante dans 500 ml d'eau pure. Après filtration sur du papier-filtre Whatman, chaque solution a été congelée puis lyophilisée.

Les rendements des extractions effectuées sont présentés dans le tableau 2.

Tab. 2: Rendements des extractions aqueuses

Pourcentage (%) de poids de l'extrait par rapport à la poudre de plante			
<i>Abelmoschus esculentus</i>	6.9	<i>Manihot esculenta</i>	7.4
<i>Amaranthus cruentus</i>	5.9	<i>Pteridium aquilinum</i>	7.9
<i>Cymbopogon citratus</i>	5.9	<i>Psophocarpus scandens</i>	6.7
<i>Colocasia esculenta</i>	6.1	<i>Solanum macrocarpon</i>	6.3
<i>Gnetum africanum</i>	7.2	<i>Solanum nigrum</i>	5.2
<i>Hibiscus acetosella</i>	7.3		

3.2.2 Recherche d'acides phénols et de flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)

➤ CCM de tous les échantillons (2007)

Préparation des solutions à examiner provenant des différentes plantes

Les solutions à examiner provenant des poudres des différentes plantes ont été préparées selon le mode opératoire 2.2.27 de la Pharmacopée Européenne (Monographie de la feuille de bouleau).

Dix ml de méthanol R ont été ajoutés à un gramme de poudre avant d'agiter le mélange. Le ballon a ensuite été placé dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min. Après refroidissement, la solution obtenue après filtration sur du papier-filtre Whatmann constitue le filtrat à analyser.

Préparation des témoins T_1 et T_2

Chaque témoin (prises d'essai reprises aux tableaux 3 et 4) a été solubilisé dans 10.0 ml de méthanol R.

Tab. 3: Composition du témoin T_1

Substance	Quantité (mg)	Substance	Quantité (mg)
Acide chlorogénique R	1.16 mg	Hyperoside R	2.54 mg
Acide caféïque R	1.33 mg	Rutine R	2.49 mg
Acide rosmarinique	1.16 mg		

Tab. 4: Composition du témoin T_2

Substance	Quantité (mg)	Substance	Quantité (mg)
Acide chlorogénique	1.01	Kaempférol-3-rhamnoglucoside	1.05
Acide rosmarinique	1.03	Vitexine	1.07
Kaempférol	1.07	Naringine	1.01
Astragoline	1.07		

Phase mobile utilisée

Il s'agit d'une solution d'acétate d'éthyle R, d'acide formique anhydre R, d'acide acétique glacial R et d'eau R à 100:11:11:26 V/V/V/V.

Dépôt

Vingt μ l des solutions à analyser et 10 μ l des solutions - témoins ont été déposés sous forme de bandes sur une plaque de gel de silice dans l'ordre indiqué sur le tableau 5.

Tab. 5 : Ordre des bandes sur la plaque de gel de silice (de gauche à droite)

Nro du spot	Échantillon	Nro du spot	Échantillon
1	<i>Amaranthus cruentus</i>	8	<i>Abelmoschus esculentus</i>
2	<i>Solanum nigrum</i>	9	<i>Gnetum africanum</i>
3	<i>Manihot esculenta</i>	10	<i>Cymbopogon citratus</i>
4	<i>Solanum macrocarpon</i>	11	<i>Pteridium aquilinum</i>
5	<i>Colocasia esculenta</i>	T ₁	Témoin 1
6	<i>Psophocarpus scandens</i>	T ₂	Témoin 2
7	<i>Hibiscus acetosella</i>		

Développement

La migration s'effectue sur 15 cm.

Préparation de la solution de révélation

À 200 mg de diphenylborate d'aminoéthanol R, on ajoute 20 ml de méthanol R (DPBAE;10 g/l) et 1 g de polyéthylène-glycol 400 R (macrogol 400 R; 50 g/l) avant d'agiter le mélange.

Après séchage de la plaque, on pulvérise cette solution puis on laisse 30 min à température ambiante avant d'examiner la plaque en lumière ultraviolette à 365 nm.

➤ CCM permettant de séparer l'acide caféïque et l'acide rosmarinique (2007)

Phase mobile

Vingt-cinq ml d'une solution d'acide formique anhydre R, acétone R, dichlorométhane R à 8.5/25/85 V/V/V (Pharmacopée européenne, Monographie de la feuille de romarin).

Dépôt

Vingt µl d'échantillon et 10 µl de témoin ont été déposés en forme de bande sur une plaque de gel de silice.

Révélation

La révélation se fait au moyen de la solution de DPBAE selon la procédure décrite ci-dessus.

➤ CCM pour *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella* (2011-2012)

Des extraits méthanoliques de poudre de feuilles d'*Hibiscus acetosella* d'une récolte d'Août 2011 provenant de la région de Kisantu au Bas-Congo (*Hibiscus acetosella*_{Août 2011}) et de deux échantillons de feuilles de manioc obtenus en commerce exotique liégeois en Novembre 2011 (*Manihot esculenta* 1/_{Novembre 2011} et *Manihot esculenta* 2/_{Novembre 2011}) ont été soumis à des analyses CCM ne portant que sur ces deux plantes.

La préparation des solutions d'échantillons, le développement et la révélation ont été effectués de la même manière que la CCM effectuée pour tous les échantillons

➤ Résultats

❖ CCM de tous les échantillons (Fig.1)

Fig. 1 (visualisée à 365 nm après révélation par solution DPBAE)

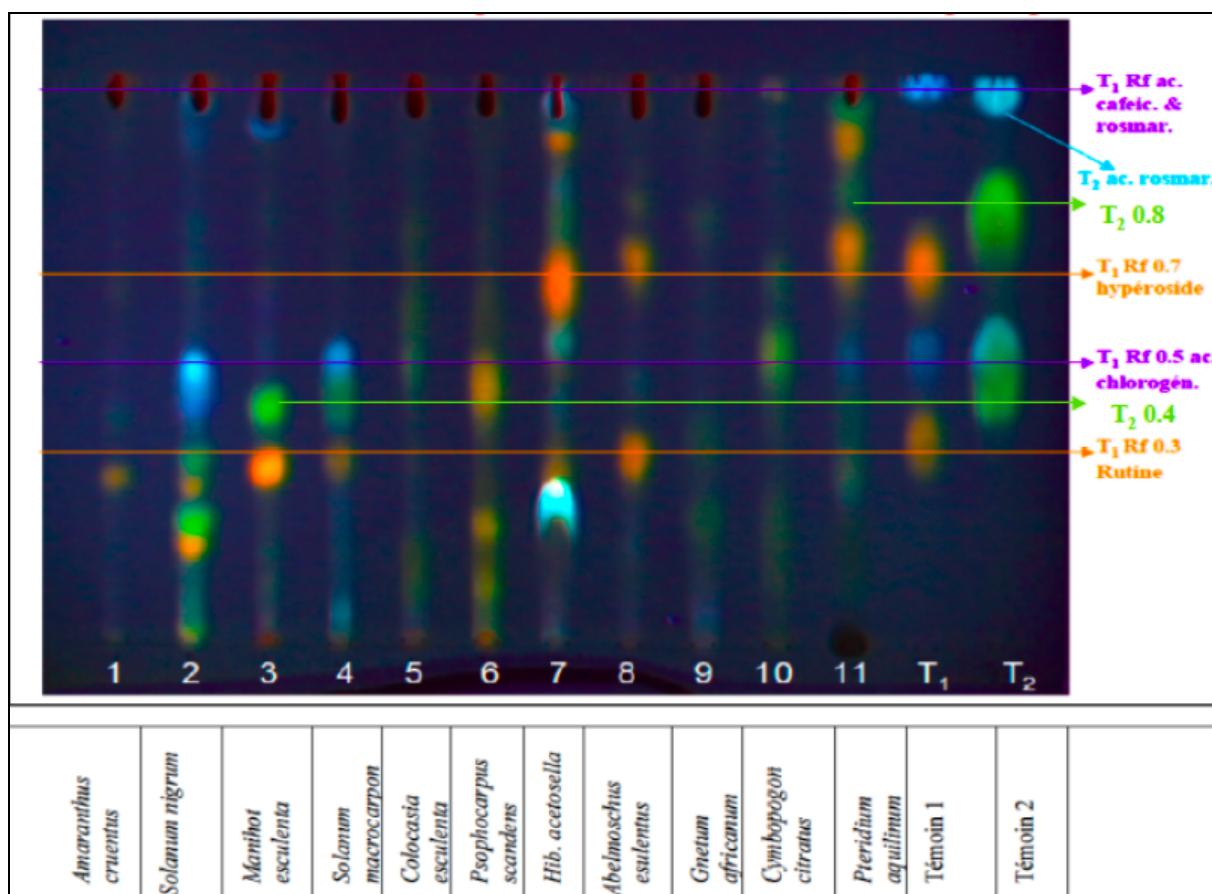


Fig. 1 : Le témoin 1 (T_1) contient l'acide chlorogénique, l'acide caféïque, l'acide rosmarinique, l'hypéroside et la rutine. Le témoin 2 (T_2) contient l'acide chlorogénique, l'acide rosmarinique, l'astragoline, le kaempférol, le kaempférol-3-rhamnoglucoside, la naringine et la vitexine. Les solutions des échantillons ont été préparées selon le mode opératoire de la feuille de bouleau (Pharmacopée Européenne). La phase mobile était constituée d'acétate d'éthyle R, d'acide formique anhydre R, d'acide acétique glacial R et d'eau R à 100:11:11:26 V/V/V/V.

Témoin 1

De bas en haut, 4 bandes sont visibles:

- **Rf 0.3 :** **rutine**, de fluorescence orange. À la même hauteur, une bande de séparation de même fluorescence est observée sur les lignes de migration des échantillons *Abelmoschus esculentus* (8), *Hibiscus acetosella* (7), *Solanum macrocarpon* (4), *Manihot esculenta* (3).
- **Rf 0.5:** **acide chlorogénique**, de fluorescence bleue. Au même facteur de rétention, des bandes de même fluorescence sont présentes dans les échantillons de *Pteridium aquilinum* (11), *Solanum macrocarpon* (4) et *Solanum nigrum* (2). De la solution d'*Hibiscus acetosella* (7), on aperçoit également une bande bleue légèrement au-dessus de ce facteur de rétention.
- **Rf 0.7:** **hypéroside**, de fluorescence orange. On aperçoit des bandes de même fluorescence, et de facteur de rétention similaire dans les échantillons *Pteridium aquilinum* (11), *Abelmoschus esculentus* (8), et *Hibiscus acetosella* (7).
- **Rf 1:** **acide cafïique et acide rosmarinique**. Ces deux acides se superposent sur une même bande, de fluorescence bleue. Des bandes de même fluorescence au même niveau de migration se retrouvent dans *Hibiscus acetosella* (7) et *Solanum nigrum* (2). Pour mieux séparer ces deux acides phénols, une autre CCM (Fig. 2) sera effectuée pour ces deux plantes comme pour la solution de *Manihot esculenta* (3), dans laquelle une bande bleue apparaît légèrement en dessous du facteur de rétention 1.

Témoin 2

Ce témoin contient 7 substances de référence. Toutes ne se sont pas séparées. On constate la présence de quatre bandes :

- **Rf 0.4 :** une bande de fluorescence verte, pouvant correspondre au **kaempférol-3-rhamnoglucoside**. Sur la ligne de migration de *Manihot esculenta* (3), une bande de fluorescence semblable se retrouve à la même hauteur. *Solanum macrocarpon* (4) présente une bande verte à Rf similaire.

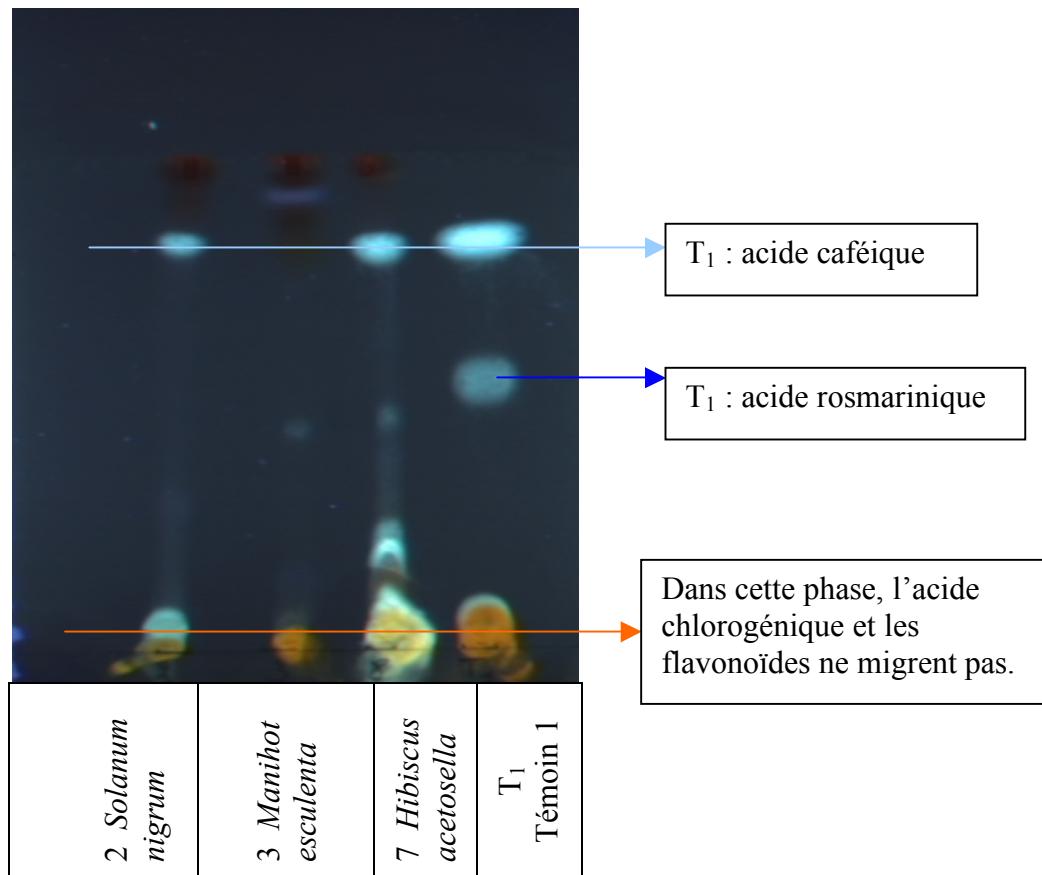
- **Rf 0.8** : une bande verte, pouvant correspondre à du **kaempférol** monoglycoside et à de la **vitexine**. Au même facteur de rétention, la solution de *Pteridium aquilinum* (11) présente également une bande de séparation, mais sa fluorescence est de très faible intensité.
- **Rf 1** : la fluorescence bleue représente l'**acide rosmarinique**, et se retrouve sur les lignes de migration des solutions d'*Hibiscus acetosella* (7) et de *Solanum nigrum* (2). Une fluorescence bleue est également visible sur l'échantillon de *Manihot esculenta*, mais à un Rf légèrement inférieur. Toutefois, dans ces solutions, il pourrait tout aussi bien s'agir d'acide caféïque (voir T₁ Rf 1).

Les solutions analysées présentent d'autres bandes de séparation dont les facteurs de rétention et pour certains la fluorescence, ne correspondent pas aux substances-témoins. Nous savons, grâce à l'expérience du laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg, qu'à la longueur d'onde où nous avons visualisé cette CCM (365 nm), la fluorescence verte correspond à des flavonoïdes de type kaempférol, qui portent un groupe -OH sur le noyau B, et que la fluorescence orange correspond à des flavonoïdes de type quercétine, qui en portent deux. La fluorescence bleue correspond à des acides phénols.

❖ CCM permettant de séparer acide caféïque et acide rosmarinique (Fig. 2)

Le but de cette CCM était de mieux séparer les acides caféïque et rosmarinique.

Fig. 2: (visualisée à 365 nm après révélation par solution DPBAE)



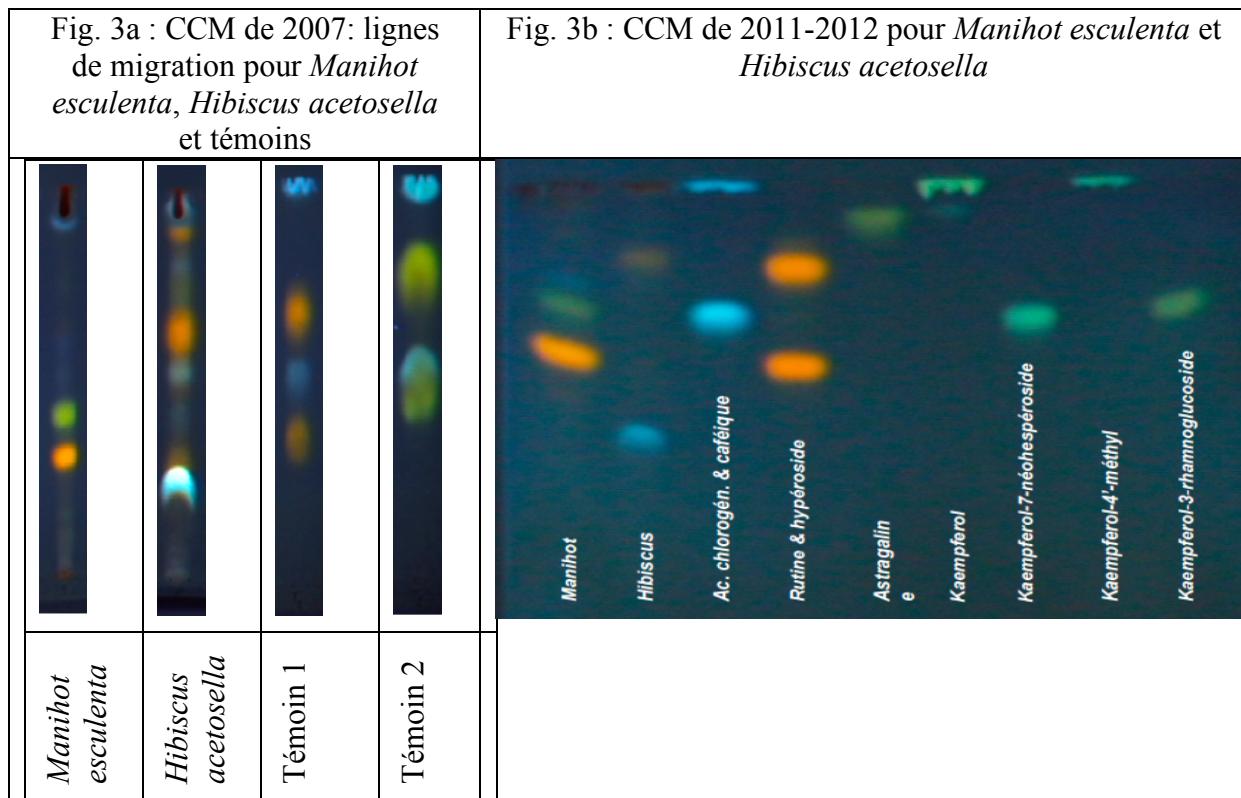
La phase mobile est constituée d'acide formique anhydre R, d'acétone R et de dichlorométhane R à 8.5, 25 et 85, V/V/V. T₁ contient l'acide chlorogénique, l'acide caféïque, l'acide rosmarinique, l'hypéroside et la rutine.

Au niveau du témoin, les flavonoïdes et l'acide chlorogénique ne migrent pas. Par contre, l'acide rosmarinique (Rf 0.5) et l'acide caféïque (Rf 0.8) sont séparés dans ce système.

Les solutions chromatographiques de *Solanum nigrum* (2) et d'*Hibiscus acetosella* (7) contiennent également de l'acide caféïque, ou un autre composé à Rf similaire, mais aucun des 3 échantillons ne contient de l'acide rosmarinique.

❖ CCM pour *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella* (2011-2012) (Fig. 3)

Fig. 3: Comparaison des bandes de séparation pour les solutions de *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella*: CCM de 2007 (Fig. 3a) vs. CCM de 2011-2012 (Fig. 3b)



Sur la CCM de 2011-2012 pour *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella*, différents dérivés du kaempférol (fluorescence verte) ont été déposés séparément comme témoins afin de voir lequel correspondait le mieux à la bande verte observée sur la ligne de séparation de la solution de manioc.

Concernant cet échantillon, on observe sur les deux CCM une bande orange, de même fluorescence que la rutine, et une bande verte, de même facteur de rétention que le kaempférol-7-néohespéroside et le kaempférol-3-rutinose (= kaempférol-3-rhamnoglucoside). La fluorescence est plus proche de celle du kaempférol-3-rutinose (présence à confirmer).

Concernant l'hibiscus, on observe une bande de fluorescence bleue, de Rf inférieur à celui de l'acide chlorogénique, sur les deux CCM. Il pourrait s'agir d'un dérivé d'acide phénol, mais cette hypothèse reste à confirmer.

On observe également une bande de fluorescence orange, au même facteur de rétention que l'hypéroside.

3.2.3 Dosage des polyphénols totaux et des tanins selon le mode opératoire de la Pharmacopée Européenne, rubrique 2.8.14 "Détermination des tanins dans les drogues végétales"

Préparation du filtrat de départ

En bref :

- nous avons ajouté 150.0 ml d'eau R aux prises d'essai des échantillons (Tab. 6, m_1) puis agité le mélange avant de le chauffer à 60 °C au bain - marie pendant 30 min.
- Après refroidissement, nous avons transvasé tout le contenu dans une fiole jaugée de 250 ml, rincé le ballon et récupéré les eaux de rinçage dans la fiole.
- Nous avons ensuite complété le contenu de la fiole à 250.0 ml avec de l'eau R.
- Après avoir laissé décanter la solution, nous avons filtré le contenu sur du papier-filtre de 125 mm de diamètre en éliminant les 50 premiers ml. Le reste constitue le filtrat de départ.

Solution pour les polyphénols totaux

- Nous avons complété 5.0 ml du filtrat de départ à 25.0 ml avec de l'eau R.
- Ensuite, nous avons pipeté 2.0 ml de cette solution et y avons respectivement ajouté 1.0 ml de réactif phospho-molybdo-tungstique R et 10.0 ml d'eau R, avant d'agiter.
- Puis, nous avons complété le volume à 25.0 ml avec une solution de carbonate de sodium R à 290 g/l.

Solution pour les polyphénols non adsorbés sur la poudre de peau

- À 10.0 ml du filtrat de départ, nous avons ajouté 100 mg de poudre de peau SCR, puis placé le mélange sous agitation pendant 60 min.
- Après filtration, 5.0 ml de ce filtrat ont été complétés à 25.0 ml avec de l'eau R.
- Puis, nous avons mélangé 2.0 ml de cette solution avec 1.0 ml de réactif phospho-molybdo-tungstique R et 10.0 ml d'eau R, et complété à 25.0 ml avec la solution de carbonate de sodium décrite ci-dessus.

Solution- témoin

- Pour chaque échantillon à analyser, nous avons préparé le témoin en dissolvant 50.0 mg de pyrogallol R (Tab. 6, m_2) dans 100.0 ml d'eau R.
- Nous avons ensuite dilué le témoin en complétant 5.0 ml à 100.0 ml avec de l'eau R.
- De cette solution, nous avons pipeté 2.0 ml, y avons ajouté 1.0 ml de réactif phosphomolybdo-tungstique R, 10.0 ml d'eau R et complété le mélange à 25.0 ml avec la solution de carbonate de sodium.
- Nous avons laissé les solutions réagir durant 30 min à l'abri de la lumière, puis mesuré leurs absorbances (760 nm) en utilisant l'eau R comme liquide de compensation (Tab. 6, A_1 , A_2 et A_3).

➤ Résultats

Tab. 6: Prises d'essai effectuées et absorbances mesurées pour le dosage des polyphénols

Nro	Plante	m_1 (g)	m_2 (g)	A_1	A_2	A_3
1	<i>Amaranthus cruentus</i>	1.010	0.054	0.107	0,072	0.434
2	<i>Solanum nigrum</i>	1.004	0.051	0.220	0.141	0.391
3	<i>Manihot esculenta</i>	1.003	0.051	0.146	0.102	0.372
4	<i>Solanum macrocarpon</i>	1.028	0.051	0.102	0.073	0.378
5	<i>Colocasia esculenta</i>	1.006	0.051	0.121	0.079	0.375
6	<i>Psophocarpus scandens</i>	1.000	0.052	0.115	0.084	0.391
7	<i>Hibiscus acetosella</i>	1.020	0.052	0.220	0.140	0.406
8	<i>Abelmoschus esculentus</i>	1.004	0.050	0.172	0.102	0.367
9	<i>Gnetum africanum</i>	1.008	0.050	0.148	0.094	0.367
10	<i>Cymbopogon citratus</i>	1.031	0.052	0.138	0.047	0.382
11	<i>Pteridium aquilinum</i>	1.011	0.051	0.829	0.192	0.389

m_1 = masse de la prise d'essai de la poudre, en grammes ; m_2 = masse de pyrogallol, en grammes, pour chaque échantillon à analyser ; A_1 = absorbance des polyphénols totaux ; A_2 = absorbance des polyphénols non adsorbés par la poudre de peau; A_3 = absorbance du témoin.

* Teneur (%) en polyphénols totaux exprimés en pyrogallol : $(62.5 \times A_1 \times m_2) / (A_3 \times m_1)$

* Teneur (%) en polyphénols non adsorbés par la poudre de peau SCR :

$$(62.5 \times A_2 \times m_2) / (A_3 \times m_1)$$

* Teneur (%) en tanins exprimés en pyrogallol : $\{62.5 \times (A_1 - A_2) \times m_2\} / (A_3 \times m_1)$

Tab. 7: Teneur (%) des échantillons en polyphénols et en tanins selon la méthode de la Pharmacopée Européenne pour la "détermination des tanins dans les drogues végétales"

Nro	Plante	Teneur (%), exprimée en pyrogallol		
		Polyphénols totaux	Tanins	Polyphénols non-tanins
1	<i>Amaranthus cruentus</i>	0.8	0.3	0.5
2	<i>Solanum nigrum</i>	1.9	0.6	1.1
3	<i>Manihot esculenta</i>	1.3	0.4	0.9
4	<i>Solanum macrocarpon</i>	0.8	0.2	0.6
5	<i>Colocasia esculenta</i>	1.0	0.4	0.7
6	<i>Psophocarpus scandens</i>	1.0	0.3	0.7
7	<i>Hibiscus acetosella</i>	1.7	0.6	1.1
8	<i>Abelmoschus esculentus</i>	1.5	0.6	0.9
9	<i>Gnetum africanum</i>	1.3	0.5	0.8
10	<i>Cymbopogon citratus</i>	1.2	0.8	0.4
11	<i>Pteridium aquilinum</i>	6.2	4.9	1.8

n = 3. Les écarts-types (non indiqués), étaient tous situés entre 0.3 et 0.8 pour les polyphénols totaux. Pour les tanins et les polyphénols non-tanins, ils étaient tous < 0.5.

Pour les polyphénols totaux, on observe cet ordre décroissant des teneurs : *Pteridium aquilinum* 6.2 > *Solanum nigrum* 1.9 > *Hibiscus acetosella* 1.7 > *Abelmoschus esculentus* 1.5 > *Manihot esculenta* et *Gnetum africanum* 1.3 > *Cymbopogon citratus* 1.2 ; la teneur des autres plantes était ≤ 1 %.

Pteridium aquilinum se distingue en polyphénols totaux, en tanins, et en polyphénols non-tanins.

3.2.4 Dosage des flavonoïdes selon la méthode de la Pharmacopée Européenne (Monographie de la feuille de bouleau)

Ce dosage a été effectué pour les échantillons d'*Hibiscus acetosella*, *Pteridium aquilinum* et *Solanum nigrum* à cause de leur teneur en polyphénols non-tanins, qui était supérieur à 1 %. L'échantillon de *Manihot esculenta*, dont le pourcentage de polyphénols non- tanins était légèrement inférieur à celui de ces trois autres (0.9 %), a quand même été sélectionné pour cette étude vu son importance comme légume de base.

Préparation de la solution-mère

- Dans un ballon rond, nous avons placé chaque prise d'essai de poudre de plante (Tab. 8) dans un mélange formé de 1 ml d'une solution d'hexaméthylènetétramine R à 5 g/l, 20 ml d'acétone R, et 2 ml d'acide chlorhydrique R1.
- Ensuite, nous avons chauffé le mélange à ébullition à reflux pendant 30 min, laissé refroidir puis filtré sur du coton hydrophile dans un jaugé de 100 ml.
- Puis, nous avons remis le résidu et le coton hydrophile dans un ballon et chauffé à ébullition à reflux pendant 10 min avec 2 fois 20 ml d'acétone R, puis laissé refroidir à la température du laboratoire avant de filtrer d'abord sur du coton hydrophile, puis sur du papier-filtre en ajoutant ces filtrats au premier dans le jaugé de 100 ml.
- Après avoir rincé le ballon et le filtre avec de l'acétone R et récupéré le liquide de rinçage dans la fiole jaugée, nous avons complété le volume à 100.0 ml avec de l'acétone R.
- De cette solution, nous avons transvasé 20.0 ml dans une ampoule à décantation, ajouté 20 ml d'eau R puis agité une fois avec 15 ml et trois fois avec 10 ml d'acétate d'éthyle R.
- Nous avons ensuite réuni les extraits d'acétate d'éthyle dans une autre ampoule à décantation et les avons lavés 2 fois avec 50 ml d'eau R.
- Finalement, nous avons filtré les solutions acétate d'éthyle sur 10 g de sulfate de sodium anhydre R dans une fiole jaugée de 50 ml, puis complété le volume à 50.0 ml avec de l'acétate d'éthyle R, pour obtenir la solution- mère.

Préparation de la solution à examiner

À 10.0 ml de solution-mère, nous avons ajouté 1 ml de réactif au chlorure d'aluminium R (AlCl_3), puis complété le mélange à 25.0 ml avec une solution méthanolique d'acide acétique glacial R à 5 % V/V.

Préparation de la solution de compensation

Nous avons complété 10.0 ml de solution- mère à 25.0 ml avec la solution d'acide acétique glacial R à 5 % V/V dans du méthanol R.

Mesure des absorbances

- Chaque solution était placée à l'abri de la lumière durant 30 min avant la mesure de son absorbance à 425 nm par comparaison au liquide de compensation.

➤ Résultats

Tab 8 : Prises d'essai des poudres et absorbances mesurées pour
le dosage des flavonoïdes (2007)

Nro	Echantillon	Prise d'essai (g)	Absorbance (425 nm)
2	<i>Solanum nigrum</i>	0.201	0.276
3	<i>Manihot esculenta</i>	0.209	0.256
7	<i>Hibiscus acetosella</i>	0.204	0.251
11	<i>Pteridium aquilinum</i>	0.205	0.095

La teneur (%) en flavonoïdes (Tab. 9) a été calculée selon la formule "(A x 1.25) / m" et exprimée en **hypéroside** (A = l'absorbance à 425 nm ; absorbance spécifique de l'hypéroside = 500 ; m la masse de la prise d'essai, en grammes).

Tab. 9 : Teneur en flavonoïdes exprimés en **hypéroside** pour *Solanum nigrum*,
Manihot esculenta, *Hibiscus acetosella* et *Pteridium aquilinum* (2007)

Nro	Echantillon	%
2	<i>Solanum nigrum</i>	1.7
3	<i>Manihot esculenta</i>	1.5
7	<i>Hibiscus acetosella</i>	1.5
11	<i>Pteridium aquilinum</i>	0.6

L'ordre décroissant des teneurs était : *Solanum nigrum* > *Hibiscus acetosella* et *Manihot esculenta* > *Pteridium aquilinum*.

Un autre **dosage des flavonoïdes** (2011-2012) a été effectué selon cette même méthode sur les échantillons de manioc et d'hibiscus déjà évoqués pour leur utilisation dans la CCM pour *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella* (2011-2012). L'échantillon d'hibiscus est issu d'une récolte provenant de la région de Kisantu (Bas-Congo) à la fin d'août 2011 (*Hibiscus acetosella*_{Août 2011}) ; les deux échantillons de manioc ont été obtenus dans deux boutiques exotiques de Liège (*Manihot 1*/_{Novembre 2011} et *Manihot 2*/_{Novembre 2011}). Les résultats sont présentés au tableau 10.

Solanum nigrum, qui présente une teneur de 1.7 % de flavonoïdes, n'a pas été retenu. En effet, étant limités par le temps, nous nous sommes plus spécifiquement concentrés sur les feuilles de manioc et d'hibiscus, vu qu'elles sont les plus consommées comme légumes verts. Leur contribution à l'apport alimentaire en AOX est donc plus importante.

Résultats du dosage des flavonoïdes sur *Hibiscus acetosella*_{Août 2011}, *Manihot 1*/_{Novembre 2011} et *Manihot 2*/_{Novembre 2011}) (Tab. 10)

Tab. 10 : Teneur en flavonoïdes exprimés en **hypéroside** pour l'hibiscus et le manioc (2011-2012)

Echantillon	Teneur en flavonoïdes exprimés en hypéroside (%)
<i>Hibiscus acetosella</i> _{Août 2011}	1.3
<i>Manihot esculenta 1</i> / _{Novembre 2011}	1.6
<i>Manihot esculenta 2</i> / _{Novembre 2011}	1.5

Pour l'hibiscus, le résultat de l'échantillon d'août 2011 (1.3 %) n'est pas éloigné de celui de l'échantillon de la sélection initiale (2007 ; Tab. 9): 1.5 %. Il en est de même pour le manioc : 1.5 % pour 2007 vs. 1.5 et 1.6 % pour 2011-2012. Cependant, bien qu'il ne soit pas indiqué de comparer les résultats obtenus par des méthodes différentes, nous constatons pour le manioc que les résultats obtenus avec ce type de dosage (dosage des flavonoïdes) sont supérieurs à ceux que laissait présager le dosage des polyphénols selon la méthode de la Pharmacopée Européenne pour la détermination des tanins dans les drogues végétales. Le tableau 11 présente un panorama de ces résultats.

Tab. 11 : Panorama des résultats 2007 et 2011-2012
sur la détermination des polyphénols et le dosage des flavonoïdes

		% Flavonoïdes exprimés en hypéroside	% Polyphénols, exprimés en pyrogallol	
			Totaux	Non - tanins
Hibiscus	2007	1.5	1.7	1.1
	2011-2012	1.3	N.D.	N.D.
Manioc	2007	1.5	1.3	0.9
	2011-2012	1.5 et 1.6	N.D.	N.D.

N.D. : non déterminé

3.2.5 Estimation de la teneur en flavonoïdes et en dérivés d'acides phénols par CLHP

3.2.5.1 Plantes sélectionnées au départ (2007)

Méthode chromatographique

La phase stationnaire était une colonne Hypersil ODS 250/4 nm. Nous avons utilisé une phase mobile formée d'un gradient d'acétonitrile et d'une solution aqueuse contenant 0.05 % d'acide trifluoro-acétique. L'analyse a été effectuée selon la méthode décrite sur Tab. 12.

Tab. 12: Méthode pour l'analyse CLHP des échantillons
des plantes sélectionnées au départ (2007)

Temps (min)	% Acétonitrile	% Solution aqueuse d'acide trifluoro-acétique, pH 2.18
0.00	0	100
1.00	3	97
45.00	40	60
46.00	0	100
Stop à 60 min		
Volume d'injection par solution: 20 µl Débit de la phase mobile: 1.0 ml/min		T : 25 ° C UV / DAD

Préparation des solutions à analyser

En bref, 10.0 ml de méthanol R ont été ajoutés à 1.000 gramme de poudre avant d'agiter le mélange. Ensuite nous avons placé le ballon dans un bain-marie à 60 °C pendant 5 min. Après refroidissement, nous avons filtré sur du papier-filtre, rincé le filtre puis évaporé le solvant. Le ballon était ensuite fermé hermétiquement et gardé au frigo (6-8 ° C).

Peu avant l'analyse, l'extrait a été dissous dans 10.0 ml de méthanol R, puis filtré à travers une membrane pour remplir la fiole d'injection.

➤ Résultats

Le tableau 13 présente les teneurs de nos extraits (en %) en dérivés d'acides phénols, exprimés en acide chlorogénique, et en flavonoïdes exprimés en hypéroside.

❖ Tab. 13 : Teneurs (%) estimées (CLHP) des plantes sélectionnées en dérivés d'acides phénols exprimés en acide chlorogénique, et en flavonoïdes exprimés en hypéroside (2007)

Nro	Echantillon	Acides phénols exprimés en acide chlorogénique	Flavonoïdes exprimés en hypéroside
		%	%
1	<i>Amaranthus cruentus</i>	0.5	0.7
2	<i>Solanum nigrum</i>	0.5	0.7
3	<i>Manihot esculenta</i>	0.1	1.4
4	<i>Solanum macrocarpon</i>	0.2	ND
5	<i>Colocasia esculenta</i>	ND	ND
6	<i>Psophocarpus scandens</i>	ND	0.3
7	<i>Hibiscus acetosella</i>	1.0	0.8
8	<i>Abelmoschus esculentus</i>	ND	0.4
9	<i>Gnetum africanum</i>	ND	ND
10	<i>Cymbopogon citratus</i>	0.2	0.3
11	<i>Pteridium aquilinum</i>	0.3	0.5

ND : non déterminé

La **teneur en flavonoïdes** exprimés en hypéroside, présente l'ordre décroissant suivant: *Manihot esculenta* 1.4 % > *Hibiscus acetosella* 0.8 % > *Solanum nigrum* et *Amaranthus cruentus* 0.7 % pour les 4 valeurs les plus élevées. Les teneurs des autres échantillons étaient

soit < 0.5 %, soit non déterminées (ND) parce que cette analyse n'a pas été effectuée pour ces plantes.

Excepté l'*Hibiscus acetosella*, la **teneur en acides phénols** exprimés en acide chlorogénique, est partout inférieure à celle des flavonoïdes; les 4 valeurs les plus élevées sont les suivantes: *Hibiscus acetosella* 1.0 % > *Amaranthus cruentus* et *Solanum nigrum* 0.5 % > *Pteridium aquilinum* 0.3 %.

Hibiscus acetosella présente une teneur en acides phénols particulièrement élevée par rapport aux autres échantillons, et la deuxième teneur la plus élevée en flavonoïdes exprimés en hypéroside.

Les chromatogrammes de cette analyse sont présentés en annexe de cette étude des polyphénols.

3.2.5.2 Analyse plus spécifique sur le *Manihot esculenta* et l'*Hibiscus acetosella* (2011-2012)

Comme pour la détermination de la teneur en flavonoïdes par spectrophotométrie, nous avons effectué une deuxième série d'analyses CLHP de manioc et d'hibiscus parce que parmi toutes les plantes sélectionnées, leurs feuilles sont les plus consommées.

Par ailleurs, le screening biochimique préliminaire que nous avons effectué sur toutes les plantes montre pour ces deux plantes une activité AOX appréciable.

Des extraits méthanoliques et aqueux de poudre de feuilles d'*Hibiscus acetosella* d'une récolte d'Août 2011 provenant de la région de Kisantu au Bas-Congo (*Hibiscus acetosella*_{Août 2011}) et de deux échantillons de feuilles de manioc obtenus en commerce exotique liégeois en Novembre 2011 (*Manihot esculenta* 1/_{Novembre 2011} et *Manihot esculenta* 2/_{Novembre 2011}) ont été soumis à ces analyses.

- Pour obtenir ces extraits, nous avons mélangé 1.000 g de poudre de plante dans 10 ml du solvant indiqué (méthanol R ou eau R) et chauffé 5 min à la température indiquée.
- Après avoir filtré sur un tampon d'ouate, nous avons rincé 3 fois avec 10 ml de solvant d'extraction, en récupérant le liquide de rinçage, puis nous avons évaporé le solvant à sec et calculé le rendement d'extraction pour l'extrait méthanolique (Tab. 14).

Tab. 14 : Rendement des extractions méthanoliques effectuées sur
Manihot esculenta et *Hibiscus acetosella* (2011-2012)

Echantillon	Rendement (%)
<i>Hibiscus acetosella</i>	17.5
<i>Manihot esculenta</i>	16.9

- Les ballons étaient ensuite fermés hermétiquement et gardés au frigo (6-8 ° C).
- Peu avant l'analyse CLHP, les extraits étaient dissous dans 10.0 ml de méthanol R, puis filtrés à travers une membrane pour remplir la fiole d'injection.

La méthode pour cette analyse est décrite au tableau (Tab. 15).

Tab. 15: Méthode pour les analyses CLHP de *Manihot esculenta* et *Hibiscus acetosella*
(2011 - 2012)

Temps (min)	% Acétonitrile	% Solution aqueuse d'acide trifluoro-acétique, pH 2.32
0.00	0	100
1.00	3	97
45.00	40	60
55.00	40	60
56.00	0	100
Stop à 70 min		
Volume d'injection par solution: 10 µl	T : 20 ° C	
Débit de la phase mobile: 1.0 ml / min	UV / DAD	

L'extrait méthanolique d'*Hibiscus acetosella* a été soumis à une **CLHP préparative** pour isoler son composé principal et l'étudier dans son état pur en CLHP analytique, en spectrométrie de masse et en RMN.

La méthode de l'analyse CLHP préparative était la même que celle décrite ci-dessus, avec les modifications propres à une préparative (colonne Lichrosphere C18, 12 µm de diamètre ; volume d'injection 10 ml; débit de la phase mobile 30 ml/min).

Le schéma du chromatogramme de séparation pour le composé principal d'*Hibiscus acetosella* est présenté au paragraphe qui décrit les résultats pour cet échantillon (3.2.5.2.2).

3.2.5.2.1 Résultats pour *Manihot esculenta*

Les différentes parties de la figure 4 présentent les chromatogrammes des analyses CLHP des extraits méthanoliques de *Manihot esculenta*.

Fig. 4 a - c : Comparaison des chromatogrammes (340 nm) et des spectres des pics majoritaires de *Manihot*

Fig. 4a : Analyse effectuée en 2007: liste des témoins, leur temps de rétention, leurs chromatogrammes et celui du manioc (340 nm)

1 : acide chlorogénique 19.756	2 : acide caféïque 21.403	3 : rutine 28.347	4 : hypéroside 29.220	5 : acide rosmarinique 33.188
--	-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------------	---

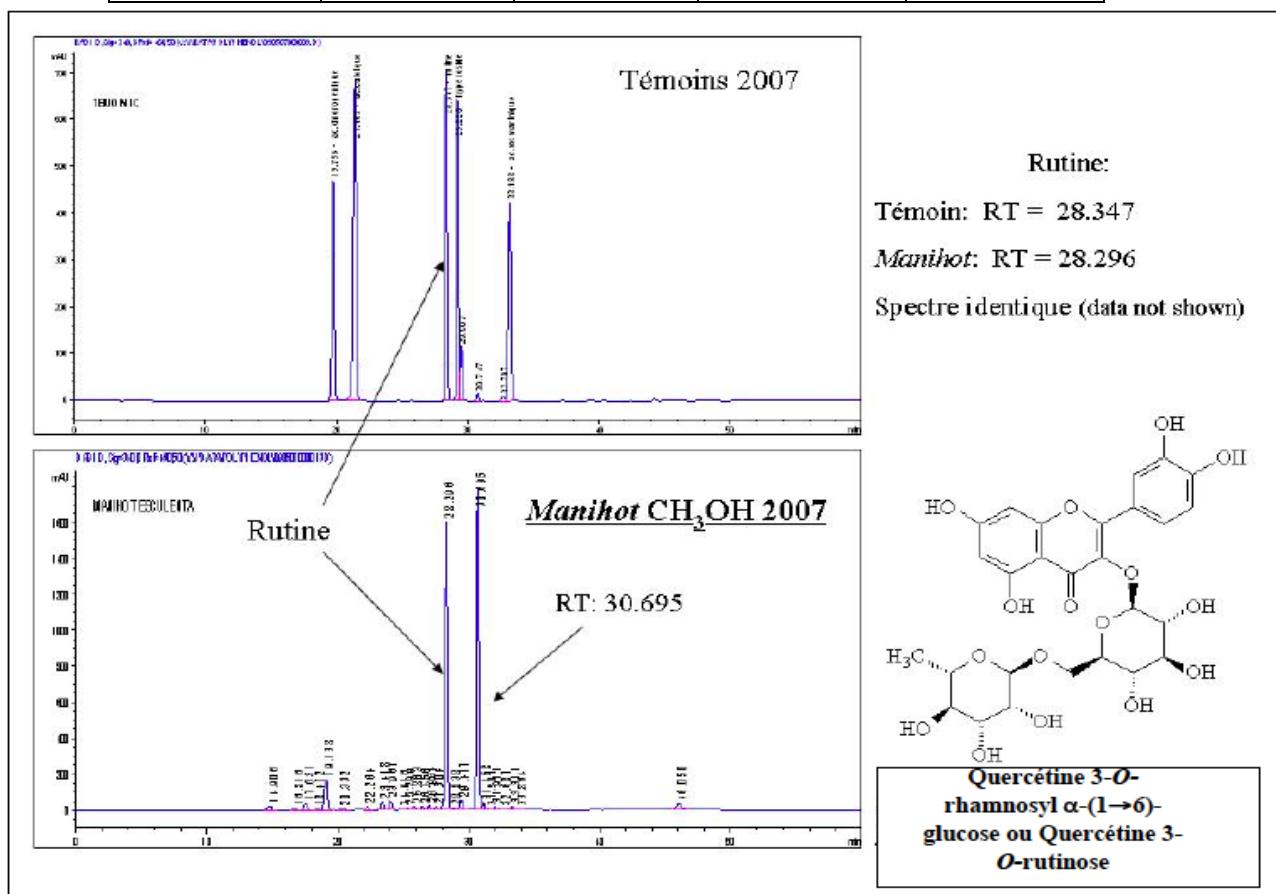


Fig. 4b: Analyse effectuée en 2011-2012 : chromatogrammes (340 nm) des témoins (rutine, kaempférol-3-O-rutinose et amentoflavone), du manioc et leurs spectres

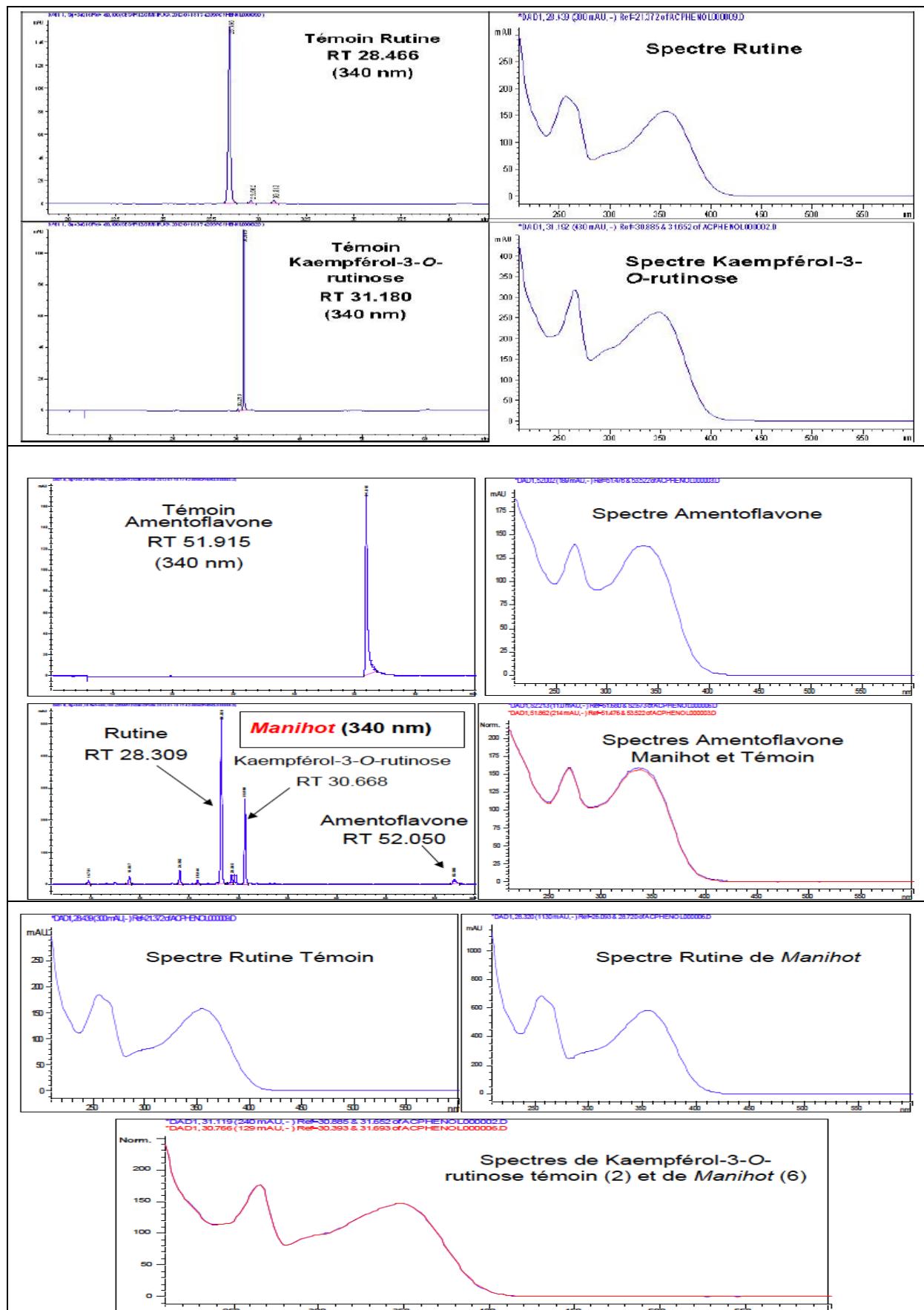
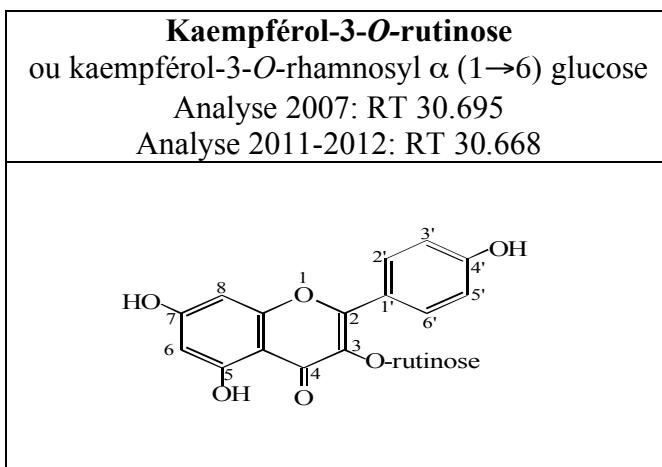


Fig. 4c: Analyse effectuée en 2011-2012 : Structure du kaempférol-3-*O*-rutinose,
2^{ème} flavonoïde de la feuille de manioc



Le composé le plus abondant est élué aux temps 28.296 pour 2007 (Fig. 4a) et 28.309 pour 2011-2012 (Fig. 4b), qui sont très proches de ceux du témoin « rutine » : 28.347 pour 2007 et 28.466 pour 2011- 2012. La comparaison des spectres d'absorbance des 2 substances avec celui du témoin rutine révèle que les 2 sont le même composé : la **rutine**.

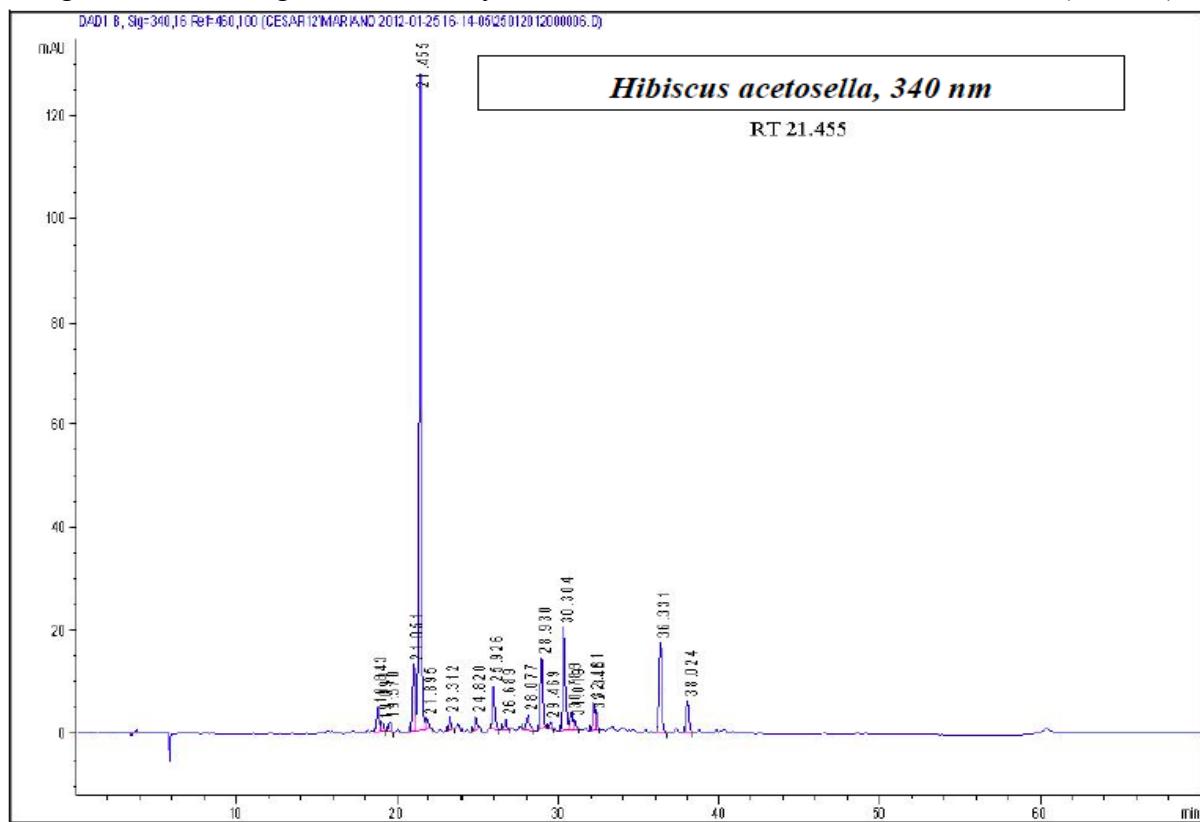
Un autre composé présent en quantité importante aussi bien dans l'analyse de 2007 que dans celle de 2011- 2012 était élué respectivement aux temps 30.695 (analyse 2007) et 30.668 (analyse 2011- 2012). Le témoin au temps de rétention le plus proche de ces valeurs est le **kaempférol-3-*O*-rutinose**. La parfaite superposition du spectre d'absorbance du composé élué avec celui du témoin confirme qu'il s'agit du même composé (Fig. 4b).

Les deux résultats corroborent les observations que nous avons faites pour la CCM.

Le petit pic d'élution en fin d'analyse sur le chromatogramme de 2011-2012 est intéressant pour son temps de rétention particulièrement long par rapport à celui de la majorité des substances éluées (52.050). Le témoin dont le temps de rétention est le plus proche est l'amentoflavone (Fig. 4b, RT 51.915). La superposition parfaite de spectres d'absorbance de ces substances (Fig. 4b) indique que ce produit est **l'amentoflavone**, un biflavonoïde formé par une liaison C3'→C8'' entre deux molécules d'apigénine.

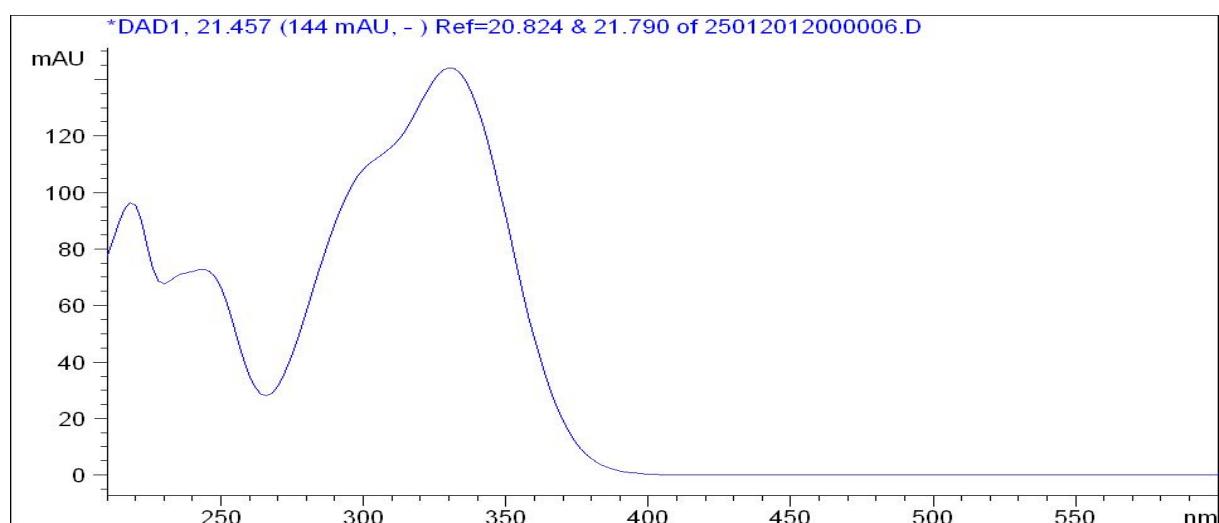
3.2.5.2.2 Résultats pour *Hibiscus acetosella*

Fig. 5a : Chromatogramme d' analyse CLHP 2011-2012 d'*Hibiscus acetosella* (340 nm)



La Fig. 5a présente le chromatogramme (340 nm) de l'analyse CLHP 2011-2012 de l'extrait méthanolique d'*Hibiscus acetosella*. Le composé principal (pic d'élution le plus important) est élué au RT 21.455. Son spectre d'absorbance est présenté dans la figure 5b : il est de type "acide phénol", mais son temps de rétention et son spectre d'absorbance ne correspondent pas aux acides phénols de référence du laboratoire de pharmacognosie de l'ULg.

Fig. 5b : Spectre d'absorbance du composé majoritaire d'*Hibiscus acetosella*,

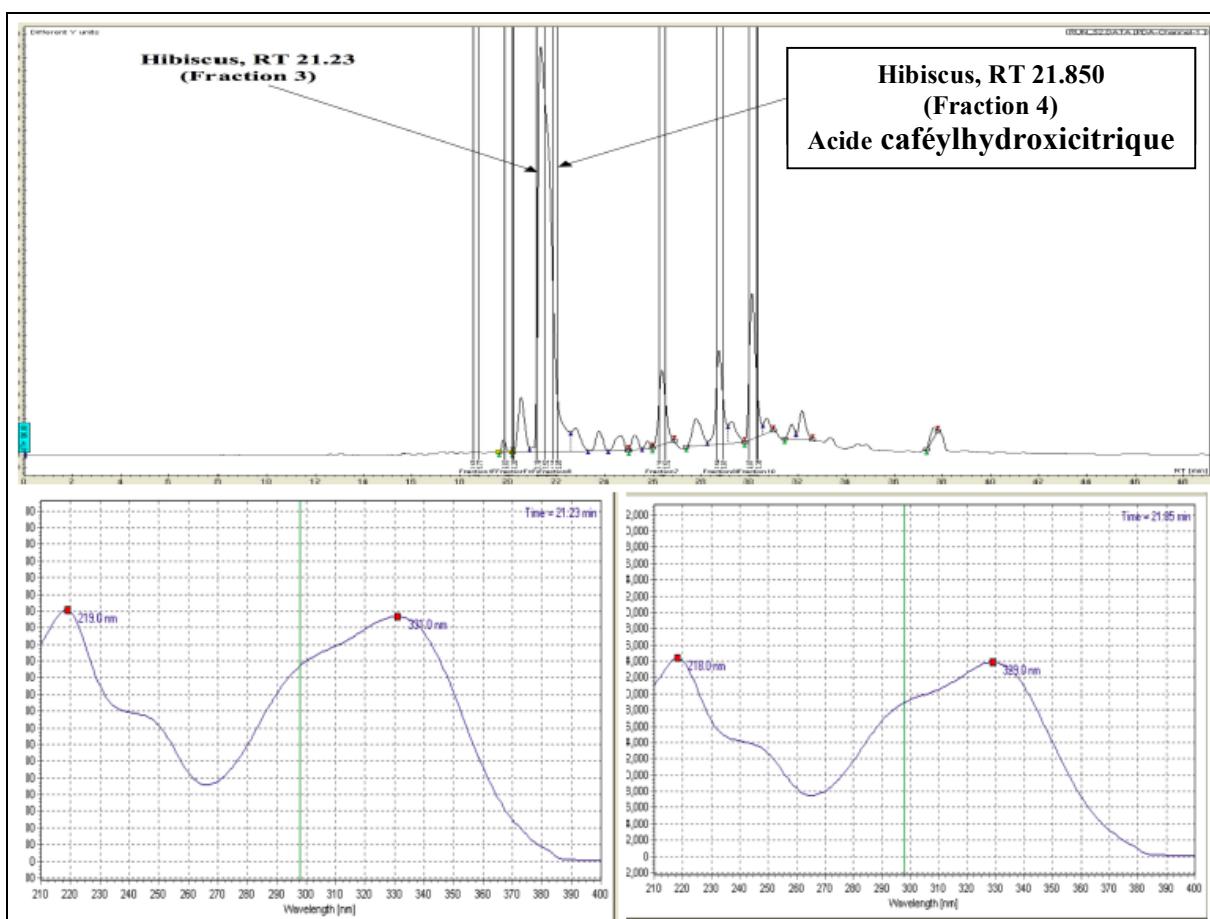


Isolation et détermination de la structure de cet acide phénol

Nous avons isolé ce produit au cours d'une analyse CLHP préparative effectuée selon la même méthode que la CLHP analytique et dans le respect des particularités propres à une CLHP préparative, notamment le volume d'injection et le débit de la phase mobile.

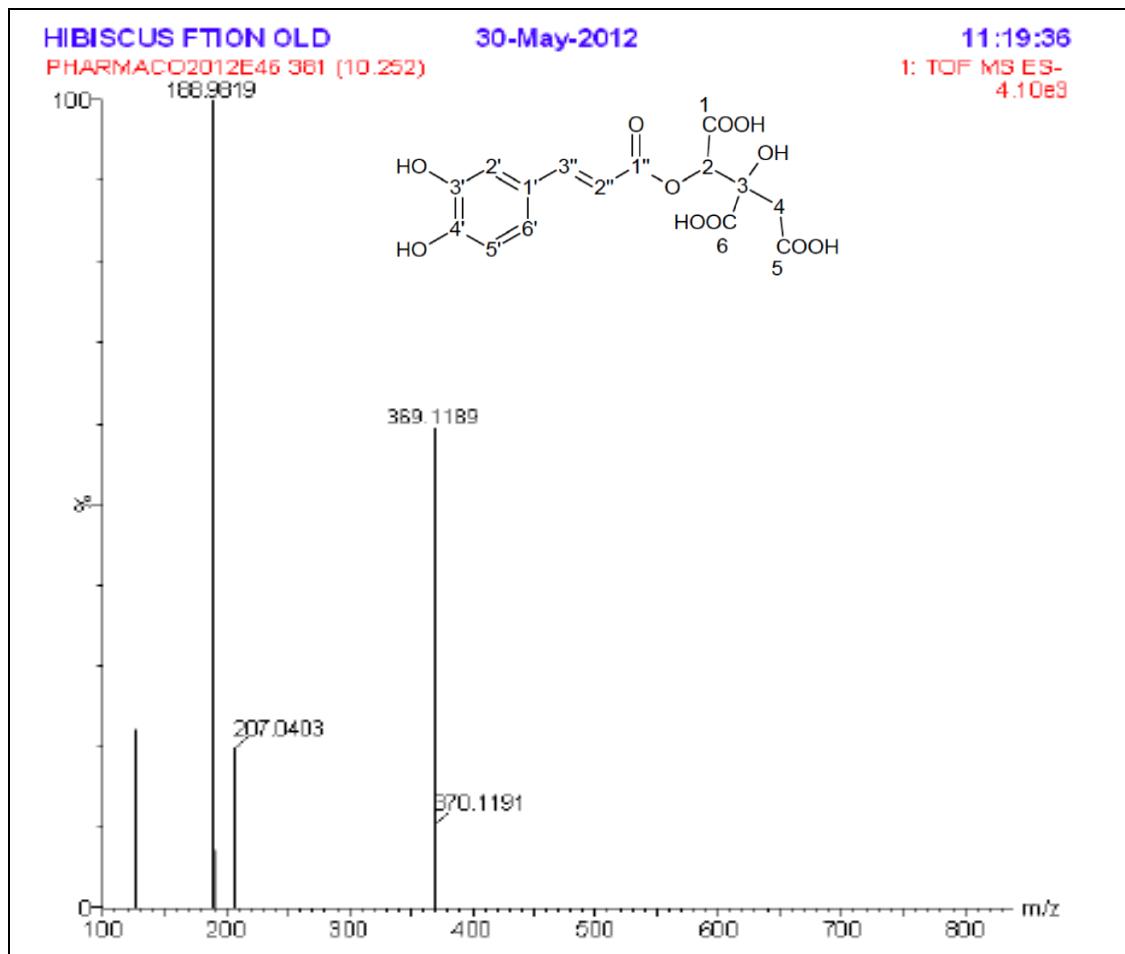
Nous avons ensuite étudié ce composé à son état pur en CLHP analytique, en spectrométrie de masse et en RMN. La figure 6 présente le schéma de séparation (340 nm) et le spectre UV de ce composé (fraction 4) dont l'élution a été immédiatement précédée de celle de la fraction 3.

Fig. 6 : Schéma de séparation du composé principal de l'extrait d'*Hibiscus acetosella* (Fraction 4)



Le tableau 16 présente le spectre de masse de ce composé (Fraction 4); le tableau 17 présente les données de l'analyse de son spectre RMN: il s'agit de l'**acide cafénylhydroxycitrique**.

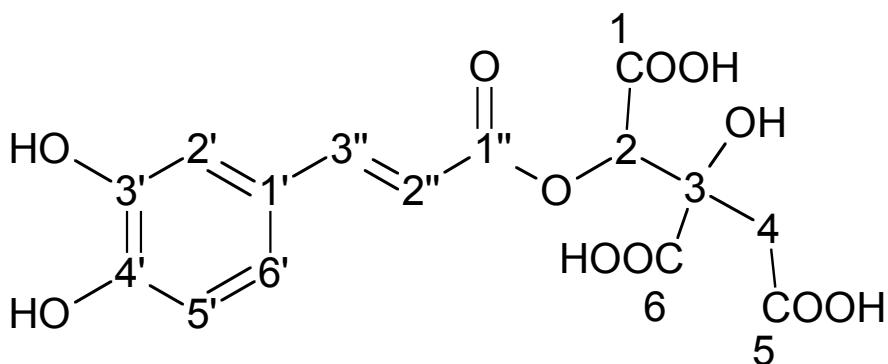
Tab. 16: Spectre de masse de l'acide cafénylhydroxycitrique,
composé principal d'*Hibiscus acetosella*



La masse de 370.1 correspond à C₁₅H₁₄O₁₁. Le pic 207.0 correspond à l'acide hydroxycitrique (moins 1 H) ; le pic à 188,9 correspond à l'acide hydroxycitrique dans sa forme de lactone (208 – 18 pour H₂O) ; la différence de 163 entre 370 (masse de la molécule) et 207 (acide hydroxycitrique) correspond à l'acide caférique moins H₂O.

Tab. 17 : Données du spectre RMN de l' **acide cafénylhydroxycitrique**, composé principal d' *Hibiscus acetosella*, pris dans l'acétone deutéré, et structure de ce composé

N°	H (J)	C	COSY	HMBC (H→C)
1 (C)		168,08		
2 (CH)	5,51	76,34		1, 3, 4, 6, 1''
3 (C)		76,24		
4 (CH ₂) a	3,11 (16,6 Hz)	40,43	4b	2, 3, 5, 6
b	3,01 (16,6 Hz)	40,43	4a	2, 3, 5, 6
5 (C)		171,42		
6 (C)		172,89		
1' (C)		127,46		
2' (CH)	7,23	115,34		3', 4', 6', 3''
3' (C)		146,26		
4' (C)		149,01		
5' (CH)	6,90 (8,1 Hz)	116,37	6'	1', 3', 4'
6' (CH)	7,10 (8,1 Hz)	122,91	5'	2', 4', 3''
1'' (C)		166,56		
2'' (CH)	6,41 (15,9 Hz)	114,49	3''	1', 1''
3'' (CH)	7,67 (15,9 Hz)	147,22	2''	2', 6', 1''



3.2.5.2.3 Comparaison des chromatogrammes CLHP (340 nm) selon le solvant et le traitement thermique

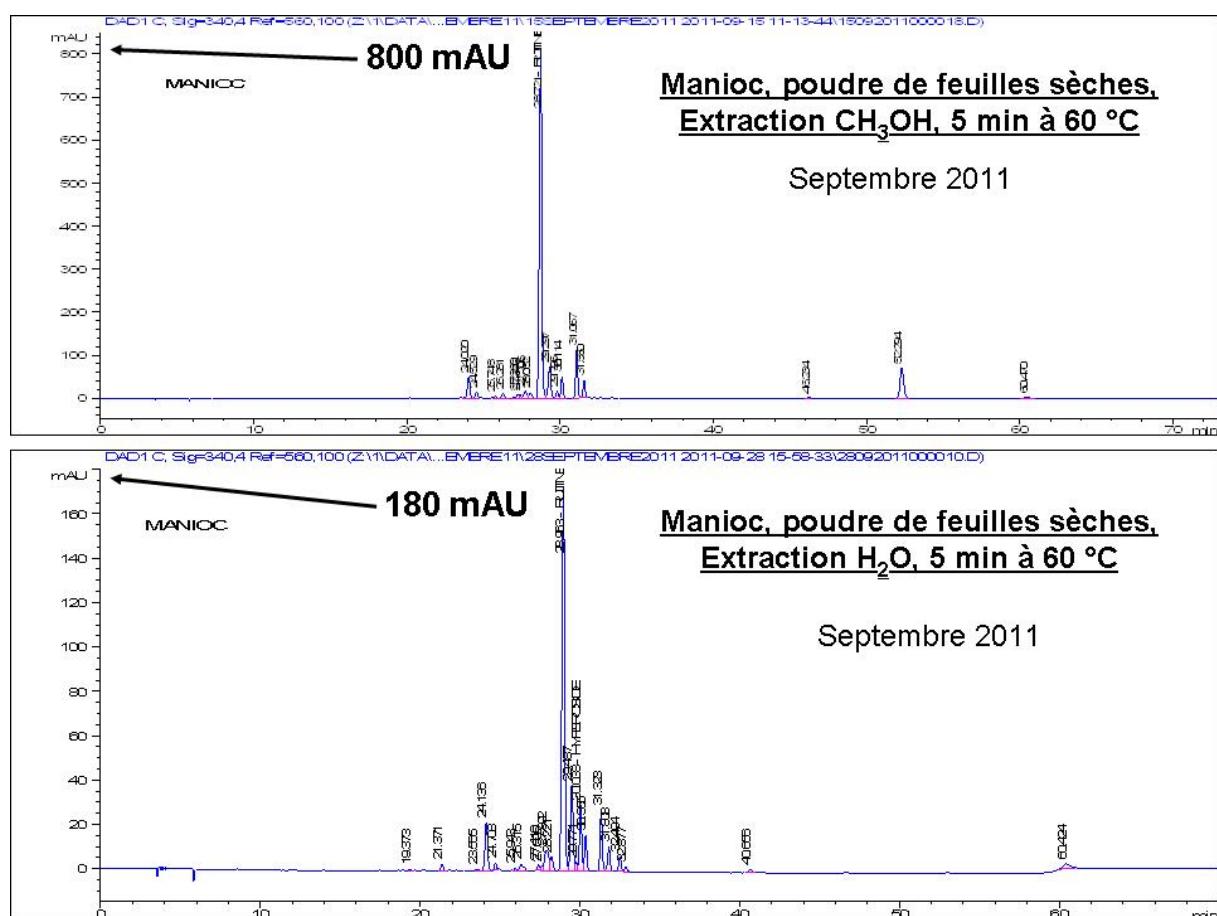
Vu que les préparations culinaires se font à chaud, nous avons voulu nous assurer qu'il n'y avait pas trop de dégradation du contenu polyphénolique de ces plantes. C'est pourquoi nous avons effectué des extractions aqueuses à 60 puis à 100 °C et comparé l'un à l'autre les chromatogrammes CLHP de chacun de ces extraits.

Nous avons également comparé les extraits aqueux aux extraits méthanoliques pour voir s'il y avait de grandes différences du profil des chromatogrammes entre les extraits obtenus de ces deux différents solvants (Manioc : Fig. 7 a et b ; Hibiscus : Fig 8 a et b).

➤ *Manihot esculenta*

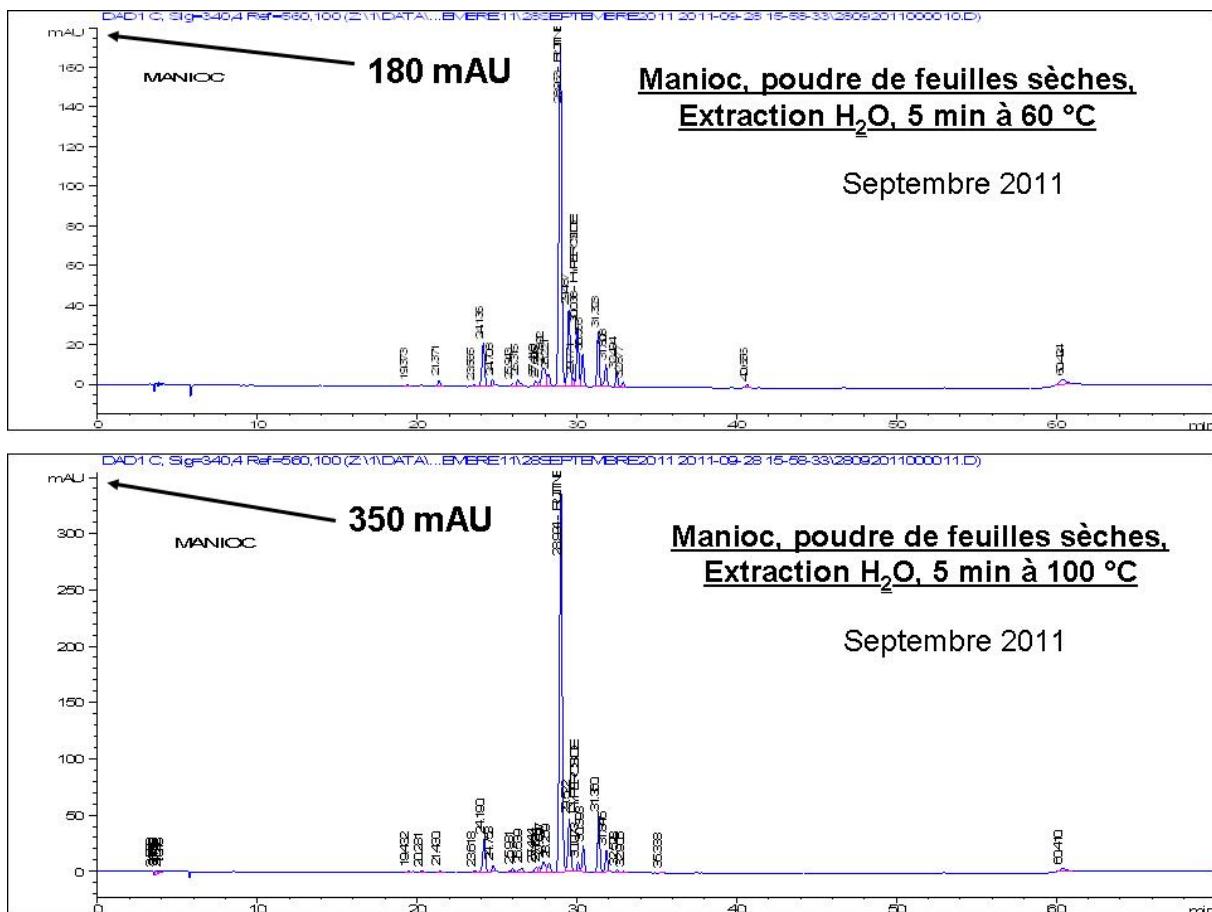
Fig. 7 : Comparaison de l'effet du solvant et du traitement thermique

Fig 7a : Extraction au méthanol vs. eau à 60 °C



Sur cette figure (7a), la similitude des profils des chromatogrammes nous fait observer que pour la poudre de feuilles sèches de manioc, à 60 °C, les composés extractibles au méthanol le sont également à l'eau, mais que le rendement de l'extraction méthanolique est supérieur à celui de l'extraction aqueuse dans un rapport d'environ 4 à 1.

Fig 7b : Extraction à l'eau, 60 °C vs. 100 ° C



Dans le cas d'une extraction aqueuse à partir de la même poudre des feuilles sèches de manioc, la figure 7b illustre deux faits :

- le passage d'une extraction aqueuse à 60 °C pendant 5 minutes à une autre à 100 °C pour la même durée ne change pas le profil du chromatogramme quant aux composés extractibles ;
- cependant, l'extraction à 100 °C pendant 5 min double pratiquement le rendement d'extraction par rapport à celle effectuée à 60 °C pour la même durée.

En ce qui concerne la concentration de la rutine et du kaempférol-3-*O*-rutinose dans l'échantillon de manioc, nous avons considéré les deux composés majoritaires ensemble. Notre analyse CLHP a estimé une teneur de **14.53 mg** par gramme de poudre sèche pour

l'échantillon *Manihot esculenta* 1/_{Novembre 2011} et de **11.64 mg** pour *Manihot esculenta* 2/_{Novembre 2011}.

Après avoir calculé la teneur en eau des feuilles de manioc fraîches (**73 %**) et déterminé la perte à la déssication (**10 %**), nous avons estimé le taux de rutine et de kaempférrol-3-*O*-rutinose extractible à l'eau à partir des feuilles fraîches de manioc dans les conditions où nous avons effectué nos extractions (à 100 ° C en 5 min), qui sont proches des conditions habituelles de préparation culinaire dans la province du Bas-Congo (Tab. 18).

Tab. 18 : **Manioc**: estimation du taux de (rutine + kaempférrol-3-*O*- rutinose) extractible à l'eau, 5 min à 100 °C*

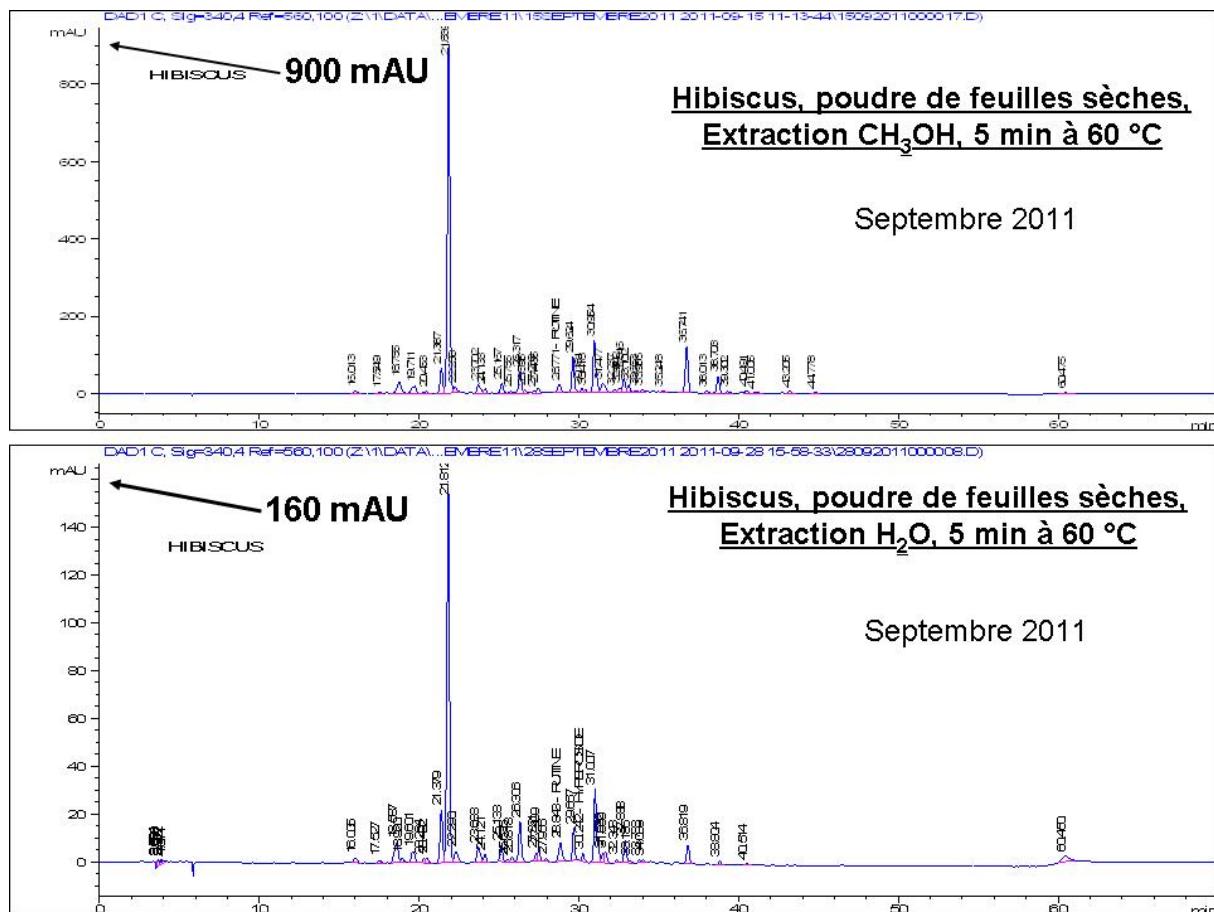
	Poudre desséchée		Poudre sèche		Feuilles fraîches	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
<i>Manihot esculenta</i> 1/_{Novembre 2011}	16.14	1.61	14.53	1.45	3.92	0.39
<i>Manihot esculenta</i> 2/_{Novembre 2011}	12.93	1.29	11.64	1.16	3.14	0.31

* : exprimé en rutine

➤ *Hibiscus acetosella*

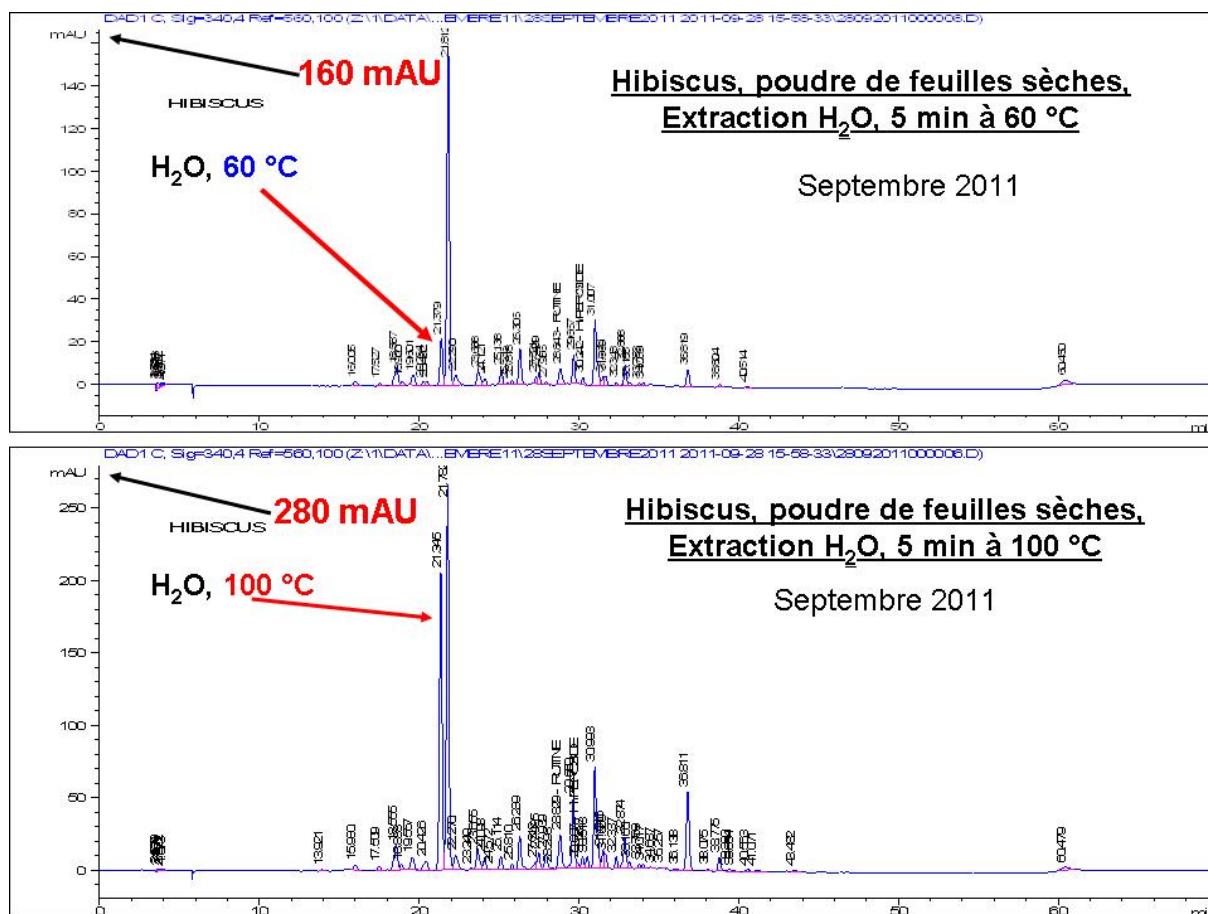
Fig. 8 : Comparaison de l'effet du traitement thermique et du solvant

Fig. 8a : Extraction au méthanol vs. eau à 60 °C



La figure 8a corrobore les observations que nous avons faites sur le manioc (Fig. 7a). Dans l'extraction méthanolique, le rendement de l'extraction du composé majoritaire est même plus de 5 fois plus grand que celui du même composé dans l'extraction aqueuse.

Fig. 8b: Extraction à l'eau, 60 °C vs. 100 °C



En ce qui concerne l'extrait aqueux d'*Hibiscus acetosella*, contrairement au manioc, nous observons que le passage d'une extraction à 60 °C à une autre à 100 °C pendant 5 minutes a significativement augmenté la hauteur du pic du composé élué juste avant le pic majoritaire de l'acide cafénylhydroxycitrique. Ce serait dû à la formation d'une lactone au niveau de l'acide hydroxycitrique (Takashi et al. 2007 ; Parveen et al. 2008). Toutefois, cette transformation ne devrait pas significativement affecter l'activité AOX du composé, qui est plutôt principalement due à sa partie « acide caféique ».

Notre analyse CLHP a estimé une teneur de **1.173 mg d'acide cafénylhydroxycitrique** et de **1.294 mg de sa forme lactone** pour une pesée de **1.00094 g de poudre sèche**.

Comme pour le manioc, nous avons calculé la **teneur en eau des feuilles fraîches** d'hibiscus (**86 %**) et déterminé la **perte à la déssication (8 %)**. Ceci nous a permis d'estimer le taux d'acide cafénylhydroxycitrique et de sa forme lactone extractible à l'eau à partir des feuilles fraîches d'hibiscus dans les conditions où nous avons effectué nos extractions (à 100 °C).

pendant 5 min), qui sont proches des conditions traditionnelles de préparation culinaire (Tab. 19).

Tab. 19: **Hibiscus** : estimation du taux d'acide cafénylhydroxycitrique et de la forme lactone extractible à l'eau, 5 min à 100 ° C *

	Poudre desséchée		Poudre sèche		Feuilles fraîches	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
Acide cafénylhydroxycitrique	1.28	0.13	1.172	0.12	0.16	0.016
Unité cafényl avec forme lactone	1.4	0.14	1.29	0.13	0.18	0.018

* : exprimé en acide chlorogénique

3.3 Discussion

Il existe plusieurs méthodes et solvants pour extraire les polyphénols de leur milieu biologique. Le rendement d'une extraction dépend de l'interaction entre le solvant et les composés à extraire, le pH du solvant, la température, la durée de l'extraction, etc. La nature des molécules à extraire doit déterminer le choix du solvant. Pour extraire de leur milieu biologique des composés polaires et hydrosolubles, l'eau est un solvant adéquat. La liaison d'une génine à un sucre augmente l'hydrosolubilité du flavonoïde.

Pour les tests biochimiques envisagés dans nos objectifs de recherche, nous avons prévu d'utiliser les extractions aqueuses pour être plus proches des conditions traditionnelles de préparation culinaire des plantes que nous avons sélectionnées, car elles sont cuites à l'eau.

Le profil des chromatogrammes CLHP montre que les polyphénols présents en grande ou en petite concentration dans les poudres des plantes que nous avons analysées, sont extractibles par l'eau et le méthanol, mais avec des rendements différents. C'est notamment le cas pour le manioc et l'hibiscus.

Notre recherche des polyphénols a commencé par la technique de séparation par CCM. Cette méthode, simple, fournit des renseignements très utiles basés sur différentes propriétés des flavonoïdes et des acides phénols. Le nombre de groupes hydroxyles, la présence ou non d'oses sur la molécule déterminent la polarité de celle-ci, ses différentes interactions notamment avec la phase stationnaire et sa séparation le long de la ligne de migration. Le réactif de révélation utilisé (DPBAE avec observation à 365 nm) est aussi d'une grande utilité car il nous a permis directement d'avoir une idée sur le type de constituants présents dans les plantes analysées. En effet, comme d'autres chercheurs dans le laboratoire, nous avons constaté que les acides phénols fluorescent en bleu alors que les flavonoïdes sont révélés dans des couleurs variant de l'orangé au vert. Concernant ces derniers, on constate que les différences de coloration sont liées au nombre d'hydroxyle sur le cycle latéral B : les dérivés de la quercétine telle que la rutine (2-OH sur ce cycle B) donnent des colorations orangées alors que les dérivés du kaempférol (1-OH sur ce même cycle) sont révélés dans des nuances de vert.

Pratiquement tous les échantillons sélectionnés présentent diverses bandes fluorescentes suggérant la présence de flavonoïdes et/ou d'acides phénols mais avec des intensités

variables. Comme les coumarines fluorescent aussi en bleu, leur mise en évidence a été effectuée, mais elle a été négative (données non présentées).

Nous avons ensuite effectué une estimation des polyphénols totaux par le test au réactif phospho-molybdo-tungstique (réactif de Folin-Ciocalteu) selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne ("détermination des tanins dans les drogues végétales"). Ce réactif est un mélange oxydant d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit en un mélange bleu de tungstène et de molybdène lorsque les réducteurs présents dans le milieu réactif sont oxydés (Singleton et Rossi 1965; Singleton et al. 1999; Boizot et Charpentier 2006). La coloration produite par les oxydes bleus de tungstène et de molybdène (absorption maximale entre 725 et 750 nm) est proportionnelle à la concentration des polyphénols dans l'échantillon à analyser.

La détermination des tanins met à profit la propriété de ces substances de précipiter les protéines. Elle est associée à l'estimation des polyphénols totaux par la méthode au réactif phospho-molybdo-tungstique évoquée ci-dessus. Cette méthode est très couramment utilisée et présente l'avantage d'être simple et sensible. Toutefois, elle est peu spécifique des polyphénols, car le réactif réagit aussi bien avec les polyphénols qu'avec tout autre réducteur, comme les protéines portant la tyrosine et/ou le tryptophane, les sucres réducteurs (c'est-à-dire les aldoses), l'acide ascorbique, l'acide tartrique, les sulfites, etc (Boizot et Charpentier 2006). Ainsi, elle devrait être soit précédée de l'élimination préalable de tous les autres réducteurs du milieu, soit complétée par des méthodes plus appropriées aux flavonoïdes et aux dérivés d'acides phénols.

C'est pourquoi nous avons également appliqué une méthode plus spécifique des flavonoïdes : leur dosage selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne (Feuille de bouleau). Le mélange "acétone - acide chlorhydrique - hexaméthylènetétramine" est utilisé pour ce dosage. Lors du chauffage, il y a hydrolyse des liaisons *O*-hétérosides et précipitation des tanins catéchiques, qui sont ensuite éliminés par filtration. Les liaisons C-hétérosides résistent à cette hydrolyse, mais elles sont moins fréquentes dans le règne végétal. Les génines, libérées de leurs sucres, peuvent ainsi être extraites à l'acétate d'éthyle et dosées par spectrométrie avec le réactif au trichlorure d'aluminium.

Parmi les quatre échantillons soumis à cette analyse, nos résultats montrent une teneur voisine de 1.5 % en flavonoïdes exprimés en **hypéroside** pour les trois plantes les plus riches: *Solanum nigrum* > *Hibiscus acetosella* > *Manihot esculenta*.

Enfin, les analyses par CLHP associant séparation des composés et analyse du spectre d'absorbance grâce au détecteur à barrettes de diode, nous ont permis de confirmer la présence à différentes concentrations, de flavonoïdes et de dérivés d'acides phénols. Elles ont été plus approfondies pour les échantillons de *Manihot esculenta* et d'*Hibiscus acetosella*.

Dans les feuilles de *Manihot esculenta*, nous avons pu mettre en évidence la présence de rutine, du kampférol-3-*O*-rutinose et vraisemblablement de l'amentoflavone. Alors que nous avions déjà commencé notre étude, ces composés ont été récemment identifiés dans l'espèce *Manihot utilissima* (Salawu et al. 2009 et 2011).

Concernant les feuilles d'*Hibiscus acetosella*, nous avons pu identifier grâce aux analyses spectrales, le pic majoritaire : il s'agit de l'acide caféylhydroxycitrique. C'est lui qui donne une fluorescence bleue importante en CCM, fluorescence dont le facteur de rétention ne correspond à aucun de nos témoins.

Ce composé a été récemment mis en évidence dans *Dactylis glomerata*, de la famille des Poaceae (Parveen et al. 2008), et dans l'espèce *Hibiscus sabdariffa* (Herranz-López et al. 2012).

Lors de leur préparation culinaire, les plantes alimentaires que nous avons analysées sont soumises à un traitement thermique. Nous avons chauffé nos échantillons à 100 °C pendant 5 minutes. Les résultats de notre étude montrent que ce traitement n'apporterait pas beaucoup de modifications au profil chromatographique des composés, notamment dans le cas du manioc. Par contre pour l'hibiscus, nous constatons une modification de ce profil. En effet, la littérature signale que la partie "acide hydroxycitrique" du composé principal se transformerait en une lactone, tandis que la partie polyphénol, qui est le responsable immédiat de l'activité AOX, ne semble pas s'altérer (Takashi et al. 2007 ; Parveen et al. 2008).

3.4 Références bibliographiques

- Boizot N, Charpentier J-P (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*, Numéro spécial, 79-86
- Herranz-López M, Fernández-Arroyo S, Pérez-Sánchez A, Barrajón-Catalán E, Beltrán-Debón R, Menéndez J A, Alonso-Villaverde C, Segura-Carretero A, Joven J, Micol V (2012) Synergism of plant – derived polyphenols in adipogenesis : Perspectives and implications. *Phytomedicine* 19, 253-61
- Parveen I, Winters A, Threadgill M D, Hauck B, Morris P (2008) Extraction, structural characterisation and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 69 (16), 2799-806
- Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition 2004. DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament). Conseil de l'Europe. Strasbourg. <http://www.pheur.org>
- Salawu S O, Giaccherini C, Marzia I, Vincieri F F, Afolabi A A, Mulinacci N (2009) HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cynamoil derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chemistry* 115, 1568-74
- Salawu S O, Ogundare A O, Ola-Salawu B B, Akindahunsi A A (2011) Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables. *Afr. J. Pharmacy and Pharmacology* 5(4), 486-92
- Singleton V L, Rossi J A (1965) Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-58
- Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-78
- Takashi Y, Hiroyuki H, Yasuhiro Y (2007) Chemistry, physiological properties and microbial production of hydroxycitric acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 977-982.
- Wagner H, Bladt S (1996) Plant drug analysis. A thin layer chromatography. Atlas Springer Munich 2. ed.

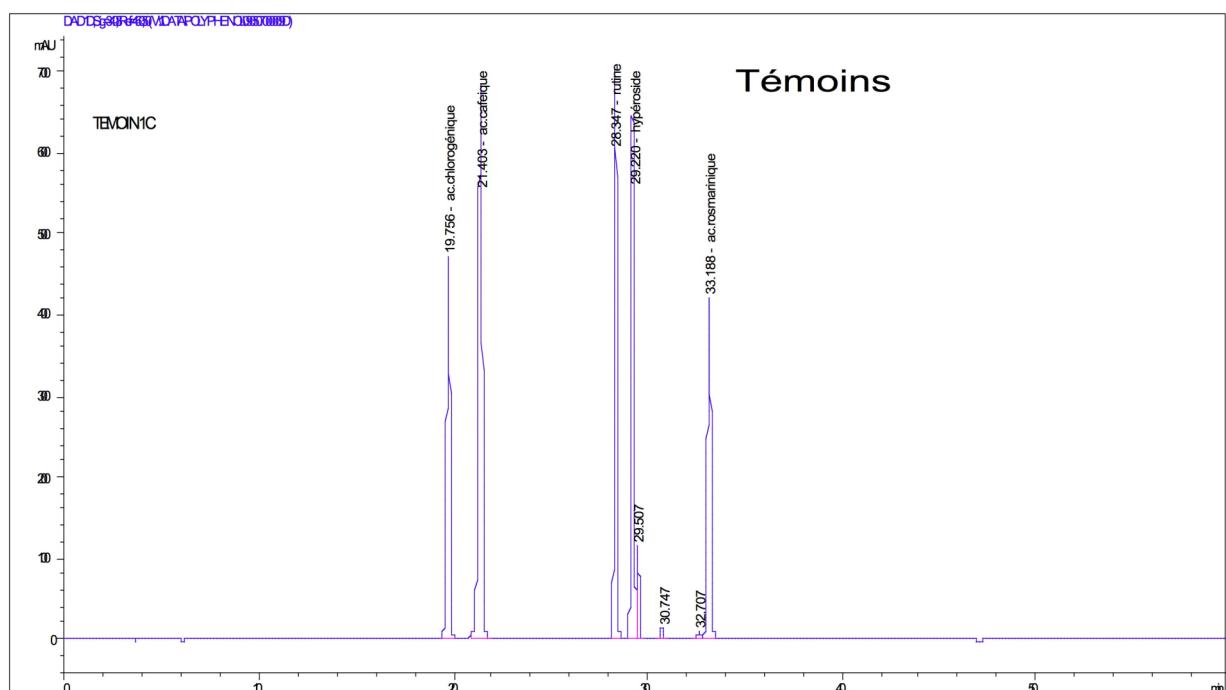
3.5 Annexes à l'étude des polyphénols des plantes sélectionnées

A) Profil chromatographique à 340 nm provenant de l'estimation de la teneur en flavonoïdes et en dérivés d'acides phénols par CLHP des plantes sélectionnées au départ (2007).

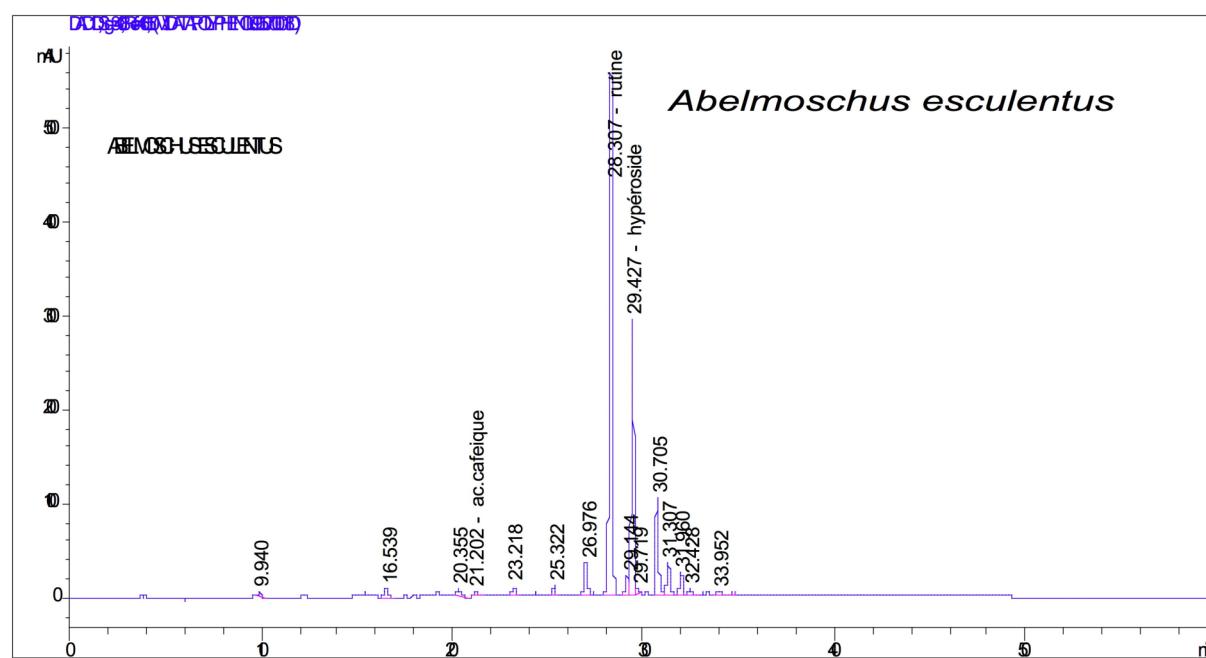
Ci-dessous nous présentons le profil des chromatogrammes à 340 nm obtenus de l'analyse CLHP des flavonoïdes et des dérivés d'acides phénols des plantes sélectionnées au départ. Les chromatogrammes d'*Hibiscus acetosella* et de *Manihot esculenta* provenant de cette analyse ont été présentés dans le texte, avec ceux qui ont été obtenus de l'analyse CLHP plus poussée de ces deux plantes. Les échantillons de *Colocasia esculenta* et de *Gnetum africanum* n'ont pas fait partie de cette analyse.

A1) Les témoins et leurs temps de rétention

Témoin	Temps de rétention (min)
Acide chlorogénique	19.756
Acide caféïque	21.403
Rutine	28.347
Hypéroside	29.220
Acide rosmarinique	33.188

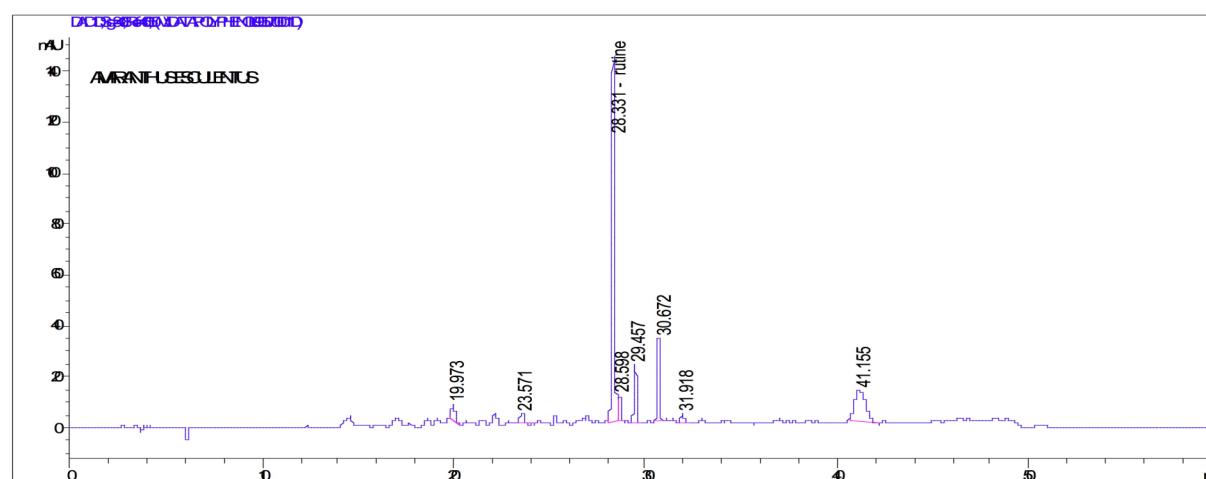


A2) *Abelmoschus esculentus*



L'échantillon d'*Abelmoschus esculentus* contient un composé majoritaire, élué au RT 28.307 de type **rutine**. Le second en importance, élué au RT 29.427, est de type **hypéroside**. Les résultats de notre recherche des flavonoïdes de cette plante par CCM (Fig. 1, Nro 8) sont en harmonie avec ceux obtenus par cette analyse CLHP.

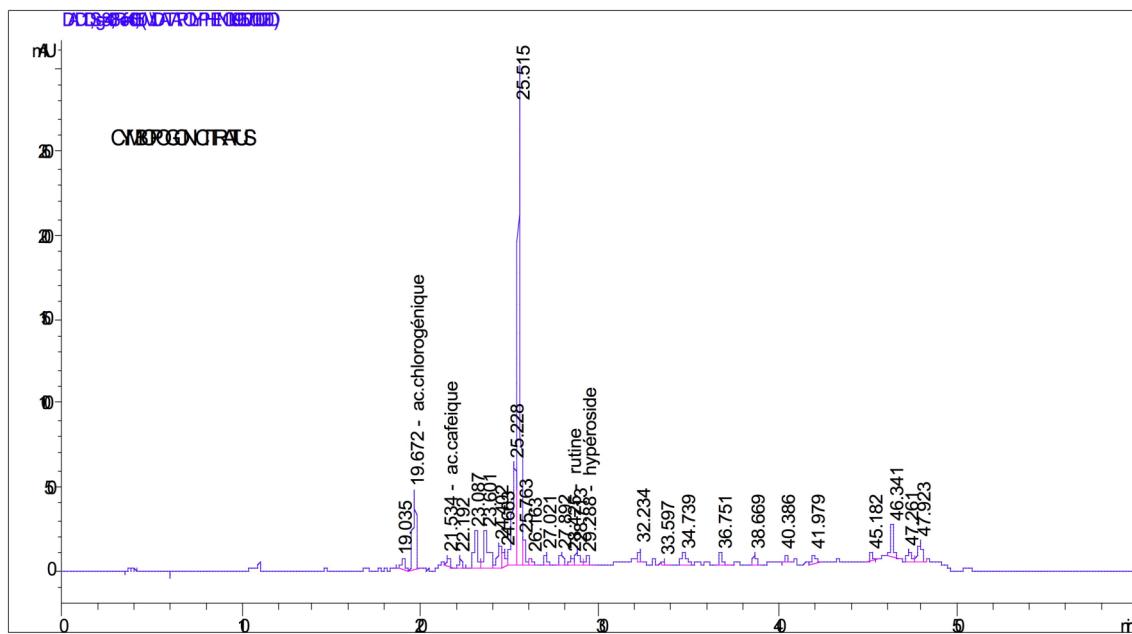
A3) *Amaranthus cruentus*



Le principal composé d'*Amaranthus cruentus* est élué au RT 28.331 et correspond au type "**rutine**". Toutefois, sur la CCM (Fig. 1 Nro 1), la bande dont la couleur de la fluorescence

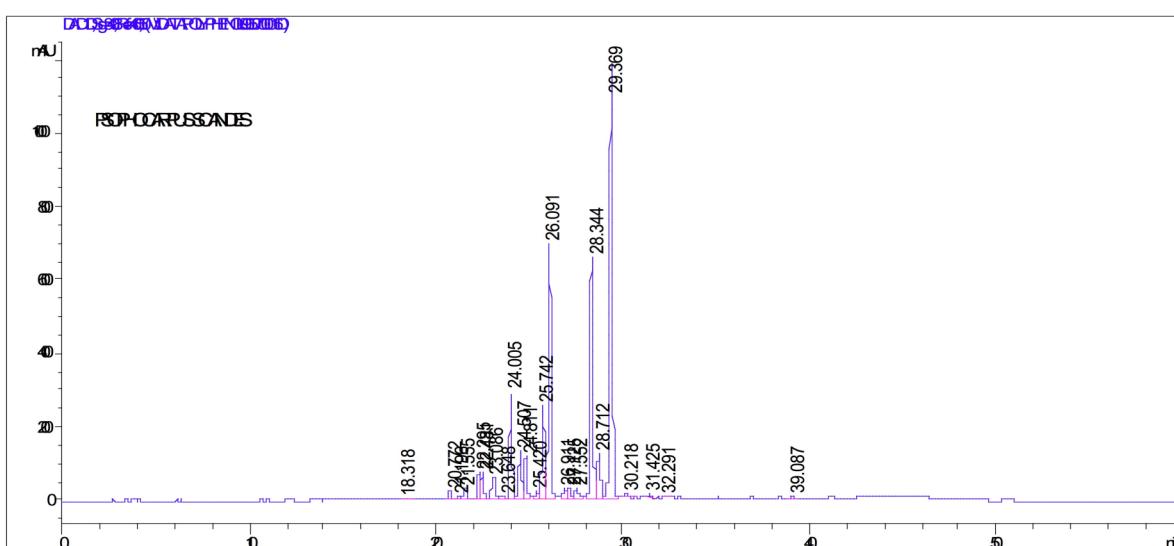
correspond à celle de la rutine (orangée) n'est pas au même facteur de rétention que cette dernière (T_1 , Rf 0.3).

A4) *Cymbopogon citratus*



Tout comme sur la CCM (Fig 1, Nro 10), nous constatons sur ce chromatogramme, la présence d'un pic majoritaire dont le temps de rétention (RT 25.515) ne correspond pas à ceux de nos témoins.

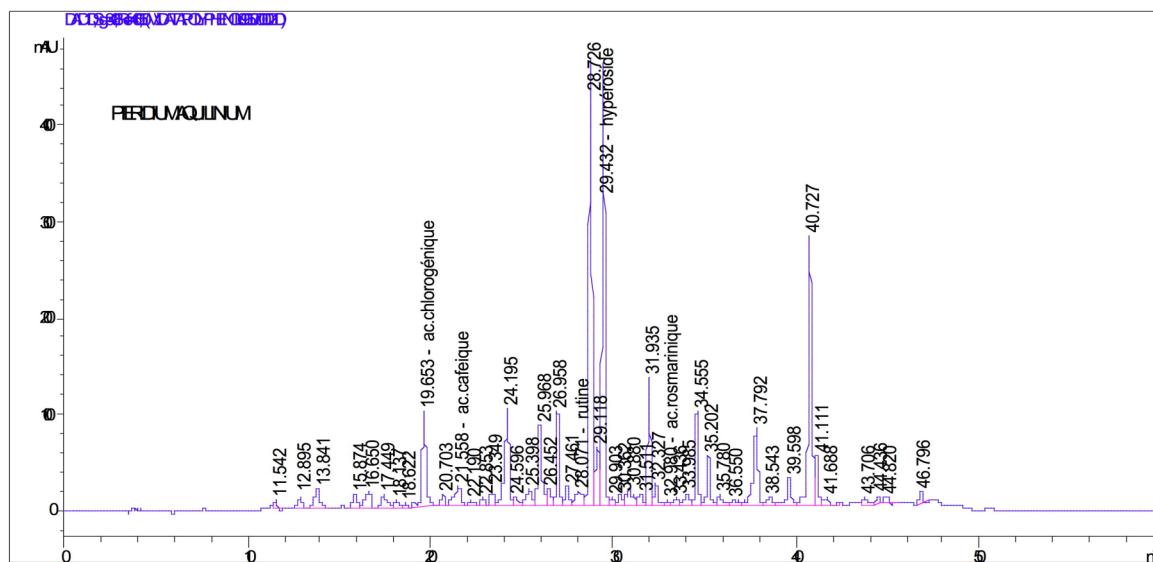
A5) *Psophocarpus scandens*



Les composés majoritaires de l'échantillon de *Psophocarpus scandens* RT 26.09, 28.344 et 29.369) ne correspondent pas aux substances de référence dont nous disposons. Sur la CCM

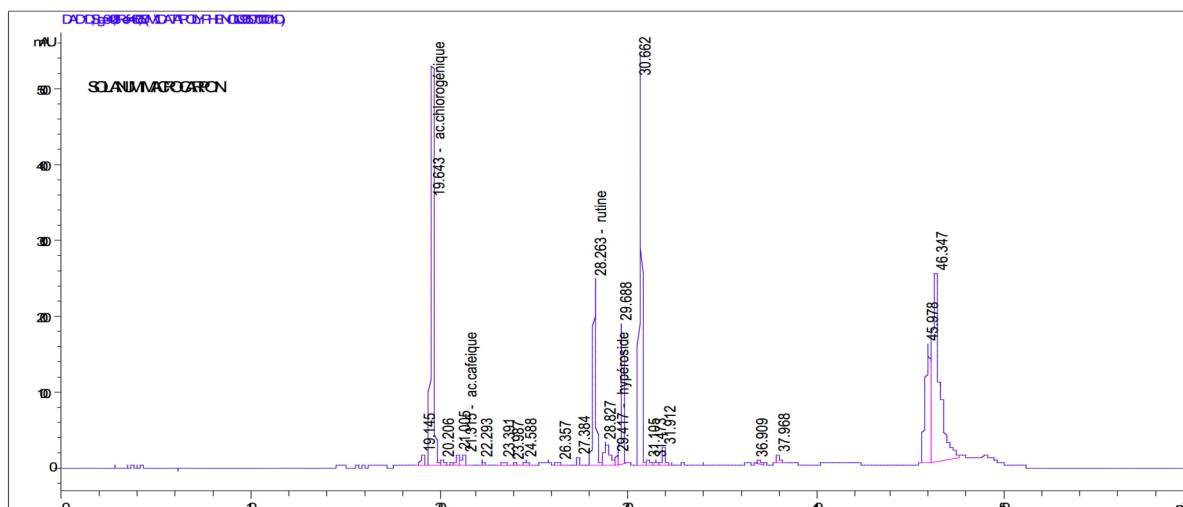
(Fig. 1, Nro 6), cet échantillon présente trois bandes de fluorescence orangée, mais à des facteurs de rétention autres que ceux des substances de référence que nous avons déposées sur la plaque.

A6) *Pteridium aquilinum*



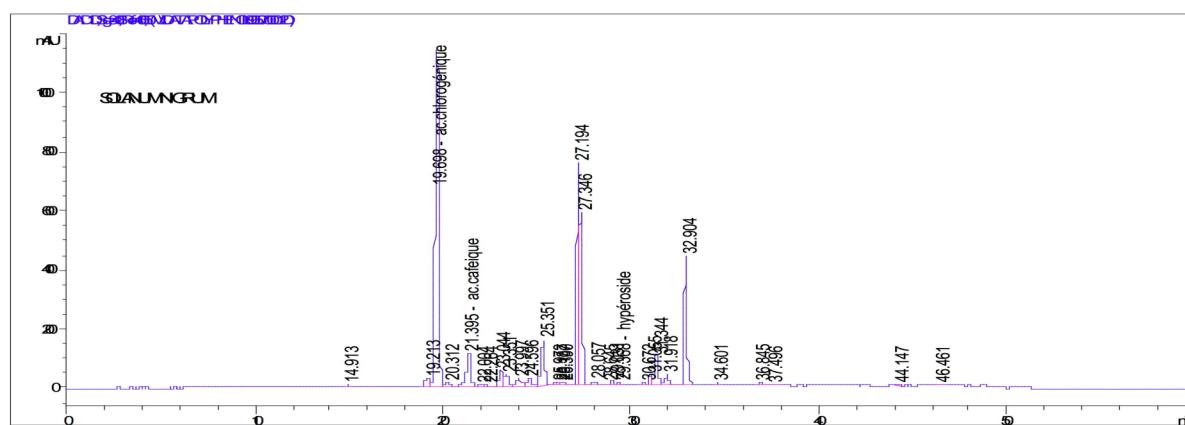
L'échantillon de *Pteridium aquilinum* contient deux composés majoritaires : le premier a été élue au RT 28.726 et le second à 29.432. Le troisième, moins abondant, a été élue au RT 40.727. Le spectre UV du composé élue au RT 29.432 est de type "hypéroside"; ceci est en harmonie avec l'observation que nous avons faite après révélation de la CCM (Fig. 1 Nro 11). Les autres composés ne correspondent pas aux témoins que nous avons injectés.

A7) *Solanum macrocarpon*



Les composés élués aux RT 19.643 (de type **acide chlorogénique**) et 28.263 (de type **rutine**) sont en harmonie avec la CCM à 365 nm après y avoir pulvérisé la solution de révélation. Le composé élué au RT 29.688 est de type **hypéroside** : il n'a pas été décéléré sur la CCM (Fig. 1, Nro 4). Un autre composé important a été élué au RT 30.662, tout comme deux autres, moins abondants mais non négligeables, aux RT 45.978 et 46.34.

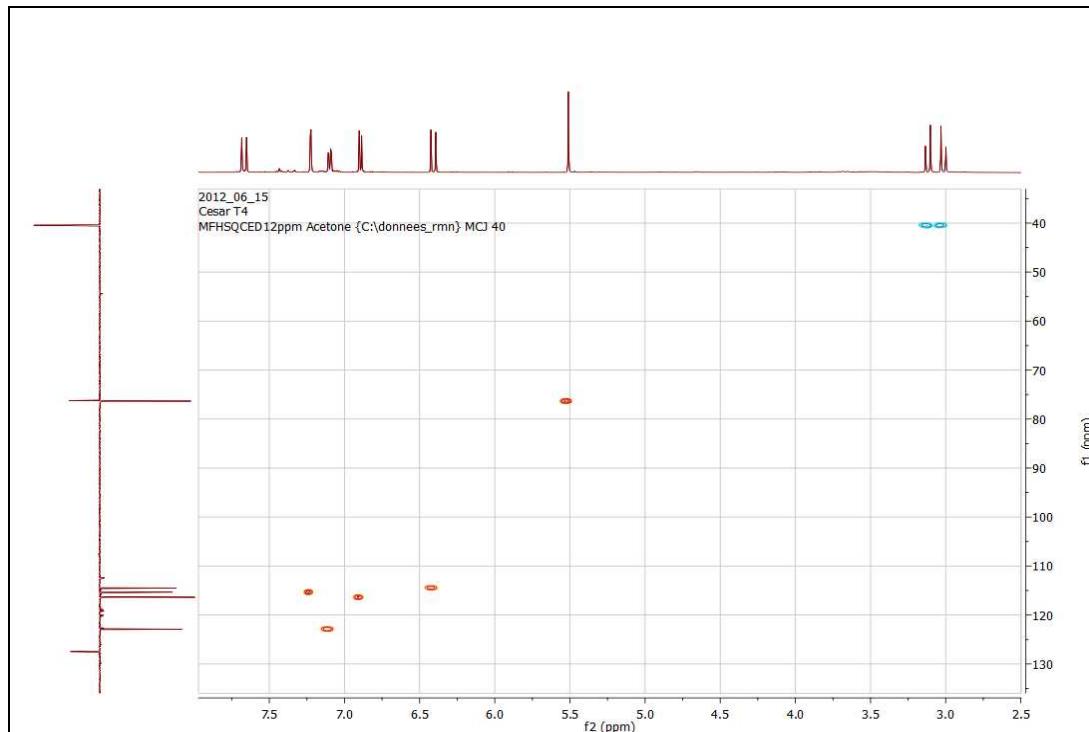
A8) *Solanum nigrum*



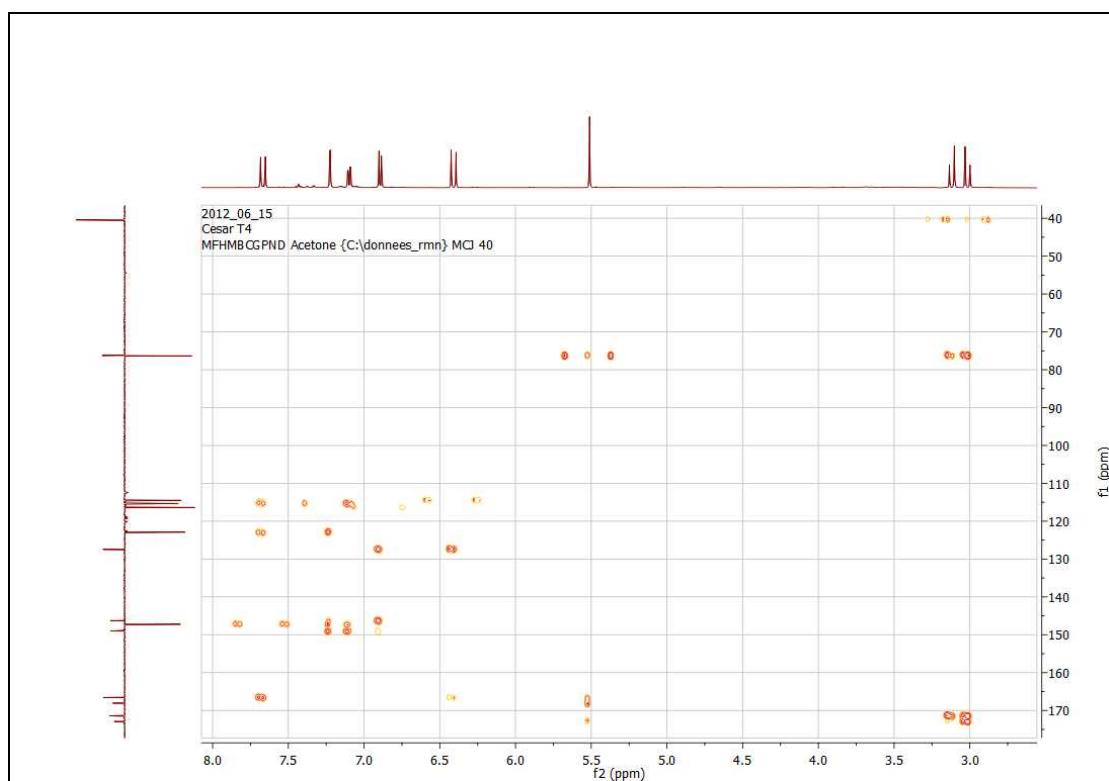
Le principal composé de *Solanum nigrum* est élué au RT 19.808; il est de type "acide chlorogénique". Cette observation corrobore l'observation effectuée avec la CCM sous lumière UV (365 nm) après l'application de la solution de révélation (Fig 1, Nro 2).

B) Spectre RMN du composé principal d'*Hibiscus acetosella* (Analyse 2011-2012)

B1) Spectre RMN HSQC : protons liés aux carbones



B2) Spectre RMN HMBC (correlations H-C éloignées de 2, 3 ou 4 liaisons)



4 Études biochimiques

4.1 Résultats du screening biochimique

Nous avons effectué nos études biochimiques au "Centre de l'oxygène, Recherche et Développement, (CORD)" de l'ULg. Avant ces études, nous avons soumis les extraits aqueux (10 µg/ml) des onze plantes sélectionnées à un screening biochimique à la température du laboratoire.

Ce screening a eu pour but de sélectionner les plantes les plus actives. Il a consisté en trois tests : un test de chimioluminescence effectué sur des neutrophiles activés au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un test pour mesurer l'activité de nitration de la MPO, et un test SIEFED pour mesurer son activité peroxydase. Ces tests sont expliqués en détail dans l'étude biochimique I (4.2). En bref, le test de chimioluminescence mesure l'activité oxydante globale des neutrophiles activés au PMA en présence de nos extraits de plantes; les tests de nitration et SIEFED mesurent l'activité catalytique de nitration et de peroxydase de la MPO en présence des mêmes extraits.

Le tableau 1 présente les pourcentages d'activités oxydantes observées en présence des extraits de sept plantes dont la capacité AOX était faible. Après ce screening, nous n'avons pas retenu ces plantes pour les études biochimiques plus poussées.

Tab. 1: Screening biochimique: résultats des plantes non retenues
pour des études plus poussées

Activité relative (exprimée en %) en présence des extraits de plantes (10 µg/ml) par rapport au contrôle effectué sans extraits de plante et considéré comme 100 %			
Plante	Chimioluminescence	Activité de nitration	Activité de peroxydase
<i>Amaranthus cruentus</i>	74.49 ± 6.76	71.29 ± 8.41	72.76 ± 14.65
<i>Colocasia esculenta</i>	86.73 ± 6.81	80.05 ± 5.23	82.60 ± 11.63
<i>Cymbopogon citratus</i>	79.62 ± 4.9	73.22 ± 6.3	78.32 ± 3.9
<i>Gnetum africanum</i>	80.53 ± 3.5	77.23 ± 3.9	79.71 ± 7.3
<i>Psophocarpus scandens</i>	76.26 ± 5.6	81.45 ± 2.9	77.21 ± 4.7
<i>Solanum macrocarpon</i>	85.73 ± 5.63	79.33 ± 5.15	83.64 ± 9.95
<i>Solanum nigrum</i>	72.33 ± 5.70	73.95 ± 7.44	67.90 ± 7.54

4.2 Étude biochimique I

Teneur en polyphénols et activités modulatrices des extraits de quelques plantes alimentaires tropicales sur les activités oxydantes des neutrophiles et de la myéloperoxydase

Cette étude a fait l'objet d'une publication (*Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 628-650; doi: 10.3390/ijms13010628) qui constitue le corps de l'étude biochimique I, et qui est insérée à la fin du résumé.

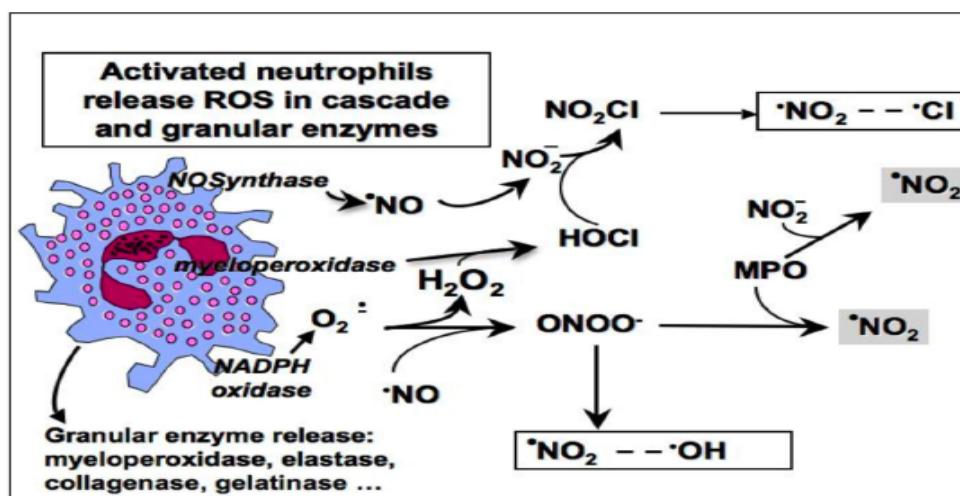
4.2.1 Résumé

Introduction

Parmi les cellules phagocytaires, les neutrophiles sont en première ligne de défense dans l'immunité non spécifique. Grâce à leurs enzymes oxydantes (Nox, NOS, MPO, cyclooxygénases, etc ...), ils produisent d'importantes quantités de ROS pour détruire les organismes pathogènes. Parmi ces enzymes, la MPO se distingue par une amplification rapide de la production des ROS et par la formation de HOCl (acide hypochloreux), un puissant agent bactéricide et oxydant.

En cas de très forte activation, les neutrophiles peuvent libérer dans le milieu extracellulaire le contenu de leurs granules primaires, notamment la MPO qui, en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), déclenche une chaîne d'oxydation délétère pour l'environnement cellulaire (Fig. 1) (Faurschou et Borregaard 2003 [1]; Serteyn et al. 2003 [3]).

Fig. 1 : Production des ROS et libération de la MPO par les neutrophiles activés



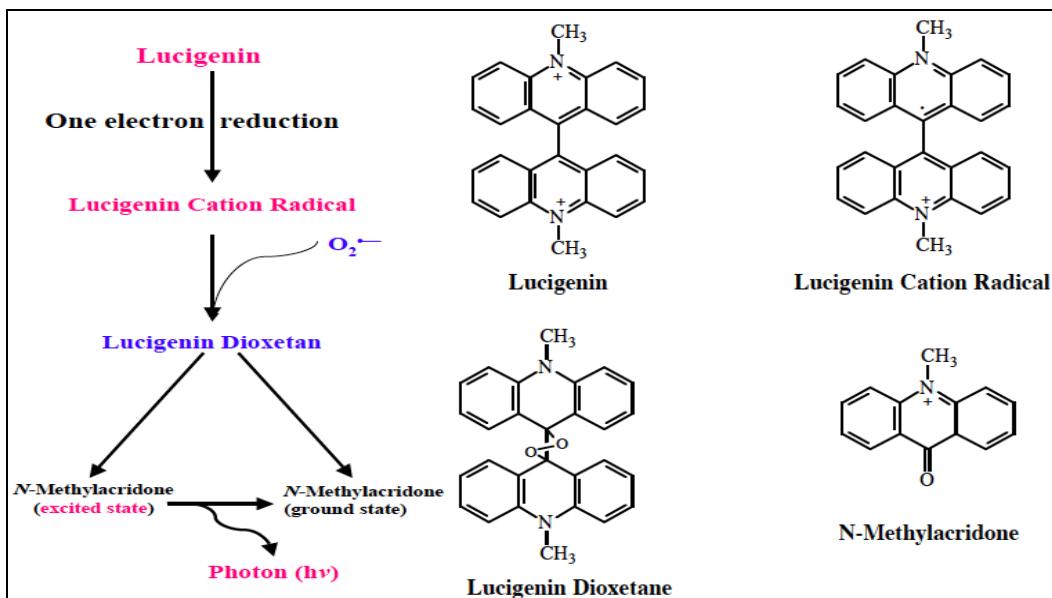
Pour ces raisons, une activité excessive des neutrophiles constitue un facteur de risque pour l’homéostasie de la cellule et de son environnement biologique. Si une telle activité est fréquente, elle peut être impliquée, à long terme, dans la genèse de diverses pathologies associées aux ROS, comme l’athérosclérose (Griendling et al. 2000 [7]; Valko et al. 2000 [8]; Serteyn et al. 2003 [3]; Klebanoff 2005 [11] ; Federico et al. 2007 [10]). Ainsi, la modulation de la production des ROS est nécessaire dans la prévention et le traitement de ces pathologies. Elle est considérée à ce jour comme une cible thérapeutique (Malle et al. 2007 [12]; Murakami et al. 2007 [14]; Kim et al. 2011 [13]).

Dans cette perspective thérapeutique, les polyphénols des plantes ont de plus en plus d’intérêt. De nombreuses études montrent qu’ils ont des effets AOX, anti-radicalaires et anti-inflammatoires, tout comme la capacité de moduler la production des ROS, la transduction du signal cellulaire et l’expression des gènes (Rice-Evans et al. 1996 [16]; Weisburger 1999 [21]; Heim et al. 2002 [15]; Prior 2003 [19]; Seifried et al. 2007 [17]; Anand et al. 2008 [18]; Vauzour et al. 2010 [20]). C’est pourquoi nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce type de molécule.

Objectifs et méthodes

- Le **premier objectif** de l’étude biochimique I est d’explorer la capacité d’extraits aqueux de quatre des plantes alimentaires que nous avons sélectionnées, à agir sur l’**activité oxydante globale** des neutrophiles équins, fraîchement isolés *ex vivo* du sang des chevaux sains, et stimulés au PMA. Il s’agit de : *Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus acetosella*, *Manihot esculenta* et *Pteridium aquilinum*. La production de ROS en présence des extraits de ces plantes était mesurée par **chimioluminescence** en utilisant la **lucigénine** (Bis-*N*- methylacridinium) (Fig. 2).

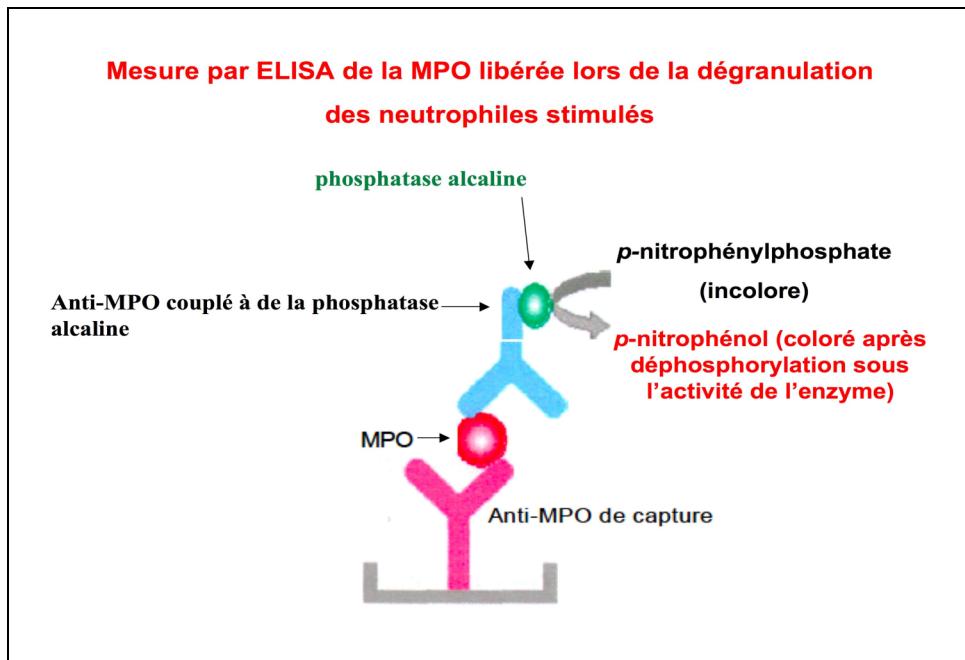
Fig. 2: Réaction de la lucigénine avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et mesure de l'activité oxydante globale par chimioluminescence (Yunbo et al. 1998 [43])



La cytotoxicité des extraits de 0.1 à 10 µg/ml, a été analysée par un test d'exclusion en utilisant du bleu de Trypan.

- Le **second objectif** est d'explorer l'effet de nos extraits sur la quantité de MPO libérée dans le milieu extracellulaire par dégranulation des neutrophiles équins activés au PMA. Cette mesure a été effectuée par ELISA en utilisant un kit spécifique pour la MPO équine (Franck et al. 2005 [37]) (Fig. 3).

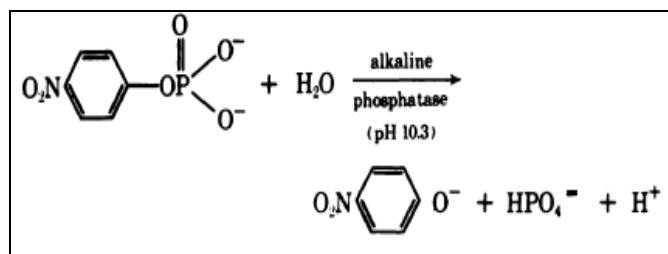
Fig. 3: Mesure de la quantité de MPO par ELISA



Modifié d'après Zeraik M L (2010) Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). Universidade de São Paulo.

La MPO qui est présente dans le milieu réactif est capturée par un anticorps spécifique immobilisé. Ensuite, l'addition d'un second anticorps anti- MPO couplé à de la phosphatase alcaline permet de calculer la quantité de MPO présente dans l'échantillon. En effet, le *para*-nitrophénylphosphate est un substrat incolore de la phosphatase. Lorsqu'il est ajouté au milieu réactif, la phosphatase le transforme en un dérivé phénolique de couleur jaune intense qui absorbe à 402.5 nm (Bowers et McComb 1975) (Fig. 4). Plus la MPO est présente dans l'échantillon, plus la coloration jaune est intense.

Fig. 4: Activité de la phosphatase alcaline sur *p*-nitrophénylphosphate

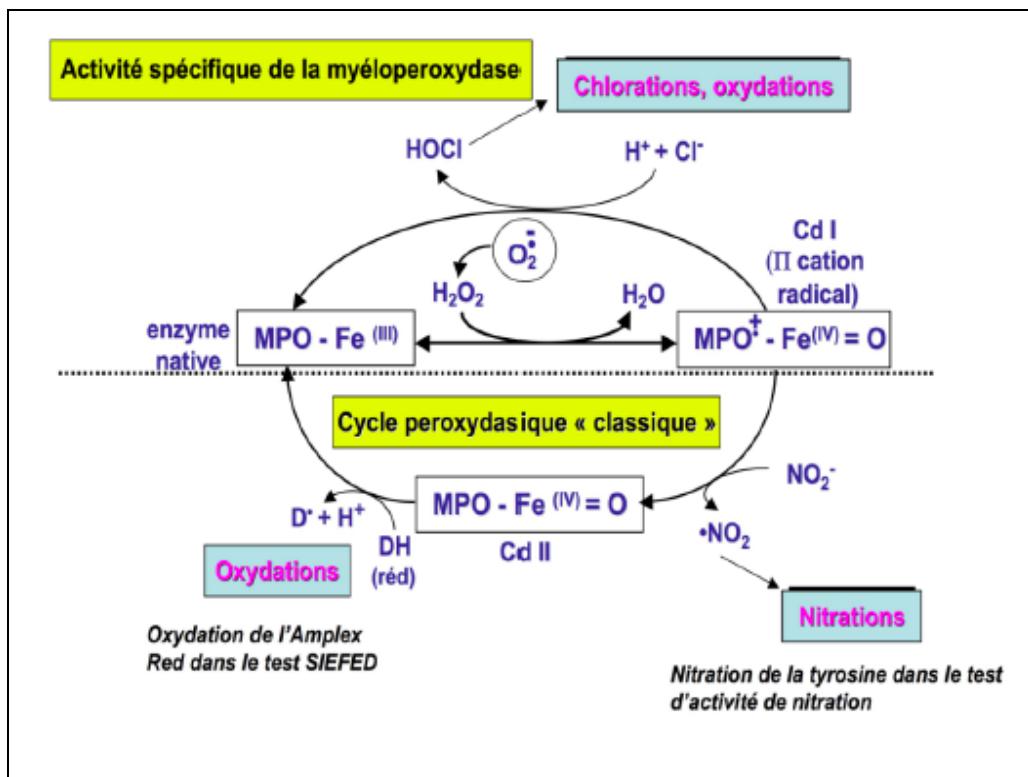


Bowers G N, McComb R B (1975) Measurement of Total Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum. *Clinical Chem.* 21 (13), 1988-95

- Le troisième objectif de cette étude est d'analyser dans deux modèles enzymatiques, l'effet des extraits sur l'activité oxydante classique de la myéloperoxydase.

Les activités de la myéloperoxydase forment un cycle (Fig. 5).

Fig. 5 : Le cycle d'activités de la MPO
(Serteyn 2003 [3])



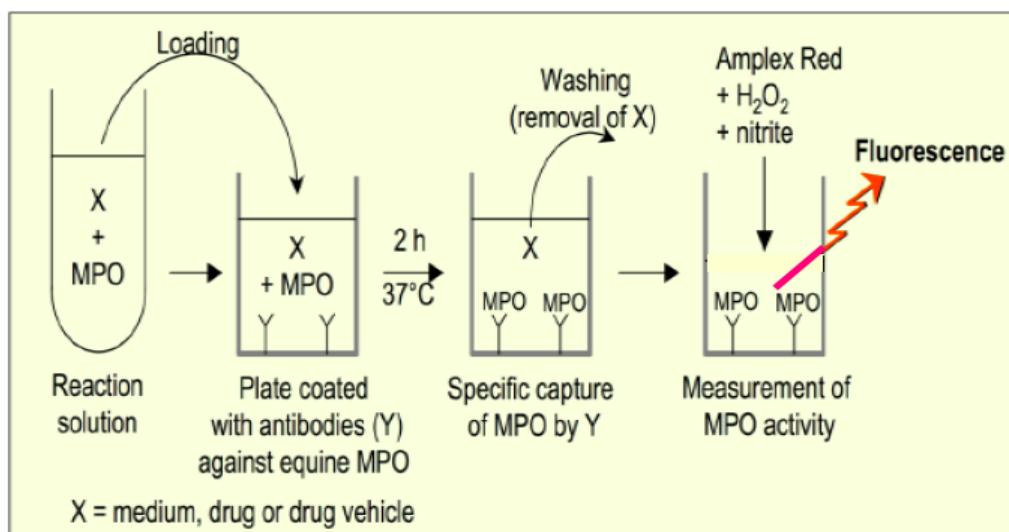
À la première étape de ce cycle, qui conduit à la production de HOCl, le fer hémique (Fe^{III}) est oxydé en Fe^{IV}. Ceci produit un π cation-radical (Composé I, Cd I) (Fig. 5, partie supérieure).

NO₂⁻ a une grande affinité pour Cd I. Il peut servir de donneur d'électron pour la réduction mono-électronique de Cd I en composé oxoferryle non radicalaire (Cd II), et être lui-même oxydé en un radical NO₂[•] responsable de la nitration des protéines à résidu tyrosyle. Cette activité a été étudiée par un test de **nitration** (Fig. 5, coin inférieur droit) (Burner et al. 2000 [5]; Kohnen et al. 2007 [6]).

La réduction mono-électronique de Cd II marque le retour de l'enzyme à l'état de fer hémique (Fe^{III}).

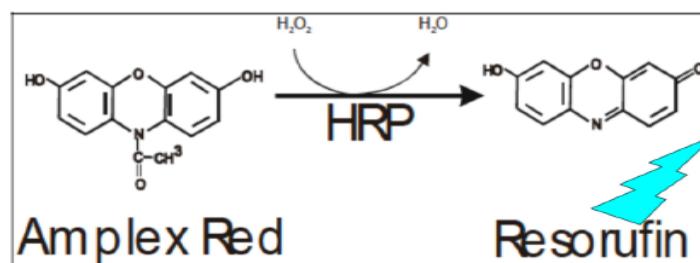
Cette activité a été analysée par la technique **SIEFED** (Fig. 5, coin inférieur gauche) en présence de peroxyde d'hydrogène. Le principe de cette nouvelle technique est décrit sur la figure 6.

Fig. 6: La technique SIEFED (Frank et al. 2006 [38])



Cette méthode permet de capturer et d'extraire la MPO à partir des milieux complexes (fluides biologiques, solutions tamponnées, ...) en l'immobilisant sur des anticorps spécifiques (Y sur le schéma Fig. 6). Après élimination du milieu complexe par lavage, l'activité de la MPO est révélée *in situ* par l'ajout du système de révélation contenant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et un substrat fluorogène, notamment la *N*-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine (Amplex Red[®], excitation 530 nm, émission 590 nm) (Fig. 7).

Fig. 7: Révélation de l'activité de peroxydase de la MPO par Amplex Red[®]
(www.bioteck.com)



Ainsi, par la capture immunologique de la MPO et l'élimination de tous les autres composants du milieu réactif à travers l'étape de lavage, la technique SIEFED présente l'avantage

d'étudier de manière spécifique l'activité de l'enzyme sans aucune interférence (Franck et al. 2006).

Les extraits aqueux ont été dissous dans de l'eau ultrapure. 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 pour $n \geq 9$; les IC₅₀ ont été calculées avec GraphPad Prism 5.0. Les résultats sont présentés comme moyenne \pm déviation standard (SD).

Résultats

De 0.1 à 10 µg/ml, le test de viabilité n'a montré aucune cytotoxicité ; la viabilité des cellules en présence des échantillons a été aussi élevée que pour le contrôle ($\geq 96\%$).

Fig. 1 et 2. de l'étude I présentent les résultats du modèle cellulaire. Dans le test de chimioluminescence, l'activité oxydante globale des neutrophiles activés au PMA a baissé d'une manière dépendante de la concentration des extraits (Étude I, Fig. 1). Les inhibitions dues aux échantillons d'*Hibiscus* et de *Pteridium* ont été extrêmement significatives vs. contrôle (***, $p < 0.001$) à toutes les concentrations, tout comme les inhibitions observées pour les échantillons de *Manihot* et d'*Abelmoschus* de 2.5 à 10 µg/ml et pour l'échantillon non chauffé d'*Abelmoschus* à 1 µg/ml. L'équivalent chauffé de ce dernier a développé une inhibition très significative (**, $p < 0.01$). Les effets d'*Abelmoschus* 0.1 µg/ml et de *Manihot* 0.1 et 1.0 µg/ml sont restés non significatifs vs. contrôle. Pour la même plante à la même concentration, la différence entre l'effet de l'échantillon chauffé et celui de l'échantillon non chauffé est resté non significatif sauf pour *Abelmoschus* 2.5 µg/ml (#, $p < 0.01$).

Les effets de nos extraits sur la libération de la MPO par les neutrophiles activés au PMA sont plus modérés (Étude I, Fig. 2). Les inhibitions ne sont significatives qu'à 10 µg/ml pour tous les échantillons, à 1 µg/ml pour l'*Abelmoschus* chauffé ou non, ainsi qu'à 1 µg/ml pour le *Manihot* chauffé. Aux autres concentrations, quelle que soit la plante, les effets n'ont pas été significatifs ; les taux d'inhibition ne sont pas aussi élevés que dans le test de chimioluminescence.

Les résultats sur les activités de nitration et de peroxydase de l'enzyme à l'état pur sont présentés aux Fig. 3 et 4 de l'étude I. L'activité de **nitration** présente des inhibitions

également dépendantes de la concentration de l'extrait. Le *Pteridium* a atteint des inhibitions extrêmement significatives à toutes les concentrations. À 1 µg/ml, l'*Hibiscus* chauffé a atteint une inhibition significative vs. contrôle; les autres échantillons y arrivent à partir de 2.5 µg/ml ; mais à cette concentration, *Abelmoschus* n'a d'effet significatif qu'avec l'échantillon non chauffé. Le traitement thermique n'a pas apporté de modification significative sur les effets observés.

L'activité des extraits dans le test **SIEFED** est également variée. Les inhibitions sont toutes extrêmement significatives pour le *Pteridium* et le *Manihot* de 2.5 à 10 µg/ml, pour l'*Abelmoschus* de 5 à 10 µg/ml. Les concentrations des autres échantillons < 2.5 µg/ml n'ont pas d'effet significatif. À toutes les concentrations, le taux d'inhibition décroît selon l'ordre suivant : *Pteridium* > *Manihot* > *Abelmoschus* ≈ *Hibiscus*.

4.2.2

Publication Étude biochimique I

pp 175 - 200

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 628–650; doi:10.3390/ijms13010628

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences

ISSN 1422-0067
www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Polyphenol Content and Modulatory Activities of Some Tropical Dietary Plant Extracts on the Oxidant Activities of Neutrophils and Myeloperoxidase

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

