

Avant - propos

Avant – propos

Les événements d'oxydation font partie de réactions d'oxydo-réduction (**réaction rédox**) qui transfèrent un électron ou plusieurs d'une substance vers une autre. La substance donatrice d'électrons est ainsi oxydée et est dite « réductrice », tandis que celle qui reçoit des électrons est réduite et est dite « oxydante ». Pour un même composé oxydable (AH), la forme oxydée (A') et la forme réduite (AH) constituent ensemble son couple rédox. Dans un milieu biologique, le rapport entre la quantité chimique de tous ces composés à l'état réduit et celle de leurs équivalents à l'état oxydé résulte de ce transfert permanent d'électrons et constitue une partie importante et déterminante de l'environnement rédox de ce milieu.

In vivo, les réactions rédox sont courantes, physiologiquement normales, et même nécessaires, car elles participent au maintien de l'homéostasie. C'est notamment par des réactions rédox que les granulocytes **neutrophiles** et les **monocytes**, deux types de leucocytes appartenant à la grande famille des cellules de défense, assument leur fonction dans l'immunité innée et la **réaction inflammatoire**. Ils phagocytent le matériel bactérien ou tout antigène qui envahit l'organisme et le séquestrent dans un phagosome. Leurs **enzymes oxydantes** respectives comme la **NADPH oxydase (Nox)**, la **myéloperoxydase (MPO)**, la **NOSynthase inductible (iNOS)**, etc constituent une véritable cascade, dans laquelle l'activation de la précédente entraîne celle de la suivante, à travers une série de phosphorylations, ou fournit à la suivante le substrat nécessaire à son activité. L'une après l'autre, ces enzymes catalysent alors des transferts d'électrons et ainsi, produisent des **espèces réactives de l'oxygène (ROS)**, de l'anglais *reactive oxygen species*) comme armes pour digérer et éliminer les agents infectieux et/ou autres envahisseurs phagocytés.

Ces ROS participent à d'autres fonctions physiologiques importantes, notamment l'activation des enzymes, la transduction du signal cellulaire, la régulation du tonus vasculaire, et l'expression des gènes. À faible concentration, elles maintiennent stable l'environnement rédox d'un sujet et sont de plus en plus considérées comme des "seconds messagers".

Cependant, lorsque leur activation est trop forte ou perdure longtemps, les enzymes oxydantes peuvent produire des ROS en quantités excessives, qui perturbent l'environnement rédox et l'homéostasie. On peut alors assister à une véritable **flambée respiratoire**, caractérisée par une montée rapide de la concentration des ROS et d'autres espèces radicalaires dérivées. Cette perturbation est généralement limitée au site de l'agression, mais peut s'élargir à une

région tout entière, ou même à tout le système, et donner lieu au **stress oxydant**, caractérisé par un déséquilibre élargi et généralisé de l'environnement rédox à l'avantage d'espèces radicalaires et réactives.

Dans ces conditions, les ROS et autres radicaux libres développent des effets délétères pour l'être vivant, parce qu'elles peuvent oxyder d'importantes molécules biologiques (protéines, enzymes, phospholipides de la biomembrane, etc), en altérer la structure et en affecter la fonctionnalité. Elles attaquent notamment les bases azotées de l'acide désoxyribo- nucléique (ADN), y forment des adduits oxydés et développent ainsi des effets mutagènes et cancérigènes. Il est de plus en plus évident que des taux fréquemment élevés des ROS favorisent la genèse de diverses pathologies de caractère inflammatoire comme les maladies cardio-vasculaires, le vieillissement cellulaire, la maladie d'Alzheimer et l'hypertension.

Dès lors, moduler la production enzymatique des ROS de manière à la maintenir le plus près possible du niveau physiologique requis par l'homéostasie et à en éviter tout excès, est une approche tout à fait adéquate dans la prévention et la lutte contre les maladies liées à l'inflammation. C'est pourquoi la Nox, la MPO, la NOS et d'autres enzymes oxydantes sont de plus en plus prises comme cible thérapeutique.

En plus, certains anti-inflammatoires non- stéroïdiens utilisés dans le traitement des maladies liées à l'inflammation peuvent développer des effets secondaires peu agréables.

Il y a donc un grand intérêt à élargir la recherche vers des produits naturels (tels que ceux d'origine végétale), capables de développer des activités AOX, anti- radicalaires et anti-inflammatoires, de moduler la production enzymatique des ROS, sans toutefois développer des effets secondaires délétères pour le sujet humain.

C'est pour faire face à ces défis de santé les **antioxydants (AOX) biologiques** sont importants. Ce sont des composés qui protègent les molécules biologiques contre la dégradation que provoquerait leur oxydation, et peuvent prévenir, à long terme, les pathologies qui sont associées à une production chronique et excessive des ROS.

L'organisme humain dispose d'**AOX endogènes** (la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion, etc) comme moyens naturels pour éliminer les ROS excessives. Les **AOX exogènes**, notamment les **polyphénols**, apportés par voie alimentaire (ou médicamenteuse) en très petites quantités, peuvent servir d'appoint aux activités biologiques des AOX endogènes.

Dans cette perspective, les polyphénols des plantes attirent beaucoup d'intérêt. De nombreuses études s'y sont consacrées et ont montré que ces composés peuvent retarder ou inhiber l'apparition des maladies inflammatoires.

Ces inhibitions sont attribuées aux propriétés AOX et anti-radicalaires des polyphénols, et à leur interaction avec les voies d'activation des enzymes, l'expression des gènes, la transduction du signal cellulaire, etc. Des études complémentaires sont encore nécessaires pour expliquer davantage les mécanismes de réactions qui sont à la base des activités biologiques reconnues aux AOX. Toutefois, on ne peut pas mettre en doute ces activités.

Le régime alimentaire constitue la principale source d'apport en AOX. Cependant, peu de données sont disponibles sur les AOX éventuellement contenus dans le régime alimentaire des populations de la province du Bas-Congo, en République démocratique du Congo (RDC), et sur leurs activités AOX.

Le présent travail voudrait apporter une contribution à l'exploration de ces composés et de leur activité AOX *in vitro*. Nous avons sélectionné onze plantes dont les feuilles sont couramment consommées au Bas-Congo comme légumes verts et comme tisane, en fonction de la place qu'elles occupent dans le régime alimentaire des habitants de cette province. Elles constituent le matériel végétal de départ pour notre étude. Certaines, comme *Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus acetosella* et *Manihot esculenta* trouvent également usage dans la médecine traditionnelle comme anti-inflammatoires pour soulager la fièvre, le mal de tête, combattre le rhumatisme, les hémorroïdes, la conjonctivite etc.

- Avant les études expérimentales, nous présentons une **revue de la littérature** d'abord au sujet des **ROS**, notamment leur production, leurs activités biologiques et leurs effets délétères à la santé en cas de production chroniquement excessive (1.1), ensuite sur les **AOX** d'origine végétale, principalement les flavonoïdes, les acides phénols et leurs dérivés (1.2).
- Ces généralités sont suivies de la présentation des plantes que nous avons sélectionnées (2).
- ❖ **L'étude des polyphénols** contenus dans les onze plantes sélectionnées (3) vise en particulier les **flavonoïdes**, les **acides phénols** et leurs **dérivés**.

En fonction des résultats de l'étude des polyphénols et d'un screening biochimique préliminaire pour sélectionner les plantes les plus actives, quatre (*Abelmoschus esculentus*,

Hibiscus acetosella, *Manihot esculenta* et *Pteridium aquilinum*) ont été retenues et soumises à des études biochimiques *in vitro* plus poussées (4). Les résultats du screening sur les sept autres plantes sont présentés avant la description des études biochimiques.

Par leur équipement enzymatique, les neutrophiles sont des très grands producteurs des ROS. Leur myéloperoxydase est souvent un agent "amplificateur" de cette production.

❖ La **première étude biochimique** explore :

- les effets *in vitro* de nos extraits sur l'activité oxydante globale des neutrophiles équins isolés *ex vivo* et activés au phorbol 12-myristate 13-acétate (**PMA**) (test de **chimioluminescence** en utilisant la lucigénine, mesure par spectroscopie),
- la quantité de myéloperoxydase que les neutrophiles activés libèrent dans le milieu extracellulaire lors de leur dégranulation (test **MPO-ELISA**; mesure par spectroscopie de l'activité catalytique d'une enzyme couplée à un anticorps anti-MPO).

Une fois libérée par les neutrophiles, cette enzyme peut produire des ROS même en milieu extracellulaire. Ainsi, notre première étude biochimique explore également les effets des extraits de nos plantes sur l'activité catalytique de l'enzyme pure, en ciblant deux de ses activités oxydantes qui sont communes à toutes les peroxydases:

- l'oxydation d'un réducteur DH en D' lors de la première réduction mono-électronique de la MPO au cours de son cycle d'activités. Lorsque $\text{NO}_2^{\bullet-}$ est le substrat réducteur, son produit d'oxydation $\text{NO}_2^{\bullet}$ peut se fixer sur des résidus tyrosyles des protéines. C'est l'**activité de nitration**, qui modifie ces résidus et leur confère une coloration spécifique (mesure par spectroscopie),
- l'activité de peroxydase en utilisant Amplex Red[®] (N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) comme donneur d'électrons pour la deuxième réduction mono-électronique de l'enzyme lors de son cycle d'activité. Le produit d'oxydation du donneur d'électron est d'une fluorescence particulière (technique **SIEFED**, mesure par spectroscopie).

- ❖ La **deuxième étude biochimique** explore *in vitro* les activités anti-oxydantes et anti-radicalaires des extraits aqueux des quatre plantes sur un modèle de **peroxydation lipidique** et des **monocytes HL 60** activés au **PMA**.

Les membranes biologiques étant constituées de phospholipides que les ROS peuvent attaquer assez facilement, nous voulions voir si ces extraits pouvaient efficacement protéger des molécules lipidiques contre l'oxydation dans trois modèles différents en utilisant l'acide linoléique (C18 : 2 ω 6) comme substrat.

Ces modèles nous ont permis de mesurer l'activité de nos extraits sur trois marqueurs courants de peroxydation lipidique :

- la formation d'éthylène lors d'une peroxydation lipidique avancée : mesure par **chromatographie en phase gazeuse** ;
- la formation d'hydroperoxydes lors de la propagation de la chaîne d'oxydation : mesure par spectroscopie en utilisant de la *N-N*-diméthyl-phénylène diamine (**DMPD**) ;
- la formation d'espèces radicalaires de transition lors de l'initiation de la chaîne d'oxydation : mesure par résonnance paramagnétique électronique (**RPE**) , en utilisant le **POBN** [α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N-tert*-butylnitrone] comme agent "spin trap".
- Les monocytes participent à la production des ROS. Nous avons également voulu analyser l'effet de nos extraits sur cette production dans un modèle qui utilise des **monocytes humains** en lignée continue (**HL 60**) activés au **PMA**, et où la présence de peroxydase de raifort renforce la production des ROS. La mesure se fait par spectroscopie en utilisant la **dichlorofluoréscine -diacétate** (DCFH-DA), une sonde fluorogène.

Une discussion générale, incluant des conclusions et perspectives, clôturera ce travail.