



FACULTE DES SCIENCES

Académie Universitaire Wallonie-Europe

Département des Sciences de la Vie

Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biotechnologie Végétales

**Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en
antioxydants utilisable comme complément alimentaire
et
Etude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de
l'endothélium**

**Thèse présentée par TABART Jessica en vue de l'obtention du grade de Docteur en
Sciences (Biochimie, Biochimie moléculaire et cellulaire, Bioinformatique et
modélisation)**

--- Année académique 2010-2011 ---

Promoteur

Professeur Jacques DOMMES

Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biotechnologie Végétales,

Co-promoteur

Docteur Claire KEVERS, Université de Liège

Jury

Professeur Fabrice FRANCK, Université de Liège (Président)

Professeur Josiane CILLARD, Université de Rennes, France

Professeur Didier SERTEYN, Université de Liège

Docteur Danièle EVERS, Centre de Recherche Gabriel Lippmann, Luxembourg

Docteur Joël PINCEMAIL, Université de Liège

La réalisation de cette thèse a été soutenue financièrement par le Ministère de la Culture, de l'Enseignement et de la Recherche du Grand-Duché du Luxembourg ainsi que par le Fonds National de la Recherche-Luxembourg.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, le Professeur Jacques DOMMES, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions, ainsi que le Docteur Claire KEVERS pour ces précieux conseils durant ces quatre années mais également lors de la rédaction de cette thèse.

Merci à tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont contribué par leurs conseils ou leur aide à la réalisation de ce travail, et tout particulièrement le Docteur Danièle EVERS.

Tous les membres du CREDEC : Le Professeur Jean-Olivier DEFRAIGNE pour m'avoir ouvert les portes de son Unité. Le Docteur Joël PINCEMAIL pour son intérêt à mon travail et ses conseils. Jean-Paul CHERAMY-BIEN, pour sa disponibilité, et surtout pour toute l'aide qu'il m'a apportée au niveau des expérimentations animales. Merci.

Merci à Annie OOMS pour toute son aide au niveau des cultures cellulaires mais également son amitié, son soutien et son écoute, ainsi qu'à Céline CHERDON.

Je remercie tous les membres du Centre de l'Oxygène (CORD, Liège) pour leur accueil chaleureux et tout particulièrement à Thierry FRANCK et au PROFESSEUR SERTIEN.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire de Biologie et Biotechnologie Végétales et de l'asbl CEDEVIT pour leur disponibilité, leurs compétences techniques et leur bonne humeur qui m'ont énormément aidée.

Merci à Monsieur Philippe ANDRIANNE de la société HerbalGem pour m'avoir fournis le matériel végétal nécessaire.

Remerciements

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes qui à l'aide de petits conseils et de petits coups de mains ont contribué à l'avancement de ce travail par leur stages respectifs: Charlotte BORGNET, Alexandre QUOINEAUD, David EMOND, Jérôme BLERET, Rémi DURE, Khadija MOULAY BOUDKHILI, Fadoua HIZOUNI et Samira BARHDADI.

Je tiens également à remercier l'amour de ma vie, mes enfants et mes parents qui m'ont soutenue moralement pendant ces quatre années que j'ai passées au laboratoire. Sans vous tous, je n'en serais pas là.

Enfin, une pensée pour tous les animaux utilisés au cours de cette thèse : sans eux, ce travail n'aurait pas été aboutit!

Merci à tous et toutes!

Résumé

Parmi les fruits les plus riches en antioxydants figure le cassis (*Ribes nigrum*) appartenant à la famille des Saxifragacées. Cet arbrisseau est très connu pour ses fruits, fortement aromatiques. Il est largement utilisé dans la production industrielle de sirops et de concentrés, contient des quantités très élevées en composés phénoliques, particulièrement des anthocyanes. Les bourgeons et les feuilles de cassis sont également utilisés en tant que complément alimentaire conseillé comme adaptogène tonique, diurétique ainsi que dans le traitement d'affections rhumatismales. Un objectif de ce travail était d'évaluer le cassis en tant que source d'antioxydants en comparant différents organes (fruits, feuilles et bourgeons) prélevés sur différentes variétés à différentes saisons. Un autre but était de développer une procédure d'extraction permettant l'obtention de hauts rendements en composés antioxydants et garantissant la stabilité de ceux-ci. Enfin, outre la caractérisation de l'extrait, un objectif était aussi de démontrer certaines de ses activités biologiques.

Dans un premier temps, le matériel végétal ainsi que la méthode d'extraction ont été optimisés. Les extraits les plus riches en antioxydants stables ont été obtenus à partir de feuilles de cassis lyophilisées, par extraction dans le mélange acétone-eau-acide acétique (70 :28 :2) .

Dans un second temps, nous avons caractérisé ces extraits au niveau de diverses classes de molécules antioxydantes. Les feuilles et les bourgeons présentent un contenu plus élevé en flavonols, en flavanols et en composés phénoliques totaux, par rapport aux baies. Par contre, les fruits présentent des teneurs plus élevées en acide ascorbique et en anthocyanes.

Dans un troisième temps, nous avons analysé certaines propriétés-santé (la capacité antioxydante, la capacité anti-inflammatoire et les propriétés vasorelaxantes) des extraits de cassis en utilisant tant des méthodes *in vitro* que des modèles sur culture de cellules et sur organe isolé. Notre étude a mis en évidence, tant au niveau intracellulaire qu'extracellulaire, des propriétés de piègeurs de radicaux libres, une activité inhibitrice de la myéloperoxydase chez les neutrophiles, ainsi qu'une stimulation de la relaxation des vaisseaux sanguins (production de NO, modulation de l'expression de l'ARNm eNOS dans les cellules endothéliales et mise en évidence de l'effet relaxant sur organe isolé), et ce, sans présenter d'effets toxiques.

En conclusion, l'extrait de feuilles de cassis obtenu par une extraction au mélange acétone-eau-acide acétique possède de nombreuses qualités tant au niveau nutritionnel qu'au niveau de la protection santé. Cet extrait, riche en composés phénoliques et possédant une haute activité antioxydante, peut également interagir sur l'activité de certaines enzymes impliquées dans les processus d'inflammation et de motricité vasculaire.

Summary

Blackcurrant (*Ribes nigrum*, family Saxifragaceae) produces fruits with a high antioxidant content. This shrub is much known for its strongly aromatic fruits. It is largely used in the industrial production of syrups and of concentrates, it contains very high quantities of phenolic compounds, particularly anthocyanins. Blackcurrant buds and leaves are also used as a food complement for their tonic and diuretic properties, as well as for the treatment of rheumatic affections. With this plant, we tried to develop, on a laboratory scale, a flavonoid-rich extract, stable in time and to show several biological activities.

Initially, different plant materials were compared (fruits, leaves, buds, from different cultivars harvested at different times) and the method of extraction were optimized. Lyophilised-leaf extracts obtained with the acetone-water-acetic acid mixture (70: 28: 2) show an excellent yield in antioxidant compounds. These freeze-dried extracts have also the advantage of being stable for several months.

We characterized these extracts for their content in various classes of antioxidant molecules. The leaves and the buds yielded extracts containing mainly flavonols, flavanols and total phenolic compounds, as compared to berries. On the other hand, these fruits showed higher contents of ascorbic acid and anthocyanins.

In a third part, we analyzed certain health-properties (antioxidant capacity, anti-inflammatory capacity and the properties in vasorelaxation process) of the blackcurrant extracts by using *in vitro* methods as well as cellular and isolated organ models. Our study highlighted the intracellular and the extracellular properties of the blackcurrant extract as radical scavenger. We also showed an inhibition of the myeloperoxidase activity in the activated neutrophils, and an activation of the vasorelaxation process of the blood-vessels (production of NO, modulation of the expression of ARNm eNOS in the endothelial cells and relaxing effect in isolated organ), and this, without presenting any toxic effects.

In conclusion, the black currant leaf extract obtained through extraction in acetone-water- acetic acid mixture has many interesting properties for health-protection. This extract, rich in phenolic compounds and having a high antioxidant activity, can also modulate the activity of several enzymes involved in inflammation or in vascular motricity.

Table des matières

PRÉAMBULE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE 1 : LE STRESS OXYDANT ET LES FLAVONOÏDES (CLASSIFICATION, SYNTHÈSE, MÉTABOLISME ET BIODISPONIBILITÉ) :	5
1. Stress oxydant et défenses antioxydantes	5
2. Les Flavonoïdes : classification et biosynthèse	8
3. Métabolisation et biodisponibilité	13
3.1. L'absorption intestinale	13
3.2. La conjugaison	15
3.3. Le transport et concentration plasmatique	16
3.4. L'excrétion	18
CHAPITRE 2 : LES FLAVONOÏDES : ASPECT NUTRITIONNEL ET SANTÉ	19
1. Introduction	19
2. Historique des études « santé » réalisées sur les flavonoïdes	24
3. Etudes épidémiologiques et impact des flavonoïdes sur certaines pathologies	26
3.1. Les maladies vasculaires :	26
3.1.1. Maladies cardiovasculaires :	26
3.1.2. Maladies cérébrovasculaires :	27
3.2. Les maladies neurodégénératives :	28
3.3. Les cancers:	29
3.4. Autres activités des flavonoïdes :	34
3.4.1. Activité anti-inflammatoire (Harborne and Williams, 2000):	34
3.4.2. Autres activités :	36
▪ Activité anti-ulcérogène :	36
▪ Activités antimicrobienne et antivirale :	37
▪ Activité de prévention de la cataracte diabétique :	37
▪ Activité anti-ostéoporose :	37
▪ Activité antiallergique :	37
4. Excès de flavonoïdes	37
CHAPITRE 3 : LE DYSFONCTIONNEMENT ENDOTHÉLIAL ET LE RÔLE PROTECTEUR DES FLAVONOÏDES DANS LES MALADIES VASCULAIRES	39
1. L'endothélium, le NO, l'eNOS et leurs propriétés vasorelaxantes	39
1.1. Le vaisseau sanguin, l'endothélium, les cellules endothéliales et musculaires lisses	39
1.2. Le NO	42
1.3. Les NO synthases	45
1.4. Propriétés de vasorelaxation du NO	48
2. Le stress oxydant et son rôle dans le dysfonctionnement endothélial	51
3. L'effet protecteur des flavonoïdes sur les pathologies vasculaires	57
OBJECTIFS	63

RESULTATS	65
<hr/>	
PARTIE 1 : OPTIMISATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL ET DE L'EXTRACTION	65
<hr/>	
1. Introduction	65
2. Articles	68
▪ Antioxidant Capacity of Black Currant Varies with Organ, Season, and Cultivar.	68
▪ Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage.	74
3. Conclusion	82
PARTIE 2: CARACTERISATION DES EXTRAITS DE CASSIS	83
<hr/>	
1. Introduction	83
2. Articles	86
▪ Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests.	86
▪ Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages.	94
▪ Ascorbic acid, Phenolic acid, Flavonoid and Carotenoid profiles of selected extracts from <i>Ribes nigrum</i> .	102
▪ Antioxidant and anti-inflammatory activities of <i>Ribes nigrum</i> extracts.	122
3. Conclusion	141
PARTIE 3: BIODISPONIBILITE ET PROCESSUS DE VASORELAXATION	143
<hr/>	
1. Introduction	143
2. Article :	144
▪ Bioavailability and vasorelaxant effects of <i>Ribes nigrum</i> leaf extract on human endothelial cells and rat aorta.	144
3. Conclusion	164
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	165
<hr/>	
1. L'optimisation du matériel végétal et l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes	165
2. La caractérisation des extraits et l'évaluation de propriétés-santé	166
3. Effet des extraits de cassis sur la motricité vasculaire	170
4. Toxicité et biodisponibilité des composés phénoliques de l'extrait de feuilles de cassis	171
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175
<hr/>	

Préambule :

La problématique de l'alimentation à l'heure actuelle

En un siècle, les énormes progrès réalisés par la médecine ainsi que les améliorations de l'hygiène de vie et du confort matériel ont permis d'augmenter très significativement notre espérance de vie. A la fin du XXI^{ème} siècle, les experts estiment que 10% des personnes nées en 2000 ont de grandes chances de devenir des centenaires. Si Monsieur Tout le Monde ne peut que se réjouir de ces constats, encore faudrait-il s'assurer que cette dernière phase de la vie qu'est le vieillissement se passera dans les meilleures conditions possibles. En d'autres termes, l'Homme devra relever un énorme défi qui consistera à vivre de plus en plus vieux tout en retardant le plus longtemps possible l'apparition de divers désagréments ou maladies inexorablement associés au phénomène naturel du vieillissement. Il est facile de deviner quelles pourraient être les conséquences économiques désastreuses pour nos sociétés si nous ne pouvions faire face à cet enjeu. Une des hypothèses proposées concernant le vieillissement, et fortement admise aux niveaux scientifique et médical, met au premier plan l'accumulation des agressions oxydantes provoquées par les radicaux libres provenant principalement du métabolisme de l'oxygène et de l'azote. Ces molécules induisent des dommages oxydants moléculaires aux niveaux de cibles comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Ce vieillissement s'accompagne, dès lors, d'une altération des fonctions physiologiques ainsi que d'une susceptibilité plus élevée face à différentes maladies (Barouki, 2006). Pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) nocives, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants propres mais aussi d'autres qui sont fournis par l'alimentation. Ces molécules sont aptes à ralentir, retarder ou prévenir les processus d'oxydation. Les systèmes propres à l'organisme sont basés notamment sur des systèmes enzymatiques dont la glutathion peroxydase (GPxs), la catalase et la superoxyde dismutase (SOD). Notre organisme a aussi besoin d'un apport externe d'antioxydants provenant d'une alimentation saine et équilibrée, riche en antioxydants. Parmi ces molécules antioxydantes exogènes, on trouve les vitamines C, E et A ainsi que des polyphénols (en particulier les flavonoïdes), le glutathion, les caroténoïdes, Le phénomène du vieillissement serait lié à une augmentation du stress oxydant, c'est-à-dire à la perte progressive des capacités de l'organisme à maintenir l'équilibre entre la formation des radicaux libres et leur régulation par les antioxydants. Lorsque cet équilibre est rompu (« vieillissement pathologique »), les modifications « oxydatives » observées au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides

(Halliwell and Aruoma, 1993) induisent des mécanismes impliqués dans la perte des fonctions physiologiques naturelles (ouïe, vue, mémoire) mais aussi dans le développement de pathologies beaucoup plus lourdes (Halliwell, 2000, Gorman *et al.*, 1996, Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). En conclusion, les experts scientifiques deviennent de plus en plus unanimes pour dire qu'à côté d'un mode de vie sain (sport, peu de stress, ...), un apport régulier en antioxydants via l'alimentation ou la complémentation (sous contrôle médical) est un des premiers actes que nous devons porter en matière de prévention de notre santé.

A l'heure actuelle, plus personne ne conteste l'impact positif de la consommation de fruits et légumes sur la santé. Leurs multiples atouts sont liés à leur faible teneur calorique, à leur richesse en fibres, minéraux, vitamines et autres micronutriments. Certains de ces micronutriments apparaissent de plus en plus clairement comme essentiels au fonctionnement de l'organisme en participant à la protection de celui-ci contre certaines pathologies. C'est le cas des antioxydants et plus particulièrement les flavonoïdes dont les fruits et légumes constituent l'une des principales sources alimentaires (Figure 1).

Subclass	Compounds	Primary food sources
Flavonols	Quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin	Onions, apples, teas, berries, olives, bananas, lettuce, plums, red wine
Flavones	Luteolin, apigenin	Apples, celery, celeriac, lemons, parsley, oregano, lettuce, beets
Isoflavones	Genistein, diadzein	Soybeans, legumes
Flavanones	Hesperetin, naringenin, eriodictyol	Oranges, grapefruits, lemons
Anthocyanidins	Cyandin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin	Blueberries, raspberries, strawberries, cranberries
Flavan-3-ols	Catechin, galocatechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechingallate, epigallocatechingallate, theaflavin, theaflavingallate, theaflavindigallate, thearubigins	Green tea, black tea, plums, apples, cranberries
Procyanidins	Polymeric catechins and epicatechins	Cocoa, chocolate, cinnamon, cranberries, pinto beans, kidney beans, hazelnuts, pecans

Figure 1: Les flavonoïdes dans l'alimentation : sous-classes, composés et sources alimentaires (Kris-Etherton *et al.*, 2004).

Toutefois, une des difficultés majeures pour élucider les effets bénéfiques des polyphénols, dont les flavonoïdes, est le nombre très élevé de composés trouvés dans les fruits, légumes et boissons et leur nombre de métabolites. De plus, leur disponibilité biologique diffère d'un consommateur à l'autre et la réponse d'un individu à l'autre peut être différente selon les conditions physiologiques. Pour toutes ces nombreuses raisons, il est difficile d'estimer la consommation journalière des polyphénols (Singh *et al.*, 2008) nécessaire à une alimentation optimale. Les données récentes supportent un apport de 1 g de polyphénols par jour.

Parmi les fruits les plus riches en antioxydants figure le cassis (ou *Ribes nigrum* ou groseillier noir). Ce dernier appartient à la famille des Saxifragacées, est originaire d'Europe, et est très connu pour ses fruits, baies noires, fortement aromatiques. Il est cultivé sous les climats tempérés et est répandu à l'état sauvage dans toute l'Europe, jusqu'en Sibérie et en Asie. C'est sous forme de remède que le cassis a, pour la première fois, suscité l'intérêt des hommes. Au 12^{ème} siècle, Hildegarde de Bingen le recommandait pour ses feuilles dans la guérison de la Goutte. Le cassis a ensuite été utilisé en médecine vétérinaire pour soigner les chiens de chasse mordus par les vipères. Il a aussi été longtemps utilisé pour soigner les maux de gorge et les angines. Au 18^{ème} siècle, les anglais utilisaient l'infusion des jeunes racines comme anti-inflammatoire dans le traitement de la fièvre et de l'acné. Chez certaines tribus d'Indiens d'Amérique du Sud, l'infusion des racines était utilisée pour soigner les désordres utérins, les reins et comme vermifuge. En 2001, le premier musée consacré à l'étude du cassis sous toutes les formes a ouvert ses portes à Nuits-Saint-Georges (Dijon, France), « Le Cassissium ».

Ces fruits sont très riches en vitamine C (155-215 mg/ 100g de fruits) et contiennent un nombre important de complexes phénoliques comme des flavonoïdes (Häkkinen *et al.*, 1999 ; Landbo and Meyer, 2001 ; Mikkonen *et al.*, 2001, Moyer *et al.*, 2002; Cacace and Mazza, 2002). De plus, c'est une plante présentant de nombreux avantages : elle est déjà largement utilisée pour la production d'arômes (à partir des fruits et des bourgeons) et c'est une espèce relativement robuste pouvant facilement être cultivée sous nos latitudes. Mais si ces fruits possèdent en quantité notable les principes actifs appréciés des rhumatisants, les bourgeons et les feuilles sont eux aussi riches en principes actifs à caractère antioxydant. Parmi ceux-ci, les flavonoïdes ont été largement étudiés pour leur effet bénéfique sur la santé comme antioxydants (Rice-Evans *et al.*, 1996), comme agent anticarcinogène (Strube *et al.*, 1993) et comme agent anti-inflammatoire (Garbacki *et al.*, 2005).

Préambule

Le premier producteur mondial de cassis est la Russie suivie par la Pologne (150 000 tonnes/an), la Grande Bretagne (15 000 tonnes/an) et la France (10 000 tonnes/an). En Wallonie, le cassis est cultivé parmi les cultures de petits fruits (framboises, groseilles rouges, cassis et mûres) sur 30 hectares.

Chapitre 1 : Le stress oxydant et les flavonoïdes (classification, synthèse, métabolisme et biodisponibilité)

1. *Stress oxydant et défenses antioxydantes*

Nos cellules ne fonctionnent de manière optimale que dans des conditions bien précises de température, de pH et de concentration en oxygène et autres substrats. L'oxygène est indispensable pour produire toute l'énergie nécessaire dont la cellule a besoin pour mener à bien ses diverses fonctions. Le prix à payer pour cette énergie est toutefois important puisque ce même oxygène conduit en même temps à la formation de dérivés toxiques de l'oxygène : les espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'appellation ERO n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$). Si leur production se fait en grande quantité sur une période prolongée, les ERO peuvent causer des dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (Halliwell and Aruoma, 1993) (Figure 2):

- Les lipides sont une des cibles privilégiées des radicaux hydroxyles. Les radicaux arrachent des hydrogènes au niveau des carbones entre deux doubles liaisons formant ainsi un nouveau radical peroxyde (Cillard and Cillard, 2006). Cette réaction, appelée peroxydation lipidique, forme une réaction en chaîne. Ces radicaux peroxydes vont ensuite soit être réduits et neutralisés, soit continuer à s'oxyder jusqu'à la transformation en alcanes et aldéhydes avant d'être éliminés par voie respiratoire. Cette attaque concerne tous les phospholipides membranaires et les lipoprotéines circulantes. L'attaque des lipides circulants conduit à la formation de LDL (lipoprotéines de basse densité) oxydées qui se déposent au niveau des vaisseaux et qui peuvent conduire à des pathologies cardiovasculaires. L'attaque des lipides membranaires, quant à elle, conduit à une modification de la fluidité de la membrane et à des altérations du fonctionnement des récepteurs, des transporteurs et donc de la transduction des signaux cellulaires.
- L'ADN est aussi très sensible à l'attaque des ERO. Cette attaque peut être directe et entraîner l'oxydation des bases. Elle peut aussi se faire au niveau de la liaison entre la base et le désoxyribose ou même se faire directement au niveau du sucre et ainsi

provoquer une coupure de la chaîne. Toutes ces attaques peuvent conduire à des perturbations des mécanismes de réplication de l'ADN. *In fine*, cela peut aboutir au développement de cellules cancéreuses ou à la mise en route de l'apoptose.

- Les protéines sont les macromolécules les plus sensibles aux attaques radicalaires, surtout celles possédant un groupement SH. Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent plus sensibles aux protéases.

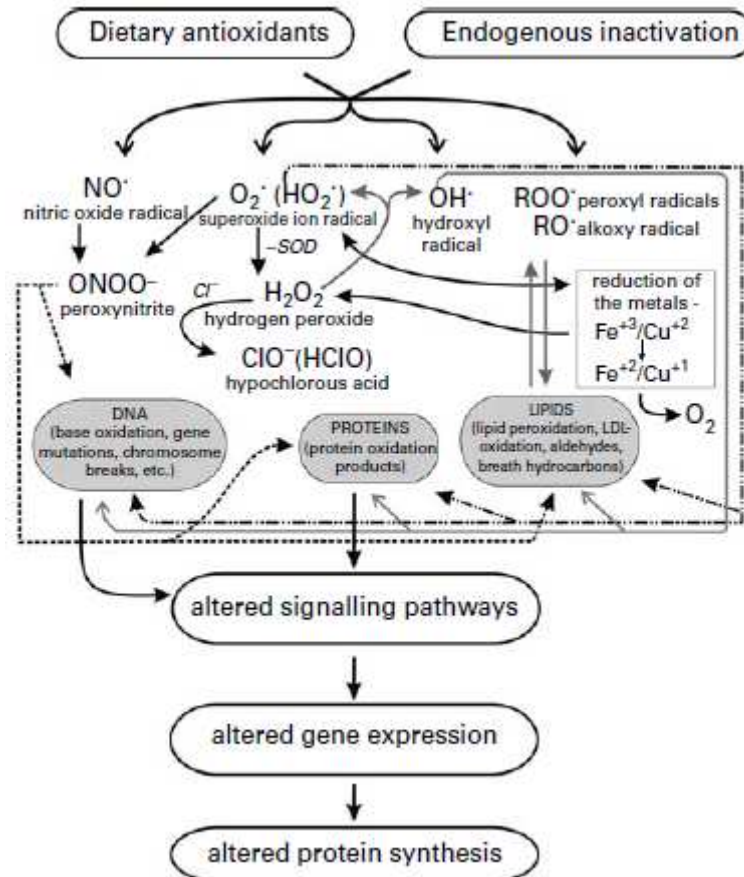


Figure 2 : Les différentes formes de ERO et leur interaction avec les molécules organiques (Knasmüller *et al.*, 2008).

Dans les systèmes biologiques, un équilibre dynamique existe entre la production des oxydants et leur neutralisation par les systèmes de protection. Cet équilibre est parfois dépassé lors d'une insuffisance dans les apports d'antioxydants d'origine végétale, une défaillance des systèmes enzymatiques de protection, une augmentation anormale des oxydants, notre mode de vie (le tabagisme, l'exposition au soleil, le sport intense, l'alimentation non équilibrée, ...). Et l'organisme se trouve alors dans un état de « stress oxydant » conduisant à de nombreuses pathologies (Gorman *et al.*, 1996, Halliwell, 2000, Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

Afin de contrer les effets néfastes des ERO, notre organisme possède des molécules à activité antioxydante de nature enzymatique ou non enzymatique. Ces molécules interviennent sur trois lignes de défense : la prévention constitutive, la détoxification active suite à un stress oxydant et la détoxification passive.

La prévention constitutive constitue la première ligne de défense et prévient la surproduction des ERO par inactivation de molécules endogènes telles que le fer divalent et le cuivre monovalent. Elle est constituée d'enzymes et de protéines chélatantes :

- La ferroxidase : Enzyme permettant la transformation de l'ion ferreux en ion ferrique. Cette activité permet de limiter la quantité d'ions métalliques pouvant s'oxyder et former des ERO dans les vaisseaux sanguins.
- La transferrine : Glycoprotéine plasmatique capable de piéger jusqu'à deux atomes de fer ferrique.
- L'hémossidérine : Pigment protéique du corps humain servant au stockage du fer sous forme d'hydroxyde ferrique.
- L'albumine : Protéine plasmatique captant les ions de cuivre.

La détoxification active suite à un stress oxydant constitue la deuxième ligne de défense au moyen principalement de trois enzymes ayant une activité complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire. Les molécules impliquées sont notamment les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, et les glutathion peroxydase et réductase. La détoxification passive ou dernière ligne de défense permet de réduire les ERO qui ont réussi à franchir les deux premières barrières. On y retrouve les molécules antioxydantes telles que le bêta-carotène, l'acide L-ascorbique, l'alpha-tocophérol.

2. Les Flavonoïdes : classification et biosynthèse

Les flavonoïdes font partie de la large famille des polyphénols, composés largement distribués dans le règne végétal. Les polyphénols sont communément subdivisés en phénols simples, acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), en coumarines, en naphthoquinones, en stilbénoides (deux cycles C₆ liés par 2C), en flavonoïdes, isoflavonoïdes et néoflavonoïdes et en formes polymérisées (lignanes, lignines, tanins condensés).

Les flavonoïdes sont des pigments hydrosolubles jouant de nombreux rôles dans les processus vitaux des plantes : défense contre les prédateurs, attraction des pollinisateurs, pigmentation des organes, croissance, protection contre les ultra-violets, ... (Cook and Samman, 1996; Harborne and Williams, 2000; Teutter, 2006). Plus de 5000 types de flavonoïdes ont été identifiés chez les plantes. Ces composés possèdent tous un squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux cycles benzéniques reliés entre eux par une chaîne aliphatique de trois carbones (noyau diphenylpropane : C₆-C₃-C₆) (Bravo, 1998) (Figure 3).

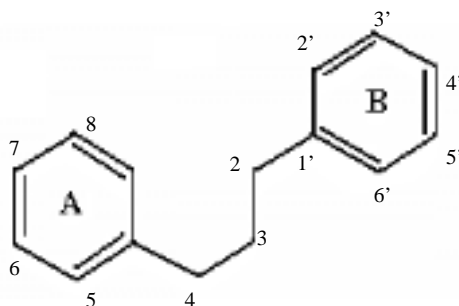


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : flavones, flavanols, flavonols, isoflavones, flavanones et anthocyanes. Les propriétés chimiques de ces composés varient suivant leur classe, mais également en fonction de leur degré d'hydroxylation, de leur degré de méthylation, de leur degré de glycosylation et du degré de polymérisation autour de la structure commune C₆-C₃-C₆ (Williamson and Santos-Buelga, 2003 ; Yao *et al.*, 2004 ; Geleijne and Hollman, 2008). Ces composés font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale étant donné que ceux-ci ne peuvent pas les synthétiser naturellement. Résultat du métabolisme secondaire des plantes, ces composés sont fréquemment attachés à des sucres (glycosides), ce qui leur confère un caractère plus hydrosoluble. Occasionnellement, on peut les retrouver sous forme d'aglycones. Leur formation dans les plantes est influencée par de

nombreux facteurs : luminosité, génétique, environnement, mûrissement, agressions extérieures, ... (Ross and Kasum, 2002). Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone. Cette chalcone est ensuite métabolisée en différentes classes de flavonoïdes par l'action successive d'enzymes (Figure 4) (Bruneton, 1999).

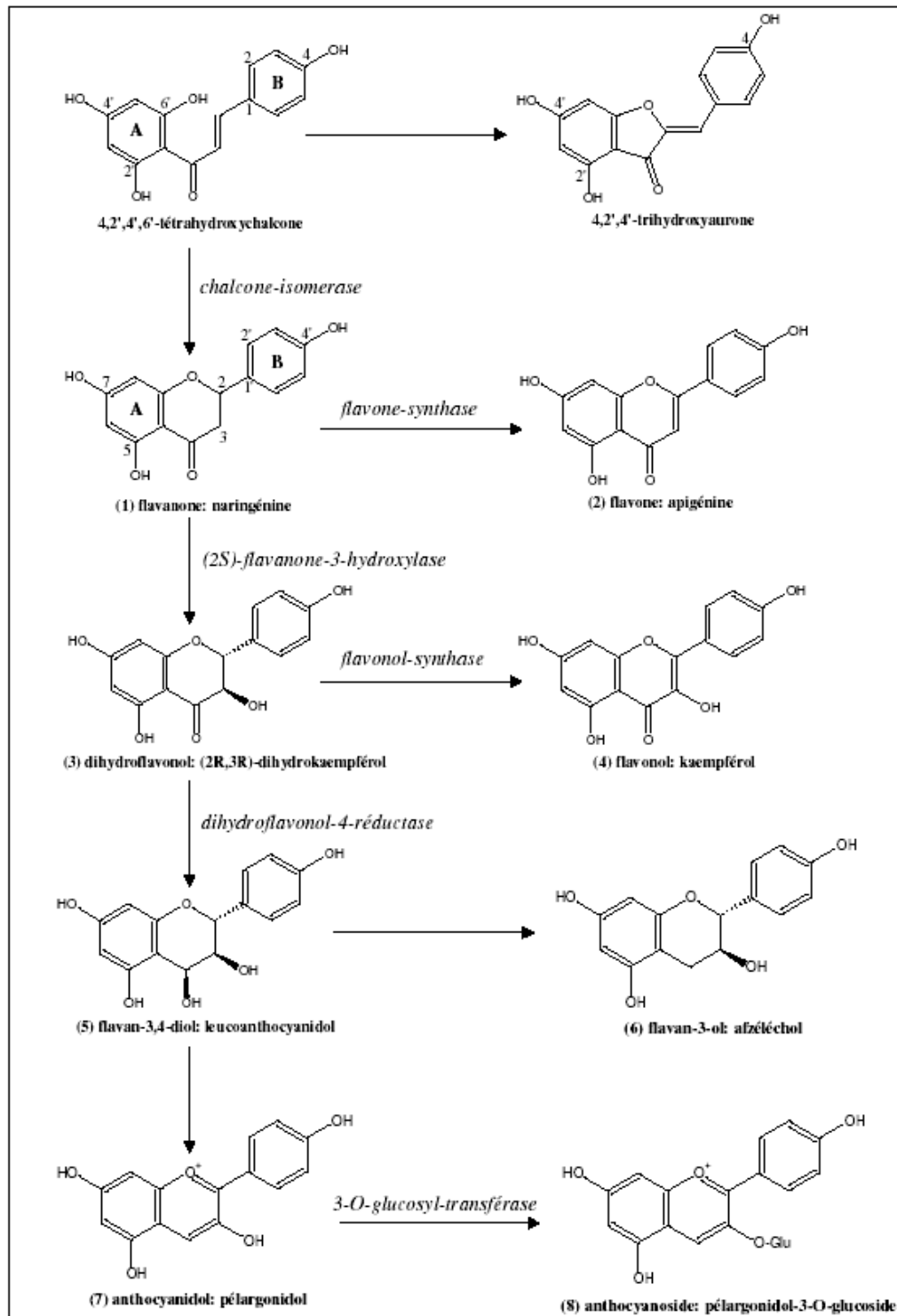


Figure 4: Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Ce sont, en premier lieu, la structure de la chaîne centrale à trois carbones, son degré d'oxydation et la position du deuxième cycle qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. A l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette de base se portent sur trois points :

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles
- Le niveau de méthylation
- Le niveau de glycosylation

Les diverses classes de flavonoïdes :

Les flavones (Figure 5) : Cette famille est la moins couramment trouvée dans le règne végétal. Ces composés sont présents principalement dans les céréales et certains légumes. La structure de base est la 2-phénylchromène-4-one. Elles présentent une double liaison entre C₂ et C₃. Les principales flavones sont l'apigénine et la lutéoline.

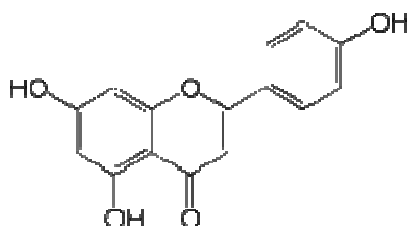
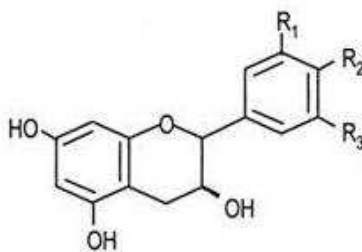


Figure 5 : Structure de l'apigénine (D'Archivio *et al.*, 2007).

Les flavanols ou flavane-3-ols (Figure 6): Cette classe regroupe les diverses catéchines (catéchine, epicatéchine, epicatéchine gallate, gallocatéchine gallate, gallocatéchine) ainsi que les proanthocyanidines. Ces molécules présentent un groupe OH en position 3.



$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Catechins
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallo catechin

Figure 6 : Structures chimiques de quelques flavanols (Manach *et al.*, 2004).

Les flavonols (Figure 7): Cette sous-classe de flavonoïdes est la plus importante et est très largement répandue dans le règne végétal et dans l'alimentation. Ces molécules dérivent principalement de trois formes non glycosylées autour desquelles des sucres viennent se greffer. Les formes non glycosylées, appelées « aglycones » sont la quercétine, la myricétine et le kampférol. Ils sont caractérisés par la présence d'une double liaison entre C₂ et C₃, d'une fonction carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Chez les plantes, ils sont responsables de la coloration des organes de la plante dans les couleurs allant du blanc au jaune pâle.

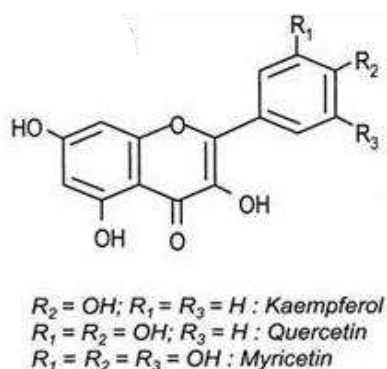


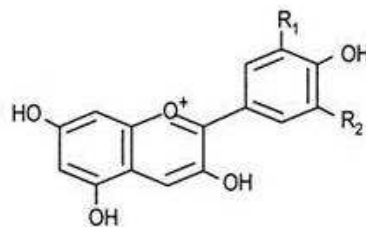
Figure 7 : Structures chimiques de quelques flavonols (Manach *et al.*, 2004).

Les isoflavones ont des structures similaires aux œstrogènes. Le cycle aromatique B est lié en C₃ au lieu de C₂ comme chez les autres flavonoïdes. Des groupements OH sont présents en position C₇ et C_{3'}. La principale source alimentaire est le soja.

Les flavanones sont des composés présentant de fortes similitudes de structures avec les flavonols mais ne comportant aucun groupement OH en position 3, ni de double liaison entre C₂ et C₃. On y classe la naringénine et l'héspéridine, responsables du goût amer des agrumes.

Les anthocyanes (Figure 8): Les anthocyanes ou anthocyanines sont des pigments naturels solubles dans l'eau, de couleur rouge à bleu. Ces molécules sont présentes dans un certain nombre de végétaux, principalement dans les pétales et dans les fruits rouges en leur conférant des couleurs allant du rouge au bleu. Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on les

trouve également dans d'autres organes comme les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle. Elles possèdent toutes une structure commune : le squelette flavylium. Ce motif a la particularité d'être un chromophore. En raison de leurs propriétés physicochimiques, ces pigments font l'objet d'études en agroalimentaire en tant que colorants et alicaments. Ils représentent la forme extrême d'oxydation de l'hétérocycle central. Les formes non glycosylées se nomment « anthocyanidines » et il existe 6 formes non glycosylées abondamment retrouvées dans le règne végétal : pélargonidine, cyanidine, péonidine, delphinidine, pétunidine et malvidine.



$R_1 = R_2 = H$: *Pelargonidin*
 $R_1 = OH$; $R_2 = H$: *Cyanidin*
 $R_1 = R_2 = OH$: *Delphinidin*
 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$: *Petunidin*
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: *Malvidin*

Figure 8 : Structures chimiques des principales anthocyanidines (Manach *et al.*, 2004).

3. Métabolisation et biodisponibilité

Il est important pour les nutritionnistes de connaître la consommation journalière de polyphénols mais aussi la disponibilité biologique de ces composés ingérés puisque leurs effets nutritionnels dépendent grandement de leur devenir au travers du tractus gastro-intestinal. De plus, des questions se posent actuellement sur la disponibilité biologique des polyphénols, notamment des flavonoïdes, et sur l'activité de ces molécules *in vivo*. En effet, la plupart des études réalisées jusqu'aux années 80 portaient sur les formes aglycones de flavonoïdes, ne reflétant ainsi qu'une partie minoritaire des formes apportées par notre alimentation. De plus, les techniques de dosage utilisées ne permettaient pas de doser de manière efficace ces composés du fait de leur faible concentration. Depuis une quinzaine d'années et depuis l'apparition de méthodes de dosage plus sensibles, beaucoup de recherches portant sur la disponibilité biologique ont vu le jour. Mais l'énorme variabilité de ce groupe de molécules et leur prévalence dans le règne végétal engendrent de grandes difficultés pour l'étude de leur disponibilité biologique et de leurs effets nutritionnels et physiologiques. La plupart des flavonoïdes ont une biodisponibilité orale de 10% ou moins (Hu, 2007). De plus, il existe encore très peu de données quant à l'habilité des aglycones à se diriger vers les cellules cibles.

3.1. L'absorption intestinale

La biodisponibilité des flavonoïdes varie largement d'un composé à l'autre. Cela dépend de leur structure chimique qui détermine le taux d'absorption au travers du tractus intestinal, leur métabolisation et donc leurs activités biologiques. Lors de l'ingestion des aliments végétaux, seuls les aglycones peuvent passer librement la barrière intestinale et se retrouver dans le flux sanguin (Ross and Kasum, 2002). Cette biodisponibilité n'est pas optimale car les aglycones ont une solubilité très faible en milieu aqueux (moins de 20 µg/ ml d'eau), ce qui peut limiter l'absorption au niveau de l'intestin. Les formes aglycones sont directement absorbées au niveau de l'intestin grêle (Hu, 2007). Mais la plupart se trouvent sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères et ne sont pas facilement absorbés sous leur forme naturelle. Ainsi, la glycosylation qui influence les propriétés physiques, chimiques et biologiques des flavonoïdes en modifie dès lors l'absorption. La liaison d'un composé phénolique à un sucre ou un acide organique augmente sa solubilité dans l'eau et diminue donc sa diffusion passive (Williamson *et al.*, 2000). Ces formes sont hydrolysées par les enzymes intestinales comme

les β -glucosidases (CBG¹ et LPH²). Les composés non absorbés dans le petit intestin passent dans le gros intestin où ils sont catabolisés par la flore bactérienne qui :

- scinde les cycles benzéniques et permet la formation de catabolites de petit poids moléculaire comme l'acide benzoïque.
- hydrolyse les formes conjuguées et permet ainsi la réabsorption de l'aglycone, qui peut dès lors à nouveau entrer dans le cycle entéro-hépatique (O'Leary *et al.*, 2003).

Le degré de glycosylation influence donc l'absorption mais n'influence généralement pas la nature des métabolites circulants. En plus de leur absorption, l'activité *in vivo* dépend aussi du métabolisme du foie et des reins, de leur degré d'excrétion, ... Les formes aglycones, une fois absorbées, sont rapidement transformées en glucuronides et en sulfates dans le foie (Hu, 2007). Comme pour leur absorption, le métabolisme des composés phénoliques est déterminé en premier lieu par leur structure chimique qui dépend elle-même du degré de polymérisation, de glycosylation, d'acylation et de leur solubilité (Bravo, 1998).

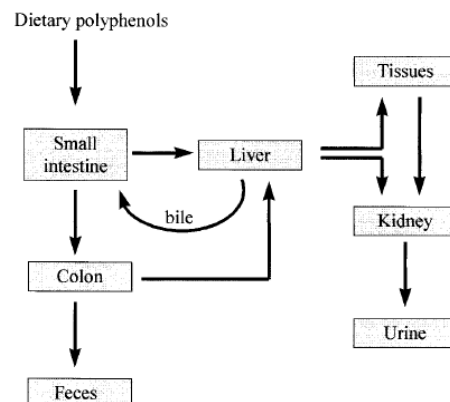


Figure 9 : Voies possibles d'absorption et d'excrétion des polyphénols consommés par l'homme (Scalbert and Williamson, 2000).

¹ CBG = β -glucosidase cytosolique

² LPH = lactase-phlorizin hydrolase

3.2. La conjugaison³

L'absorption des flavonoïdes dépend également de leur poids moléculaire. A cause des grandes différences de poids moléculaire et de leur hydrosolubilité, les proanthocyanidines⁴ sont faiblement absorbées dans l'intestin grêle et sont rapidement métabolisés et éliminés (Singh *et al.*, 2008). Après hydrolyse, les formes aglycones sont absorbées par les entérocytes intestinaux où ils seront glucuronidés par l'UDP-GT⁵ (UDP-glucuronyl transférase) durant leur transfert de l'intestin vers la veine porte hépatique. La même réaction a également lieu dans les cellules hépatiques. La dose ingérée détermine également le site primaire du métabolisme. Les doses supérieures aux apports journaliers recommandés (de l'orge du mg/ jour) à la dose physiologique sont métabolisées d'abord dans le foie tandis que les doses physiologiques sont métabolisées d'abord au niveau de la muqueuse intestinale (Scalbert and Williamson, 2000). Ces formes glucuronées sont les plus importantes trouvées dans le foie et dans d'autres organes. Les flavonoïdes contenant un noyau catéchol (catéchines et quercétine) peuvent être méthylés par la COMT⁶ (catéchol-O-méthyltransférase). Il existe aussi d'autres voies de métabolisation comme la sulfatation par les sulfotransférases⁷.

Ces processus de conjugaison représentent un processus de détoxification métabolique commun à tous les xénobiotiques, pour faciliter leur élimination biliaire et urinaire en augmentant leur hydrophilie (D'Archivio *et al.*, 2007).

³ La conjugaison est une réaction de détoxification qui augmente la solubilité et le poids moléculaire des composés.

⁴ Les proanthocyanidines sont des tanins condensés constitués d'unités flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons C-C 4→8 ou 4→6.

⁵ UDP-glucuronyltransférase : enzyme membranaire localisée dans le réticulum endoplasmique de plusieurs tissus et catalysant le transfert d'un acide glucuronique de l'acide UDP-glucuronique aux flavonoïdes. Cette glucuronidation a lieu généralement en position C₃.

⁶ Catéchol-O-méthyl transférase : enzyme catalysant le transfert d'un groupe méthyl de la S-adénosyl-L-méthionine aux flavonoïdes. La méthylation a lieu généralement en position C₃ mais aussi en C₄.

⁷ Sulfotransférase : enzyme catalysant le transfert d'un groupement sulfate de la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate à un groupe hydroxyle.

3.3. Le transport et concentration plasmatique

Les métabolites circulants sont liés à des protéines, en particulier à l'albumine. L'affinité des flavonoïdes pour cette protéine varie en fonction de leur structure chimique. Cette liaison a des conséquences sur la délivrance des métabolites aux cellules et tissus (Manach *et al.*, 2004 ; D'Archivio *et al.*, 2007). Une variation de pH induit un changement de conformation de l'albumine, conduisant à la dissociation du complexe (Horie *et al.*, 1988). L'absorption cellulaire pourrait être proportionnelle à la concentration de métabolites non liés. Mais, les flavonoïdes exercent-ils une activité biologique sous forme libres ou liés à l'albumine ? A l'heure actuelle, seule l'activité du complexe albumine-quercétine a été démontrée pour l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique. Les concentrations plasmatiques atteintes après consommation dépendent de la nature des flavonoïdes et de la source alimentaire. (D'Archivio *et al.*, 2007). La concentration plasmatique dépasse rarement 1 μM et le maintien de concentrations élevées dans le plasma requiert une consommation répétée (Figure 10).

Polyphenols	Source	Quantity of polyphenols ingested (mg)	Maximum Concentration in plasma (μM)	Urinary excretion (% of intake)
Anthocyanins				
Cyanidin 3-glucoside	Ornage juice (1 L)	71 mg Cy-3-glc	0.002	
Malvidin 3-glucoside	Red wine (500 mL)	68 mg Mal-3-glc	0.001	0.016 6h
Malvidin 3-glucoside	Red grape juice (500 mL)	117 mg Mal-3-glc	0.003	0.019 6h
Cyanidin 3-glucoside	red fruit extract (1,6 g)	2,7 mg Cy-3-glc/kg bw	0.03	
Flavanols				
Epigallocatechin gallate	Green tea infuc-sion (5 g)	105 mg	0.13-0.31	
Catechin	Red wine (120 mL)	34 mg	0.072	
Epicatechin	Chocolate (80 g)	137 mg	0.26	
Catechin	Pure compound	0,36 mg/kg bw	0.14-0.49	1.2-3
Epigallocatechin gallate	Pure compound	50-1600 mg	0.28-7.4	
Epigallocatechin gallate	Green tea extract	110-328 mg	0.26-0.7	
Catechins	Black tea	140 mg	0.34	
procyanidin B1	Grape seed extract	18 mg	0.011	
Flavanones				
Hesperidin	Orange juice	61 mg	0.48	4.1
Hesperidin	Orange juice	110-220 mg	0.46-1.28	4.1-6.4
Naringenin	Orange juice	22,6-45 mg	0.06-0.2	7.1-7.8
Naringenin	Grapefruit juice	199 mg	5.99	30.2
Naringenin	Pure compound	135 mg	7.4	5.8
Hesperidin	Pure compound	135 mg	2.7	3.3
Flavonols				
Quercetin	Apples	107 mg	0.3	3.5
Quercetin	Onions	100 mg	7.6	6.4
Quercetin 4'-glucoside	Pure compound	100 mg	7.0	4.5
Quercetin	Buckwheat tea	200 mg	2.1	1.0
Quercetin	Pure rutin	200 mg	1.1	0.9

Figure 10: Biodisponibilité des flavonoïdes contenus dans l'alimentation (tableau modifié de D'Archivio *et al.*, 2007).

3.4. L'excrétion

Les flavonoïdes et leurs dérivés sont principalement éliminés par les urines et la bile. Les métabolites hautement conjugués sont préférentiellement éliminés via la bile tandis que les moins conjugués comme les monosulfatés sont préférentiellement excrétés via l'urine. La quantité totale de métabolites éliminés dans les urines est hautement corrélée à la concentration plasmatique maximale. Le pourcentage d'excrétion urinaire est plus important pour les flavanones des agrumes (4-30% de la consommation) que pour les flavonols (0.3-1.4%). Pour les catéchines, on en retrouve dans les urines : 0.5 à 6% pour le thé, 2 à 10% pour le vin rouge (D'Archivio *et al.*, 2007). Ce pourcentage est très faible pour les anthocyanes ; moins de 0.1 % des anthocyanes ingérées de baies se retrouvent dans les urines. De plus, une faible teneur est retrouvée dans le plasma sanguin ½ à 1 heure après ingestion (Beattie *et al.*, 2005). Cette faible disponibilité peut être due au fait qu'il existe, dans cette sous-classe, un nombre de structures moléculaires élevé et qu'il existe un nombre important de métabolites pouvant être générés (D'Archivio *et al.*, 2007). Mais la majeure partie ingérée n'est pas retrouvée dans les urines (75 à 99%) (Scalbert and Williamson, 2000).

L'évaluation de la biodisponibilité d'un composé nécessite donc l'étude à la fois de son absorption, de sa métabolisation et des effets d'un grand nombre de produits de dégradation. La plupart des flavonoïdes suivent les voies de métabolisation tissulaires et intestinales. Cependant, en fonction de leur nature, de leur charge, de leur polarité et de leur niveau d'oxydation, d'importantes différences sont observées.

Chapitre 2 : Les flavonoïdes : aspect nutritionnel et santé

1. Introduction

Les nutriments sont les composés nutritionnels des aliments : les glucides, lipides, vitamines, oligoéléments, protéines, acides aminés et minéraux. Ces composés influencent des activités physiologiques ou cellulaires ayant pour résultat un effet bénéfique sur la santé. Par oxydation, ils permettent notamment la production d'énergie assurant de nombreuses fonctions vitales comme le renouvellement cellulaire. Cette définition distingue ces composés nutritionnels d'autres composés bioactifs ayant des effets néfastes et considérés comme des carcinogènes ou des toxines. Il est important de savoir que les composés bioactifs ne sont pas des aliments, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas essentiels pendant la vie, un critère fondamental pour la classification comme aliment. Ces composés bioactifs se trouvent en quantité très faible dans l'alimentation. Leur nombre et leur diversité rendent très complexe la compréhension de leurs effets sur la santé. De plus, le potentiel bioactif de ces composés est fonction d'une myriade de facteurs comme la source alimentaire, la quantité consommée, la façon dont ils sont consommés (seuls ou avec d'autres aliments, cuits ou non, la fréquence, ...), et d'autres facteurs comme les variations génétiques et l'environnement. La réponse biologique dépend également des individus qui les consomment : profil démographique, caractéristiques médicales, ... La détermination des effets biologiques des composés bioactifs exige de nombreuses études *in vitro* et/ou *in vivo* devant être corrélées avec des résultats sur la santé. L'étude des effets aigus et chroniques, des effets directs et indirects, des mécanismes d'action et l'évaluation des synergies positives et/ou négatives entre composés bioactifs et alimentation devront être réalisées (Kris-Etherton *et al.*, 2004) pour déterminer leur rôle sur la santé. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) représentent les apports optimaux pour la prévention de certaines pathologies. Ceux-ci sont issus de données cliniques, épidémiologiques et expérimentales. La figure 11 résume les effets paradoxaux des suppléments en antioxydants, qu'elles soient nutritionnelles ou pharmacologiques (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

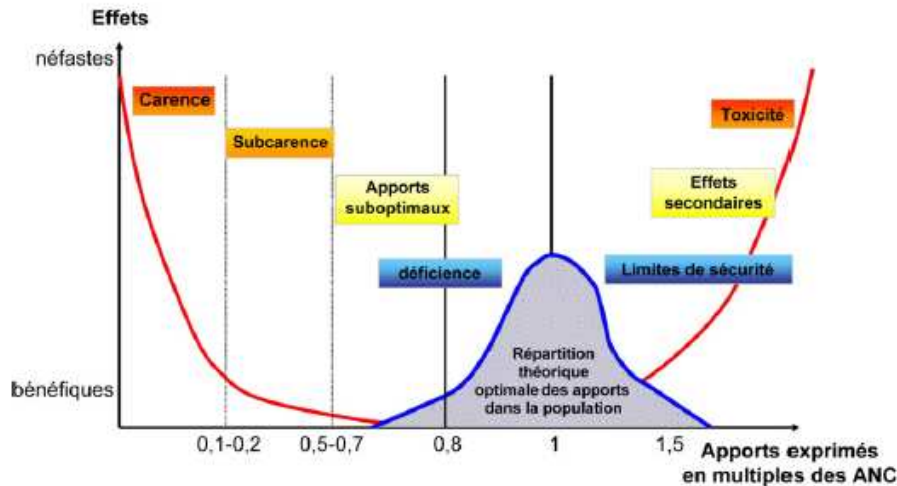


Figure 11: Relation Nutrition-Santé : ANC = apports nutritionnels conseillés (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'activité antioxydante des flavonoïdes est déterminée par leur structure, en particulier la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Du point de vue de leur activité antioxydante, Halliwell (1994) décrit trois types de mécanismes d'action :

- Le piégeage direct des ERO aussi bien en phase aqueuse qu'en phase organique (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Cao *et al.*, 1997 ; Duthie and Crozier, 2000 ; Ross and Kasum, 2002).
- L'inhibition des enzymes pro-oxydantes et la chélation des ions métalliques
- La protection des systèmes biologiques de défenses antioxydantes

Les flavonoïdes sont ainsi capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne (Cillard *et al.*, 1990 ; Ross and Kasum, 2002 ; Cillard and Cillard, 2006). Certains flavonoïdes peuvent également chélater des ions métalliques de transition responsables de la formation de ERO (Pincemail *et al.*, 1990) et ainsi, inhiber la réaction de la lipooxygénase. Ils peuvent également exercer leur capacité antioxydante au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes (Ross and Kasum, 2002).

Comme antioxydants, les flavonoïdes peuvent donc protéger les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et, donc potentiellement limiter les risques de maladies dégénératives associées au stress oxydant (Scalbert *et al.*, 2005a). Leur activité antioxydante a été observée dans divers modèles animal ou *in vitro* (Yao *et al.*, 2004).

D'autres activités leur sont reconnues telles que (Yao *et al.*, 2004):

- anti-inflammatoires : à de fortes doses, la quercétine et la myricétine inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase, évitant ainsi le métabolisme de prostaglandines⁸ et de leucotriènes⁹ intervenant dans les phénomènes inflammatoires (Landolfi *et al.*, 1984). Les flavonoïdes, en particulier la quercétine, inhibent l'activité de certaines enzymes comme la NADPH oxydase et la myéloperoxydase chez les neutrophiles activés (Pincemail *et al.*, 1987, 1988).
- anti-allergiques : inhibition de l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺ dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (Di Carlo *et al.*, 1999).
- anti-cancéreuses : à l'heure actuelle, beaucoup de recherches sur les flavonoïdes sont réalisées en vue d'étudier leurs effets sur divers types de cancer. Ces études montrent des résultats très variables selon la molécule étudiée et le type de cancer (Ho *et al.*, 1994 ; Knekt *et al.*, 1997 et 2002 ; Art *et al.*, 2001a).

De nombreuses approches méthodologiques sont nécessaires pour la compréhension des effets biologiques et des mécanismes d'action des composés bioactifs : études animales ou humaines et études *in vitro*. L'établissement d'un effet biologique *in vitro* constitue un point de départ essentiel pour entreprendre des études sur modèle animal ou humain (Kris-Etherton *et al.*, 2004) (Figure 12).

⁸ Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique, obtenu à partir de phospholipides membranaires par action de phospholipases. Ces molécules liposolubles sont des agents de signalisation paracrine et autocrine qui activent de nombreux récepteurs membranaires couplés à des protéines G. Les prostaglandines font parties de la classe des prostanoïdes, qui contient aussi les thromboxanes et les prostacyclines. Les prostanoïdes sont eux-mêmes une sous-catégorie des eicosanoïdes.

⁹ Les leucotriènes sont des lipides, appartenant à la famille des éicosanoïdes. Ils sont le produit de l'action de lipoxygénases sur l'acide arachidonique. On distingue deux classes de leucotriènes : la famille des LTB₄ possédant un rôle chimiotactique pour les leucocytes (macrophages, neutrophiles..) sur les sites de l'inflammation et la famille comprenant LTC₄, LTD₄ et LTE₄ lors de phénomènes allergiques.

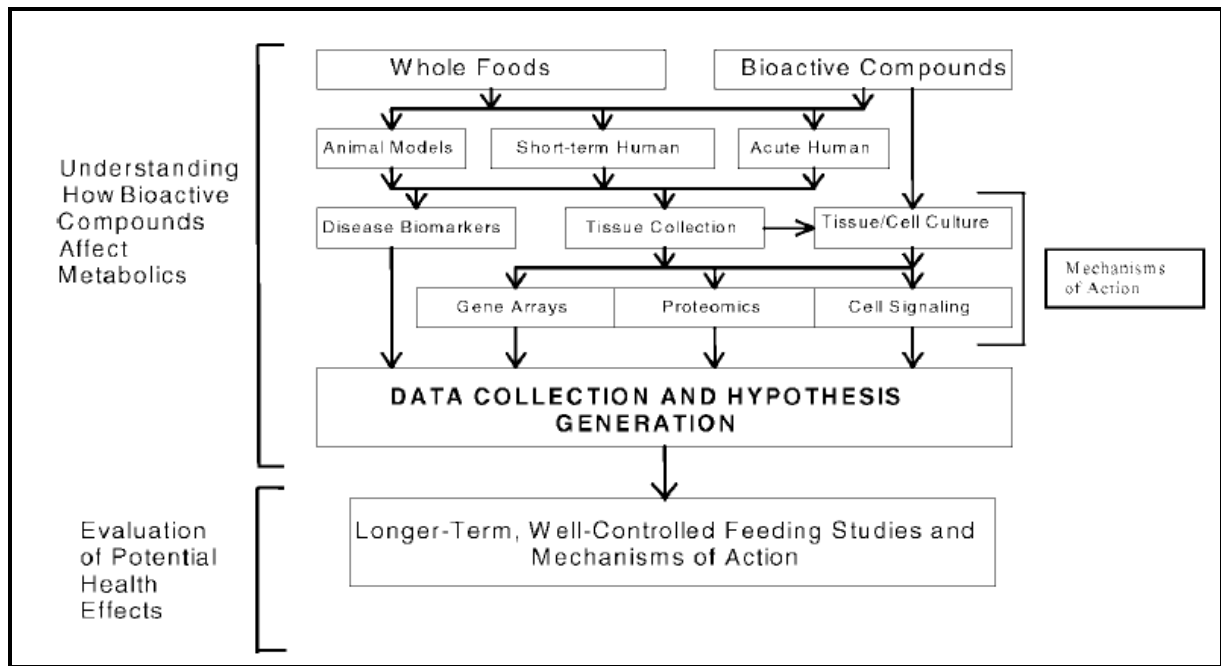


Figure 12: Approche expérimentale pour évaluer des effets biologiques de composés bioactifs (Kris-Etherton *et al.*, 2004).

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut être évalué *in vitro* par une série de méthodes en mesurant leur capacité à piéger ou réduire les radicaux libres : le test ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)), le test DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), le test ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), ... Cependant, les valeurs obtenues par ces mesures *in vitro* ne permettent pas de les comparer à leur effet sur la santé et ce, pour de nombreuses raisons :

- Ces méthodes donnent des valeurs différentes selon le test utilisé (Tabart *et al.*, 2009)
- Les flavonoïdes sont métabolisés dans l'organisme et cela entraîne une modification de leur capacité antioxydante
- Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes dépendent de leur structure chimique mais aussi des propriétés physicochimiques de leur environnement.
- L'impact des flavonoïdes dans la protection antioxydante des tissus est influencé par leur biodisponibilité.

Donc, aucune corrélation ne peut être faite entre les valeurs obtenues *in vitro* et leur activité biologique (Scalbert *et al.*, 2005a).

La consommation journalière de flavonoïdes chez l'homme est estimée à 100 voir 1000 mg/jour (formes glycosylées) (aglycons : 1 à 170 mg/jour). Cette quantité est largement supérieure aux autres antioxydants connus : 10 fois plus que la vitamine C et 100 fois plus que la vitamine E et les caroténoïdes (Scalbert *et al.*, 2005b ; Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Geleijne and Hollman, 2008). Les groupes prédominants dans l'alimentation humaine sont les flavonols, les catéchines (flavanols), les isoflavones, les flavones et les flavanones. La consommation de quercétine (un flavonol) dans le monde varie de 4 à 68 mg/ jour (pomme, thé, oignon comme principales sources). L'équipe de Hertog (1993) a calculé l'apport de deux types de flavonoïdes (flavonols et flavones) dans l'alimentation hollandaise et l'a estimé à 23 mg/ jour. La consommation la plus élevée de flavonols est observée dans la population japonaise, grande amatrice de thé vert (Skiloba and Smith, 2000). De plus, cette alimentation traditionnelle des japonais est riche en soja et légumes. Un autre régime alimentaire fait parler de lui, le régime dit crétois, riche en huile d'olive, fruits, légumes, poissons, volailles et céréales complètes (Kris-Etherton *et al.*, 2004). Ce régime alimentaire dit « prudent » est associé à de faibles risques de certaines formes de cancers, d'obésité, d'hypertension, de maladies cardiaques coronariennes et d'autres causes de mortalité comme les maladies neurodégénératives. Ce régime assurerait une protection au niveau des vaisseaux sanguins, ce qui diminuerait les risques de maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (Scarmeas *et al.*, 2006a, 2006b).

2. Historique des études « santé » réalisées sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes furent longtemps perçus uniquement comme des pigments qui donnaient de la couleur aux organes des plantes. Une première activité biologique fut décrite en 1936, en Hongrie, où un groupe de chercheurs (Rusznayak and Szent-Gyorgi, 1936) a identifié une substance dans la pelure du citron. Cette substance était capable de réduire la perméabilité capillaire et s'est avérée efficace dans le traitement de patients atteints du purpura résistant à la thérapie à la vitamine C. Cette substance fut appelée « vitamine P » pour perméabilité. Plus tard, ces chercheurs se sont rendu compte que ce n'était pas une substance unique mais un mélange de flavonoïdes (= citrine) (Hollman *et al.*, 1996 ; Geleijne and Hollman, 2008). Vers les années 1950s, ce mélange a perdu son statut de vitamine car il ne possédait aucune des caractéristiques propres aux vitamines¹⁰ (Geleijne and Hollman, 2008). Durant les années 1970 à 1980, on a suspecté que ces composés auraient une activité anticarcinogène.

Jusqu'en 1990, les études sur les molécules antioxydantes n'ont porté que sur les vitamines, les caroténoïdes et les minéraux (Scalbert *et al.*, 2005b)(Figure 13).

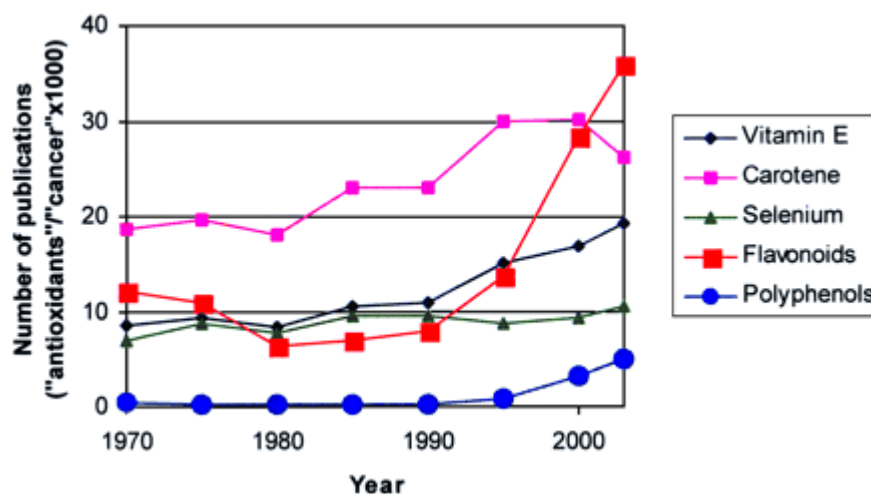


Figure 13: Augmentation du nombre de publications concernant les effets des molécules antioxydantes sur la santé (Scalbert *et al.*, 2005b).

¹⁰ Vitamine : Molécule organique indispensable au bon développement et au fonctionnement normal de l'organisme qui ne peut les synthétiser naturellement. Ces molécules n'ont aucune valeur énergétique et doivent être absorbées quotidiennement à faible dose afin d'éviter les carences ou l'hypervitaminose.

Les études sur les flavonoïdes étaient cantonnées à leur importance dans la taxonomie végétale et leurs relations avec l'évolution (Hollman *et al.*, 1996). Ce n'est qu'à partir des années 1985-1990, que des propriétés santé des flavonoïdes ont été mises en évidence. Aux Pays-Bas, un groupe de chercheurs a mis en évidence un effet protecteur important de certains flavonols (quercétine, kaempférol et myricétine) contre la mortalité due aux maladies cardiaques coronariennes (Zultphen Elderly Study) (Geleijne and Hollman, 2008). Pincemail *et al.* (1987-1988), en Belgique, ont mis en évidence l'effet inhibiteur de la quercétine et ses dérivés sur l'activité de certaines enzymes jouant un rôle dans l'inflammation. En 1992, les études des effets anticarcinogènes et antiprolifératifs de ces composés débutent et ce n'est après 1995 que les recherches sur ces composés phénoliques se sont diversifiées portant notamment sur leurs effets en prévention de certaines pathologies (Scalbert *et al.*, 2005b). Le 18 novembre 2004, la 1^{ère} conférence internationale sur les polyphénols et la santé a eu lieu.

L'étude tardive des polyphénols est surtout due au fait qu'ils sont nombreux, de type différent selon les espèces de plantes et avec des structures chimiques très variables (Scalbert *et al.*, 2005b).

3. Etudes épidémiologiques et impact des flavonoïdes sur certaines pathologies

La démonstration des effets protecteurs des antioxydants est notamment basée sur diverses approches épidémiologiques (Roberfroid, 2002).

3.1. Les maladies vasculaires :

3.1.1. Maladies cardiovasculaires :

Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* chez le rat ont permis de mettre en évidence des effets vasodilatateurs à court terme, des effets hypotenseurs, protecteurs contre l'ischémie cardiaque et contre la fibrose myocardique à long terme des polyphénols, principalement des flavonoïdes (Martin and Andriantsitohaina, 2002). Une des possibilités, quant à leurs effets sur les maladies cardiovasculaires, est leur habilité de prévenir l'oxydation des LDL, leurs activités antiplaquettaires et anti-agrégation (inhibition de la plaque d'athérome¹¹) et leurs propriétés de vasorelaxation; dès lors une diminution des maladies coronariennes et de l'athérosclérose (Harborne and Williams, 2000 ; Yao *et al.*, 2004) peut en être une conséquence.

De nombreuses études sur modèle animal démontrent que la consommation de polyphénols limite le développement de lésions athéromateuses. Ces effets sont associés à une réduction de l'oxydation des LDL. Aux Pays-Bas, l'équipe de Arts (2001b) a montré qu'une consommation de plus de 30 mg par jour de catéchines permet une diminution de 70% des maladies coronariennes (sauf en ce qui concerne les infarctus du myocarde) chez les hommes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Rimm *et al.* (1996). Geleijne et ses collaborateurs (2002) ont également montré une diminution de 65% des infarctus fatals du myocarde aussi bien chez les femmes que chez les hommes, si la consommation de flavonols est supérieure à 33 mg par jour, plus particulièrement le kampférol (Lin *et al.*, 2007). D'autres groupes de chercheurs ont également étudié l'impact d'une consommation riche en flavonols et flavones chez les femmes. Une haute teneur en ces composés (quercétine, kampférol, myricétine, apigénine et lutéoline) permet une diminution,

¹¹ Athérome (du grec *athérê* signifiant « bouillie » correspond à un remaniement de l'intima des artères de gros et moyens calibres (aorte, artères coronaires, artères cérébrales, ...) par accumulation segmentaire de lipides, glucides, sang, tissus adipeux, dépôts calcaires, et autres.

importante (Knekt *et al.*, 1996) ou non (Sesso *et al.*, 2003), de l'incidence des maladies coronariennes. Les résultats montrant une incidence positive peuvent être apparemment améliorés chez la femme grâce à la consommation de vitamine E et aux traitements hormonaux puisque l'équipe de Yochum (1999) a attribué la diminution des maladies cardiovasculaires à ces produits (hormones et vitamine E) et non pas aux flavonoïdes. Cette étude a été reprise par l'équipe de Mink (2007) en utilisant des bases de données plus récentes de l'USDA¹² (2003-2004). Ces nouvelles bases de données reprennent entre autre la composition des aliments au niveau des sept classes de flavonoïdes. Les auteurs ont ainsi montré qu'une consommation élevée en flavanones avait une incidence sur l'occurrence des maladies cardiovasculaires en diminuant les risques de développement de ces pathologies. Une autre étude se déroulant en Italie, de 1995 à 2002, montre, quant à elle, que l'effet protecteur des flavonoïdes sur l'incidence des infarctus du myocarde est due principalement aux anthocyanes (Tavani *et al.*, 2006). Ces études épidémiologiques montrent donc que l'ingestion de flavonoïdes permet de réduire le risque de développer certaines pathologies cardiaques mais seulement avec une consommation régulière et élevée en ces composés (Scalbert *et al.*, 2005a), ceux-ci protégeant les LDL de l'oxydation (Hertog *et al.*, 1995).

3.1.2. Maladies cérébrovasculaires :

Les AVC¹³ sont la troisième cause de mortalité et la cause la plus commune d'incapacité de travail dans les pays développés (He *et al.*, 2006). Un des moyens de protection des flavonoïdes contre les maladies cérébrovasculaires est le fait que, limitant l'oxydation des LDL, ils diminuent la formation de plaques d'athérome. Un autre mécanisme par lequel les antioxydants protègent contre les accidents cérébrovasculaires est la réduction de l'agrégation des plaquettes (spécialement les flavonoïdes et la vitamine E), et de la pression sanguine (spécialement la vitamine C) (Hirvonen *et al.*, 2000, 2001).

Au niveau des études épidémiologiques, Arts *et al.* (2001b) n'ont pas montré d'effet de la consommation de catéchines (124 mg/jour) sur les AVC chez les hommes ; idem pour l'équipe de Mink (2007) en relation avec la consommation des 7 classes de flavonoïdes (354,4 mg/jour) chez la femme. Par contre, l'équipe de Knekt (2002), avec une consommation maximale de flavonols et flavanones de 39,5 chez la femme et de 26,9 mg/jour chez l'homme a montré une diminution significative du risque d'AVC. L'équipe de He

¹² United States Department of Agriculture

¹³ AVC : Accident cérébro-vasculaire

(2006) a analysé les différentes études épidémiologiques réalisées sur la consommation de fruits et légumes en relation avec les AVC. La compilation de ces résultats montre une réduction de 26 % des risques lors d'une consommation élevée en fruits et légumes (5 ou plus par jour) comparativement aux individus qui consomment 3 à 5 fruits par jour (11%).

3.2. Les maladies neurodégénératives :

La maladie d'Alzheimer est une cause prédominante de démence chez les personnes âgées. Elle se caractérise médicalement comme un dysfonctionnement de la mémoire, un affaiblissement du vocabulaire, une désorientation spatiale et temporelle et une perte du jugement. Au niveau histopathologique, la maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte de neurones dans la région du cortex cérébral, dans l'hippocampe et dans les amygdales, une disposition extracellulaire des protéines β -amyloïdes et une précipitation intracellulaire des protéines hyperphosphorylées (Mariani *et al.*, 2005). C'est une maladie complexe avec une combinaison de facteurs de risques génétiques et non génétiques. A ce jour, trois mutations ont été décrites : sur le gène codant la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) sur le chromosome 21, et sur les gènes codant les presenilines 1 (chromosome 14) et 2 (chromosome 1) (Singh *et al.*, 2008). La maladie de Parkinson, quant à elle, se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substance noire.

Le stress oxydant et les dommages au niveau des macromolécules présentes dans le cerveau sont des facteurs importants du développement des maladies neurodégénératives. De nombreuses études ont montré une neuroprotection par les flavonoïdes mais il existe très peu de données sur l'interaction des flavonoïdes et de leurs métabolites sur la barrière sang-cerveau. Cette barrière est formée de micro-vaisseaux contenant de l'endothélium et des astrocytes. De nombreuses études épidémiologiques documentent l'influence des habitudes alimentaires et des antioxydants sur l'incidence des désordres neurologiques (Singh *et al.*, 2008 ; Commenges *et al.*, 2000). Presque 15% de la population âgée de plus de 65 ans sont touchés par la maladie d'Alzheimer et 1% par la maladie de Parkinson. Ces maladies dépendent d'un stress oxydant affectant les tissus du cerveau (Scalbert *et al.*, 2005a). Les dommages au niveau des acides nucléiques, des lipides et des protéines dans le cerveau contribuent au vieillissement mais aussi à ces maladies.

L'implication des dommages oxydants sur le cerveau sont dus à des caractères propres de celui-ci :

- Le cerveau contient de fortes teneurs en acides gras insaturés.
- Le cerveau consomme de grandes quantités d'oxygène (plus de 20% de la quantité totale du corps).
- Les taux en antioxydants y sont très faibles.
- Le cerveau contient de hautes concentrations en métaux de transition tels que le Fe³⁺, ion clé catalysant les dommages induits par l'oxydation.

Une large étude sur le cerveau (Commenges *et al.*, 2000), réalisée dans le sud-ouest de la France (Dordogne et Gironde), sur 3777 hommes et femmes de plus de 65 ans, montre qu'une consommation moyenne de flavonoïdes de 14,4 mg/jour (provenant principalement de fruits et légumes) permet une diminution significative du risque de démence. Une autre étude (Singh *et al.*, 2008) montre également cette neuroprotection sur une population plus large, de 5 à 110 ans. Le groupe de Laurin (2004) aux Etats-Unis, n'a quant à lui pas observé de neuroprotection (maladie d'Alzheimer et démence) en corrélation avec la consommation de flavonoïdes. Mais, la plus grande quantité consommée dans cette étude était de 8,2 mg/jour contre 23 mg/jour préconisés par le groupe de Hertog (1993).

3.3. Les cancers:

Le cancer est la seconde cause de mortalité aux USA et dans d'autres nations. Le développement de cette maladie est divisé en différentes étapes (Beattie *et al.*, 2005):

- Etape d'initiation : Elle débute quand des agents carcinogènes se fixent sur l'ADN ou à la suite de lésions par radiations ionisantes ou de rayonnements UV. Des ERO entraînent des mutations au niveau de l'ADN des cellules somatiques. Ils peuvent également agir en tant que messagers secondaires en modifiant dans la cellule la régulation rédox du glutathion, agent antioxydant important, en activant la thiorédoxine qui active elle-même le NFκB normalement inactif. Il y a donc synthèse de nombreux médiateurs impliqués dans le processus du développement du cancer.
- Promotion (stimulation de l'expansion de la tumorigenèse). Elle peut se prolonger pendant plusieurs années. La cellule se transforme en cellule pré-néo-plasique avec maintien du caractère immortel.

- Phase de propagation ou progression (conversion de la tumeur en cancer malin). La cellule pré-néo-plasique se transforme en cellule néo-plasique ou cancéreuse non reconnue par l'organisme comme cellule anormale.

Un agent chémopréventif ou anticancéreux efficace et acceptable doit répondre à différentes propriétés :

- Ne pas avoir d'effets toxiques pour les cellules normales et saines
- Avoir une haute efficacité contre de multiples cancers
- Sa consommation orale doit être possible
- Ses mécanismes d'actions sont connus
- Son coût est faible
- Il est accepté par la population

Les vitamines A, C, E, beta-carotène, flavonoïdes et autres constituants des fruits et légumes pourraient être ces agents chémopréventifs (Figure 14).

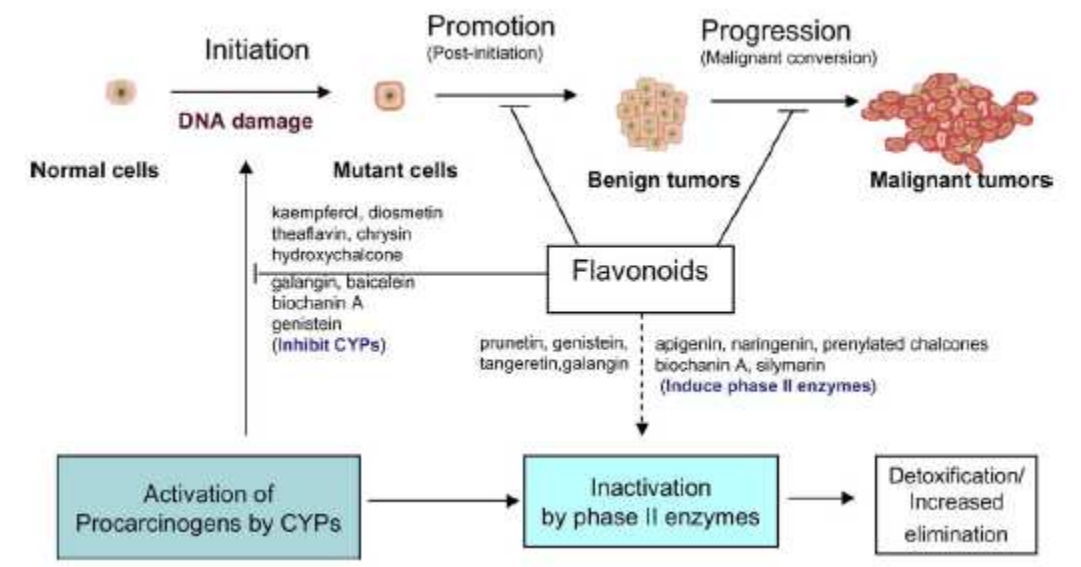


Figure 14: Blocage ou suppression de la carcinogenèse à différents niveaux par les flavonoïdes (Moon *et al.*, 2006).

Une consommation régulière en fruits et légumes a été corrélée à une diminution des risques de cancer, allant même jusqu'à 50% (Roberfroid, 2002). Les diminutions les plus importantes sont celles des cancers épithéliaux du tractus gastro-intestinal et des voies respiratoires en relation avec la consommation de bêta-carotène.

Dans l'étude « Zutphen Elderly Study », Arts et ses collaborateurs (2001a) ont montré que 5 ans après une consommation moyenne régulière de 26 mg de catéchines par jour, aucune association n'a été trouvée entre la consommation de catéchines et la mortalité due aux cancers épithéliaux chez les hommes. Par contre, chez les femmes (Arts *et al.*, 2002), une forte diminution des risques de cancer du rectum est observée. La consommation de flavonols et de flavanones, chez les hommes et les femmes entraîne une diminution des risques de cancers du poumon (sauf chez les fumeurs), principalement due à la quercétine et à la naringénine, et des cancers du système nerveux. Cette diminution des risques est significativement plus importante chez les hommes que chez les femmes en raison vraisemblablement d'un statut antioxydant plus élevé au départ chez les femmes (Knekt *et al.*, 1997 et 2002 ; Le Marchand *et al.*, 2000). Un des mécanismes avancés est l'inhibition du CYP1A1¹⁴ par la quercétine et du CYP3A4¹⁵ par la naringénine (Le Marchand *et al.*, 2000). Par contre, l'équipe de Hertog (1997) n'observe aucune incidence sur les risques de cancers lors d'une consommation de flavonols et flavanones (étude sur le thé). Une des raisons serait que la population Anglo-Saxonne met du lait dans son thé. Ce lait empêche les flavonoïdes d'être absorbés et diminue donc leurs effets protecteurs. Une autre étude, hollandaise, portant sur 120 850 hommes et femmes âgés de 55 à 69 ans, ne montre aucune incidence de la prise de flavonols et flavones sur le cancer de l'estomac, du colon et du poumon (Hollman and Katan, 1999). En Italie, les effets protecteurs des flavonoïdes sur l'incidence d'autres types de cancers ont aussi été observés sur des populations d'âge allant de 19 à 79 ans. L'équipe de Rossi a observé un effet protecteur des flavanones sur l'incidence du cancer de la bouche, du pharynx (Rossi *et al.*, 2007a) et sur l'incidence du cancer de l'œsophage (Rossi *et al.*, 2007b). L'équipe de Bosetti a, quant à elle, observé un effet protecteur des flavones et des flavonols sur l'incidence du cancer du rein (Bosetti *et al.*, 2007) et aucun effet sur l'incidence du cancer de la prostate (Bosetti *et al.*, 2006).

¹⁴ CYP1A1 code pour le cytochrome P450, de la famille 1, de la sous-famille A, du polypeptide 1 (CYP1A1).

¹⁵ CYP3A4 code pour le cytochrome P450, de la famille 3, de la sous-famille A, du polypeptide 4 (CYP3A4).

L'effet bénéfique des flavonoïdes dans la thérapie contre les cancers serait lié à leur capacité à agir comme antioxydant grâce à leur capacité de réduction des ERO endogènes. Mais, en tant que pro-oxydant, ils interviendraient également dans la fragmentation apoptotique des cellules (Galati and O'Brien, 2004). Ces effets peuvent être expliqués par différents mécanismes (Figure 15):

- Ils pourraient agir comme agents bloquant les étapes d'initiation. Ils influencent le métabolisme des procarcinogènes en modulant l'activité du Cytochrome P450 impliqué dans leur activation en tant que carcinogènes. Ils peuvent limiter la formation des cellules initiatrices en stimulant la réparation de l'ADN.
- Ils pourraient supprimer les agents carcinogènes et inhiber la formation et la croissance des tumeurs en inhibant la prolifération cellulaire. Ils peuvent affecter les voies de signalisation de croissance en inhibant l'activité de la protéine-kinase C, en inhibant l'expression des oncogènes et l'activité de l'ornithine décarboxylase, enzyme clef de la synthèse des polyamines associées à la prolifération cellulaire et ils peuvent inhiber cette prolifération en affectant le métabolisme de l'acide arachidonique.
- Ils pourraient induire l'apoptose des cellules tumorales, la protection contre les dommages oxydatifs sur l'ADN, l'inhibition de l'activation des carcinogènes, et l'activation des systèmes de détoxification.

Flavonoid or other dietary phenolic	Pro-oxidant activity or mitochondrial toxicity	Effects on cytochrome P450	Effects on phase II metabolizing enzymes
Flavonoid			
Quercetin	Pro-oxidant (transition metals)	Induces/inhibits CYP1A1	Inhibits PST, UGT; induces NQO
Galangin	Collapses $\Delta\psi_m$	Induces/inhibits CYP1A1	Inhibits PST, induces NQO
Diosmin		Induces CYP1A1	
Diosmetin		Induces CYP1A1	
Tangeretin		Induces CYP1A1/2	
Flavone		Induces CYP1A1/2	
β -Naphthoflavone		Induces CYP1A1/2	
Kaempferol		Inhibits CYP1A1	Inhibits PST, induces NQO
α -Naphthoflavone		Inhibits CYP1A1/2, induces CYP3A4	
Naringenin	Pro-oxidant (peroxidase)	Inhibits CYP3A4	
Flavanone		Induces CYP2B1/2	
Fisetin	Pro-oxidant (transition metals)		Inhibits PST, UGT
Myricetin	Pro-oxidant (transition metals)		Inhibits PST, induces NQO
Chrysin	Collapses $\Delta\psi_m$		Inhibits PST, UGT
Apigenin	Pro-oxidant (peroxidase)		Inhibits PST, UGT, induces NQO
4'-Bromoflavone			Induces NQO
Baicalin	Pro-oxidant Collapses $\Delta\psi_m$		
Genistein			Inhibits PST
Other dietary phenolic			
Green/black tea phenolics	Collapses $\Delta\psi_m$		Induces GST, NQO, and UGT
Curcumin	Collapses $\Delta\psi_m$		Inhibits PST
Ellagic acid		Inhibits CYP1A1, CYP2E1	Inhibits PST
Hydroxycinnamic acids (phenol ring)	Pro-oxidant (peroxidase)		
Hydroxycinnamic acids (catechol ring)	Pro-oxidant (transition metals)		
Capsaicin	Pro-oxidant (peroxidase), collapses $\Delta\psi_m$	Inhibits CYP1A, CYP2B, CYP2E1	
Resveratrol	Pro-oxidant (peroxidase and transition metals)	Inhibits CYP1A1	

Figure 15 : Flavonoïdes et autres composés phénoliques ayant une activité pro-oxydante, une toxicité vis-à-vis des mitochondries et ayant un effet sur les enzymes métabolisant les drogues (Galati and O'Brien, 2004).

De très nombreuses études montrent que les personnes atteintes d'un cancer ont un déficit en antioxydants comparativement aux personnes saines (Pincemail *et al.*, 1999).

3.4. Autres activités des flavonoïdes :

3.4.1. Activité anti-inflammatoire (Harborne and Williams, 2000):

L'inflammation est cliniquement définie comme un processus pathophysiologique caractérisé par des rougeurs, de la fièvre, des œdèmes, de la douleur et une perte de fonctions. Les flavonoïdes possèdent entre autre une capacité anti-inflammatoire. Ceux-ci, sous forme d'extrait brut, ont longtemps été utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise et dans l'industrie cosmétique. De nombreuses investigations ont prouvé que de nombreux flavonoïdes possédaient une capacité anti-inflammatoire sur différents modèles inflammatoires animaux. De nombreux mécanismes d'action cellulaire (Figure 16) ont été proposés *in vivo* pour expliquer cette activité (Kim *et al.*, 2004):

a. L'effet sur PLA₂¹⁶:

L'acide arachidonique (un précurseur des eicosanoïdes¹⁷) est libéré la plupart du temps des membranes cellulaires via la PLA₂, bien qu'une partie soit attribuée à l'action combinée de la phospholipase C et de la lipase diacylglycérol. La quercétine est le premier flavonoïde inhibiteur de PLA₂ trouvé, au niveau des neutrophiles, avec une IC₅₀ allant de 57 à 100 µM. Les flavanones montrent, quant à elles, une inhibition moins forte que les flavonols, indiquant l'importance de la liaison double entre les carbones 2 et 3 du cycle C.

b. L'effet sur COX¹⁸ et LOX¹⁹ :

COX-1 se retrouve dans tous les types cellulaires et permet une cytoprotection des prostaglandines et l'agrégation sanguine. COX-2 est hautement exprimée dans les cellules en relation avec l'inflammation (mastocytes et macrophages), quand celles-ci sont stimulées par des cytokines pro-inflammatoires et/ou par des lipopolysaccharides bactériens. COX-2 permet alors la production de prostaglandines. Les LOXs sont responsables de la production d'hydroxyles d'acides gras et de leucotriènes à partir de l'acide arachidonique. *In vitro*, certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. La myricétine et la quercétine bloquent l'activité des cyclooxygénases et des lipooxygénases à des concentrations relativement

¹⁶ PL A₂ = Phospholipase A₂

¹⁷ Les eicosanoïdes sont des dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone. On y distingue les leucotriènes et les prostaglandines.

¹⁸ COX = Cyclooxygénase. Deux isoformes : COX-1 (enzyme constitutive) et COX-2 (enzyme inductible).

¹⁹ LOX = Lipooxygénase

élevées. A faible concentration, uniquement les lipooxygénases sont inhibées. Les flavones, notamment l'apigénine, sont des inhibiteurs des cyclooxygénases plus forts que les flavonols. L'hespéridine, en administration sous cutanée, présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat (Di Carlo *et al.*, 1999 ; Ghedria, 2005).

c. L'effet sur iNOS²⁰ :

Lorsque les macrophages répondent à des signaux inflammatoires comme les lipopolysaccharides et les interleukines (IL-1 β), la iNOS est induite. Cette NO synthase permet alors la synthèse d'un nouveau médiateur inflammatoire, le NO (monoxyde d'azote). En général, les flavones montrent une plus forte inhibition de la production de NO que les flavonols, suggérant l'importance de la liaison double en position 2,3 du cycle C et l'influence des substitutions hydroxyles des cycles A et B sur l'activité inhibitrice (Kim *et al.*, 2004).

d. L'effet sur la myéloperoxydase :

La myéloperoxydase (MPO) est une hémoprotéine, présente dans les neutrophiles, et jouant un rôle majeur dans la phagocytose en produisant de l'acide hypochloreux via le peroxyde d'hydrogène. La présence de cette enzyme en concentration anormalement élevée dans le plasma, les tissus et les liquides biologiques est un signe d'une activation importante ou excessive des neutrophiles. Depuis quelques années, la MPO est utilisée comme marqueur dans de nombreuses pathologies, notamment celles liées à l'activation des neutrophiles (Serteyn *et al.*, 2003). Le groupe de Pincemil (1988) ont observé une inhibition de l'activité de la myéloperoxydase en présence de flavonoïdes. Ils ont observé une IC₅₀ de $3,5 \pm 1,22 \mu\text{M}$ pour la quercétine et de $10 \mu\text{M}$ pour la rutine, forme glycosylée de la quercétine.

e. L'effet sur la production d'autres molécules pro-inflammatoires :

De nombreuses cytokines sont régulées par les flavonoïdes : TNF α (génistéine, quercétine, lutéoléine) et les interleukines IL-1 β (génistéine et quercétine), IL-6 (apigénine et quercétine), IL-8 (apigénine) (Kim *et al.*, 2004).

²⁰ iNOS = NO Synthase inductible

f. Mécanismes de modulation de l'expression de gènes pro inflammatoires :

Les flavonoïdes peuvent inhiber l'activité enzymatique de divers signaux de transduction incluant la protéine kinase C (PKC), la protéine tyrosine kinase (PTK), les MAPKs, ... (Kim *et al.*, 2004).

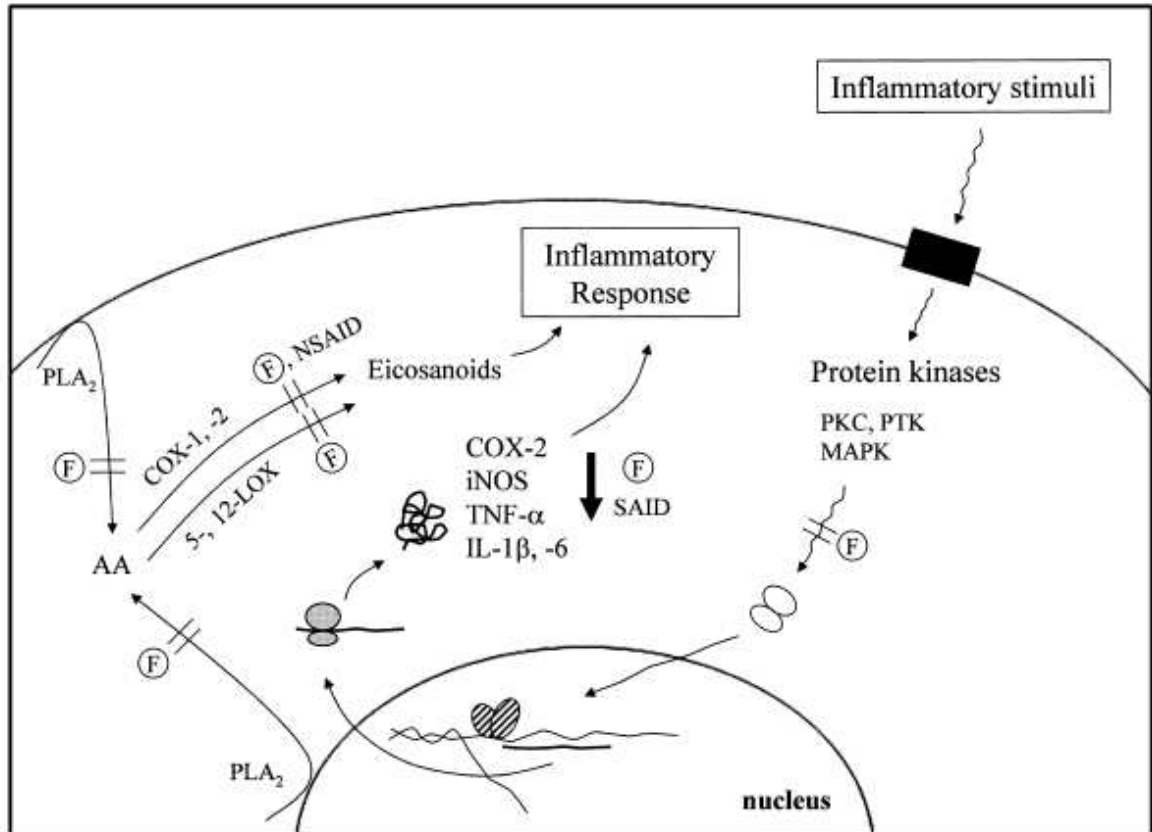


Figure 16: Mécanismes d'action proposés des flavonoïdes sur la réaction inflammatoire. Flavonoïdes (F), drogue anti-inflammatoire non stéroïdienne (NSAID), drogue anti-inflammatoire stéroïdienne (SAID), « = » et « ↓ » montrent l'inhibition enzymatique et la diminution d'expression des gènes, respectivement (Kim *et al.*, 2004).

3.4.2. Autres activités :

▪ **Activité anti-ulcérogène :**

Les flavonoïdes protégeraient la muqueuse gastrique contre les agents ulcérogènes. La quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes via la production de mucus et de ses propriétés antioxydantes (Ghedria, 2005).

- **Activités antimicrobienne et antivirale :**

Les flavonoïdes affecteraient la réplication intracellulaire et/ou atténueraient les propriétés infectieuses de bactéries et virus (Ghedria, 2005).

- **Activité de prévention de la cataracte diabétique :**

Les flavonoïdes préviendraient la cataracte diabétique en inhibant l'aldose réductase. La myricétine possède des propriétés hypoglycémiantes et hypotriglycéridémiantes chez les animaux diabétiques (Ghedria, 2005).

- **Activité anti-ostéoporose :**

L'ostéoporose est une pathologie caractérisée par une densité minérale osseuse relativement faible, surtout chez les femmes âgées. De nombreux nutriments comme la vitamine D, les minéraux et certaines protéines permettent le maintien osseux. Certains flavonoïdes inhiberaient la résorption osseuse ostéoclastique selon des mécanismes encore inconnus (Di Carlo *et al.*, 1999).

- **Activité antiallergique :**

Les flavonoïdes influenceraient la production d'histamine en inhibant les enzymes permettant le relargage de l'histamine au niveau des mastocytes et des basophiles : l'ATPase Ca^{++} dépendante et l'AMP cyclique phosphodiesterase (Di Carlo *et al.*, 1999).

4. Excès de flavonoïdes

Une revue critique des effets toxiques potentiels des flavonoïdes est nécessaire. Malgré les effets bénéfiques des flavonoïdes, plusieurs études indiquent un effet mutagène et génotoxique dans certains systèmes expérimentaux bactériens ou mammifères, effet lié à une activité pro-oxydante. De nombreuses études montrent à l'évidence que les activités biologiques des flavonoïdes sont doubles. Ils peuvent agir en tant qu'antimutagène/pro-mutagène, antioxydant/pro-oxydant. Tout dépend largement des quantités consommées et des conditions physiologiques de l'organisme. Un surdosage peut entraîner des dommages allant jusqu'à des modifications de l'ADN (Skiloba and Smith, 2000).

Certaines études récentes d'intervention chez l'homme montrent que les flavonoïdes, comme la quercétine semblent être antimutagènes *in vivo*. Les flavonoïdes semblent donc être toxiques vis-à-vis des cellules tumorales mais pas ou moins toxiques vis-à-vis des cellules normales (Ghedria, 2005).

Chapitre 3 : Le dysfonctionnement endothélial et le rôle protecteur des flavonoïdes dans les maladies vasculaires

Depuis la découverte de Furchgott et Zawadzki en 1980 sur l'effet de relaxation de l'acétylcholine sur les muscles artériels, de nombreuses études ont montré que l'endothélium n'était pas une simple barrière entre le sang circulant et les couches vasculaires sous-jacentes. Cet endothélium vasculaire est impliqué à la fois dans la régulation physiologique du tonus vasculaire, dans la régulation de l'homéostasie vasculaire et dans les transformations pathologiques. Il occupe donc une place stratégique, localisant idéalement les cellules endothéliales à l'interface sang/tissus et leur permettant ainsi d'affecter à la fois les fonctions des cellules sanguines et celles des cellules constituant la paroi vasculaire. Il est en contact avec divers facteurs circulants (acétylcholine, histamine, cytokines, ...). Au niveau des cellules endothéliales, ces facteurs peuvent moduler la motricité vasculaire, induire la production de facteurs endothéliaux comme le NO et de moduler des processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération ou la migration des cellules endothéliales. L'altération de ces processus physiologiques est souvent la cause du développement de diverses pathologies.

1. L'endothélium, le NO, l'eNOS et leurs propriétés vasorelaxantes

1.1 Le vaisseau sanguin, l'endothélium, les cellules endothéliales et musculaires lisses

La paroi des **vaisseaux sanguins** est tapissée de 3 couches distinctes (Figure 17): l'intima (couche interne), la média (couche moyenne constituée principalement de muscles lisses) et l'adventice (couche externe de tissu conjonctif riche en fibres collagènes). L'intima est constituée d'une fine couche de tissu conjonctif et est recouverte d'une monocouche de cellules épithéliales extrêmement aplaties (0,1-1 μ m) appelées **cellules endothéliales** (ou endothélium). Ces cellules reposent généralement sur une lame basale et sont attachées les unes aux autres par des jonctions adhérentes empêchant la diffusion entre les cellules. Ces cellules occupent ainsi une position stratégique puisqu'elles sont positionnées à l'interface sang-tissus environnant (Stevens and Lowe, 1997), ce qui leur permet d'assurer une surface glissante et ainsi, d'empêcher la coagulation sanguine et de permettre les apports continus de nutriments et d'oxygène dans l'organisme. Les cellules endothéliales jouent donc un rôle

central dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Du fait de leurs situations, les cellules endothéliales assurent trois fonctions principales :

- Le maintien de la régulation de la pression sanguine
- La perméabilité des capillaires artériels filtrant et contrôlant la pénétration des composants sanguins (apports de nutriments mais aussi apports de moyens de défense)
- La régulation des propriétés de vasomotricité par la présence d'agents constricteurs (endothéline, thromboxane A₂, ...) et relaxants (monoxyde d'azote, ...)

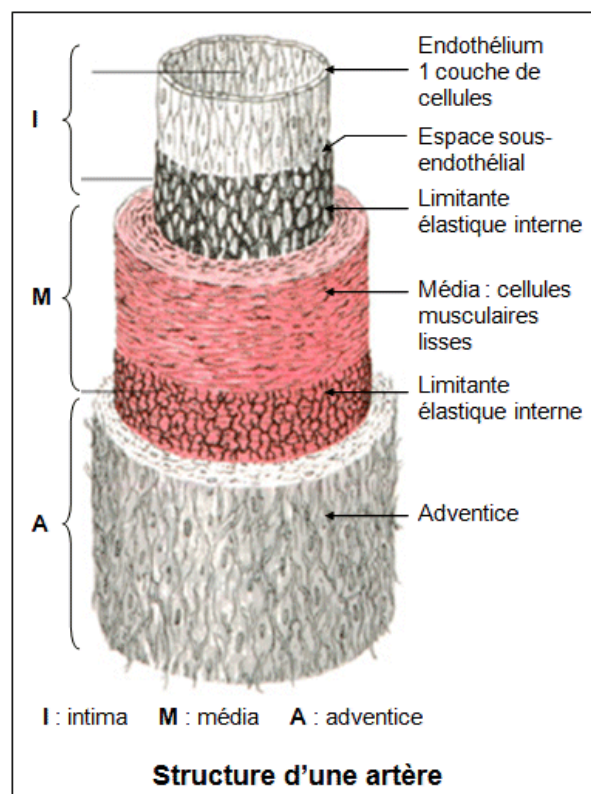


Figure 17: Structure d'une artère.

L'endothélium est un tissu de type épithélial (épithélium simple) situé entre le sang et les tissus. Il se différencie des autres épithéliums parce qu'il dérive du mésoderme et non de l'endoderme ou de l'ectoderme. L'endothélium est donc une couche de revêtement lisse constituée de cellules aplaties dont la face apicale est en contact avec la lumière des vaisseaux sanguins tandis que la face basale est fixée sur une lame basale constituée de collagène et conférant une résistance mécanique aux vaisseaux.

Une des fonctions premières de l'endothélium est de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux tout en servant de barrière semi-perméable permettant le contrôle du transport de petites ou grosses molécules vers l'espace interstitiel (Martin and Andriantsitohaina, 2002 ; Galley and Webster, 2004):

- Le transport de glucose : GLUT-1²¹ et GLUT-4²² sont exprimées au niveau des cellules endothéliales. La régulation d'expression de GLUT-4 est un processus essentiel de la modulation du transport de glucose.
- Transport d'acides aminés (L-arginine)
- Caveoline-1²³

Une autre fonction est le contrôle de la coagulation sanguine en inhibant l'agrégation des thrombocytes²⁴. Le principal mécanisme par lequel les cellules endothéliales exercent leur effet anticoagulant est dû à l'inhibition électrostatique de l'attachement de cellules circulantes à la paroi vasculaire, en raison de la forte charge négative présente à la surface. Cette charge négative empêche l'adhésion plaquettaire, l'attachement des cellules circulantes (monocytes et granulocytes). Cette inhibition est due à de fortes concentrations en héparane sulfate sous forme de protéoglycanes à la surface des cellules endothéliales ainsi qu'à la capacité de l'héparine à lier l'antithrombine²⁵. La synthèse de NO et de prostacyclines²⁶ est aussi un facteur important dans l'établissement de la capacité anticoagulante de l'endothélium puisque ces deux molécules ont des propriétés inhibitrices de l'adhésion plaquettaire (Martin and Andriantsitohaina, 2002 ; Hayoz and Silacci, 2006). L'endothélium participe également au contrôle de la vasomotricité²⁷. Ces cellules sont capables de provoquer une vasoconstriction ou une vasodilatation des vaisseaux suivant les conditions. Elles produisent ainsi un des agents vasodilatateurs des plus importants, le NO, à partir de la L-arginine via la NO synthase endothéliale (eNOS) localisée principalement dans l'appareil de Golgi et dans les

²¹ GLUT-1 : transporteur spécifique du glucose, localisé abondamment dans les membranes des érythrocytes, et plus faiblement dans les cellules endothéliales.

²² GLUT-4 : transporteur insulino-dépendant du glucose, localisé dans les tissus adipeux et les muscles striés.

²³ Caveoline-1 : protéine responsable de la formation des invaginations de la membrane plasmique de certains types cellulaires, riche en cholestérol et glycolipides, en divers récepteurs et protéines de signalisations.

²⁴ Thrombocyte ou plaquette est un élément figuré du sang, formé dans la moelle osseuse, mais qui se fragmente immédiatement en petits éléments. Les thrombocytes ne sont donc en fait pas des cellules complètes mais uniquement de petits fragments dépourvus de noyau.

²⁵ Antithrombine : facteur d'inhibition de la coagulation

²⁶ Prostacycline est une molécule synthétisée au niveau de l'endothélium par une cyclooxygénase et une PGP2 synthase.

²⁷ Vasomotricité : stimulation des vaisseaux par des agents vasoactifs libérés ou interagissant avec l'endothélium vasculaire (Anderson, 2003).

invaginations membranaires (caveolae). L'enzyme est activée par des stimuli comme des forces de cisaillement, l'augmentation de lysophosphatidycholine²⁸ ou encore lors de traitements pharmacologiques. L'activation de l'eNOS provoque sa délocalisation dans le cytosol et une série de phosphorylations sur celle-ci va rendre possible son interaction avec la calmoduline. Le taux de NO dépend de la biodisponibilité des substrats et cofacteurs nécessaires à son action catalytique. Le retour à l'état inactif et son retour dans les cavéoles dépendent de l'acylation de la protéine par les acides gras myristique et palmitique.

L'endothélium produit également d'autres facteurs vasodilatants et contractants (Lebranchu, 2000 ; Cosentino and Luscher, 2002 ; Martin and Andriantsitohaina, 2002 ; Hayoz and Silacci, 2006) :

- le facteur endothélial hyperpolarisant ou EDHF stimulant l'ouverture des canaux potassiques dans les cellules musculaires lisses, ce qui entraîne une hyperpolarisation et leur relaxation,
- la prostacycline PGI₂ qui permet une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc et facilite la libération de NO endothélial,
- les facteurs vasoconstricteurs : prostaglandine H₂, l'angiotensine II, le thromboxane A₂, l'endothéline 1.

En conclusion, l'endothélium agit également comme un senseur et un modulateur des vaisseaux (Anderson, 2003). En conditions physiologiques, il joue un rôle protecteur en prévenant l'adhésion des cellules sanguines circulantes (plaquettes et monocytes), il maintient les vaisseaux dans un état de vasodilatation et inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses dans les vaisseaux.

1.2 Le NO

Une des premières observations d'une relaxation dépendante de l'endothélium a permis de mettre en évidence un facteur, l'EDRF (Endothelium-Dependent Relaxation Factor), en 1980 (Furchgott and Zawadzki, 1980). C'est seulement en 1988, après de nombreuses études sur ce facteur, qu'il s'est avéré que ce composé était le monoxyde d'azote. Cette découverte fut récompensée par un prix Nobel en 1998 décerné au Professeur Robert F. Furchgott pour la mise en évidence de la production d'une substance ayant un effet vasodilatateur, l'EDRF ; au

²⁸ Lysophosphatidycholine : classe de composés chimiques dérivant de l'hydrolyse des phosphatidycholines par la phospholipase A₂.

Professeur Louis J. Ignarro (Ignarro *et al.*, 1987) pour avoir démontré que l'EDRF était le monoxyde d'azote et au professeur Ferid Murad (Murad *et al.*, 1992) pour avoir établi que l'enzyme cytosolique guanylate cyclase (GC) est une cible du NO dans le système cardiovasculaire.

Cette molécule est hydro et liposoluble, ce qui lui permet d'agir à l'intérieur ainsi qu'à l'extérieur des cellules, lui conférant ainsi un large spectre d'actions. Le NO est une molécule de faible poids moléculaire et très lipophile du fait de sa charge nulle, ce qui lui permet de diffuser rapidement au travers des parois cellulaires. En solution aqueuse aérobie, il est rapidement converti en nitrites et nitrates. Le NO est produit entre autre par les cellules endothéliales et musculaires, les macrophages, le foie et le cerveau. Le NO est synthétisé à partir de l'acide aminé précurseur L-arginine dans une réaction en cinq étapes. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la NO synthase (NOS) et exige la présence de cofacteurs : O₂, NADPH²⁹, FAD³⁰ et le BH₄³¹. La production continue de NO par l'isoforme eNOS aide à maintenir un tonus vasculaire physiologique. Cependant, des agonistes comme l'acétylcholine et l'insuline peuvent augmenter la production de NO pour moduler ce tonus vasculaire. D'autre part, certains agents pharmacologiques sont des donneurs de NO et peuvent ainsi stimuler directement la guanylate cyclase soluble sans activer l'eNOS mais produire le GMPc et induire ainsi une vasorelaxation indépendante de l'endothélium (Figure 18).

²⁹ NADPH : β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit

³⁰ FAD : flavine adénine dinucléotide

³¹ BH₄ : tétrahydrobioptérine, molécule impliquée dans les hydroxylations aromatiques

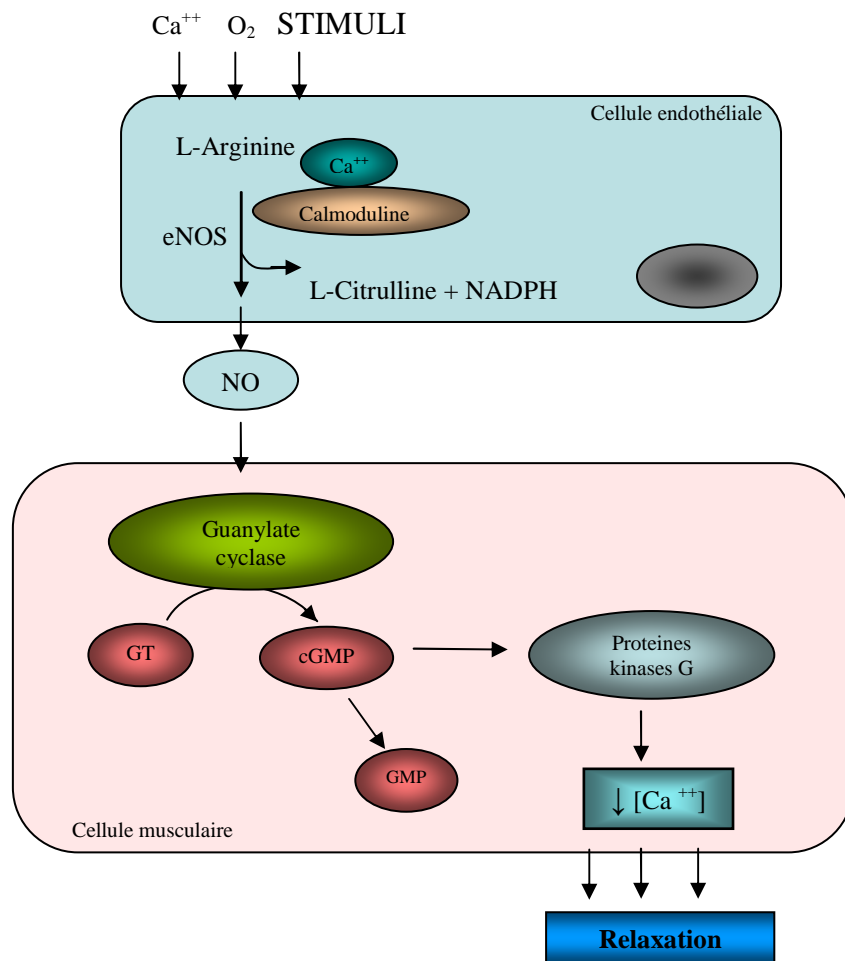


Figure 18: La production de NO par l'intermédiaire des NOS active la guanylate cyclase pour former le GTP à partir cGMP, qui active alternativement les protéines kinases G dépendantes du cGMP. Ces protéines kinases agissent au niveau de la conductibilité, des canaux K^+/Ca^{++} pour favoriser la relaxation des muscles lisses (Galley and Webster, 2004 ; Zago and Zanesco, 2006, modifié).

Le NO produit par les cellules endothéliales diffuse sous forme gazeuse vers les cellules musculaires lisses vasculaires, active différentes cibles intracellulaires comme la guanylate cyclase soluble permettant la production de GMPc qui induit le phénomène de relaxation vasculaire (Martin and Andriantsitohaina, 2002). Les cellules musculaires lisses sont pourvues d'une certaine plasticité leur permettant de passer d'un état différencié à un état dédifférencié dépendant de stimuli humoraux ou mécaniques. Dans une artère normale, la majorité des cellules se trouve dans un état différencié caractérisé par l'expression de certaines protéines comme les SM-MHC-1 et 2 (smooth muscle myosin heavychain). Ces cellules ont un taux de prolifération assez faible. En situation pathologique, le taux de prolifération augmente étant donné que les cellules musculaires lisses dédifférenciées sont

majoritaires. Le NO, outre son rôle vasodilatateur, inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses (Hayoz and Silacci, 2006).

Le NO peut se trouver sous forme neutre (1 électron célibataire), sous forme d'anion ou de cation. Il peut donc agir en tant que réducteur ou oxydant (Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998). C'est un facteur prédominant anti-athérogénique au niveau vasculaire grâce à ses nombreuses actions vasoprotectrices (Schmitt and Dirsch, 2009), sans compter les actions déjà citées précédemment:

- Le NO exerce également un effet inhibiteur sur les facteurs endothéliaux vasoconstricteurs (ET-1).
- Il interfère aussi dans les phénomènes d'adhésion des leucocytes et des monocytes, d'agrégation des plaquettes et dans l'expression de molécules pro-inflammatoires (VCAM-1³² et MCP-1³³).
- Il diminue aussi la perméabilité endothéliale.
- Il agit aussi comme inhibiteur endogène du TNF α ³⁴ et inhibe l'oxydation des LDL.

La diminution du NO biodisponible dans le système cardiovasculaire est associée aux maladies cardiovasculaires et au vieillissement.

1.3 Les NO synthases

La NO synthase (NOS) est une enzyme eucaryote utilisant la L-arginine comme substrat pour la production du radical libre NO (monoxyde d'azote) et la L-citrulline comme co-produit (Lopez-Figueroza *et al.*, 2001). On distingue trois types d'isoenzymes NOS : l'isoenzyme de type I (NOS 1 ou nNOS), présente dans les neurones et les cellules épithéliales, l'isoenzyme de type II (NOS 2 ou iNOS), présente dans différents types cellulaires, dont les macrophages, après induction par les cytokines, et l'isoenzyme de type III (NOS 3 ou eNOS), présente essentiellement dans les cellules endothéliales (Figure 19).

³² VCAM-1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires de type 1. Elle permet l'adhésion des lymphocytes, monocytes, basophiles et éosinophiles à l'endothélium vasculaire

³³ MCP-1 (M VCAM-1) : molécule d'adhésion des cellules vasculaires de type 1. Elle permet l'adhésion des lymphocytes, monocytes, basophiles et éosinophiles à l'endothélium vasculaire

³⁴ TNF α : le facteur de nécrose tumorale alpha est une cytokine impliquée dans le processus d'inflammation systémique et dans la réaction de la phase aigüe.

	nNOS (I)	iNOS (II)	eNOS (III)
Type	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation cellulaire	Cytosol	Cytosol	Cytosol, Membrane Mitochondrie
Masse Moléculaire (kDa)	160	130	135
Localisation sur génome humain	Chromosome 12 12q24	Chromosome 17 17q11.2	Chromosome 7 7q35-36
Activation	Augmentation [Ca ⁺⁺]	Stimulation par cytokines et/ou endotoxines	Augmentation [Ca ⁺⁺]

Figure 19: Caractéristiques des trois isoformes de NO-synthase humaine (Marletta, 1993 ; Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998 ; Schmitt and Dirsch, 2009).

Les trois isoformes ont 60% d'identité au niveau de la structure primaire. Elles sont constituées de deux monomères identiques possédant un domaine oxydase N-terminal comprenant les sites de liaisons pour la L-arginine, le cofacteur BH₄ et le résidu hémique, et le domaine réductase C-terminal comprenant les sites de liaisons pour les cofacteurs NADPH, FAD et FMN. Les deux domaines sont reliés entre eux par un pont contenant un site de fixation de la calmoduline (Figure 20).

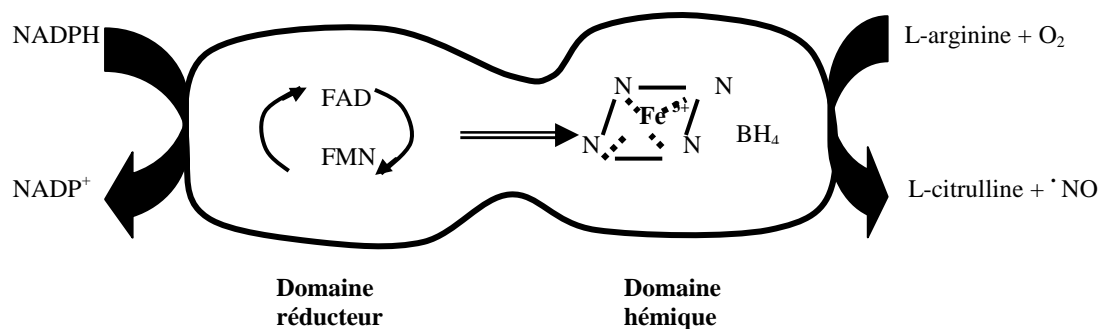


Figure 20: Vue schématique des NOS (Marletta, 1993).

Les isoenzymes de type I et III ne produisent que très peu de NO sauf en cas d'activation des récepteurs par une augmentation de Ca⁺⁺ intracellulaire, qui permet alors une production plus importante, immédiate et de courte durée de NO (Marletta, 1993). L'activation transcriptionnelle de l'isoenzyme de type II, quant à elle, produit une quantité non négligeable de NO, indépendamment de la concentration intracellulaire en Ca⁺⁺.

La formation de NO et de citrulline, catalysée par les NOS implique pour l'atome d'azote concerné de la L-citrulline, un changement de degré d'oxydation de $-III$ à $+II$. Ce genre de catalyse est inhabituel pour une oxygénase. La découverte d'un intermédiaire, la N^w -hydroxy-L-arginine (NOHLA) simplifie le phénomène (Marin and Rodriguez-Martinez, 1997 ; Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998) (Figure 21).

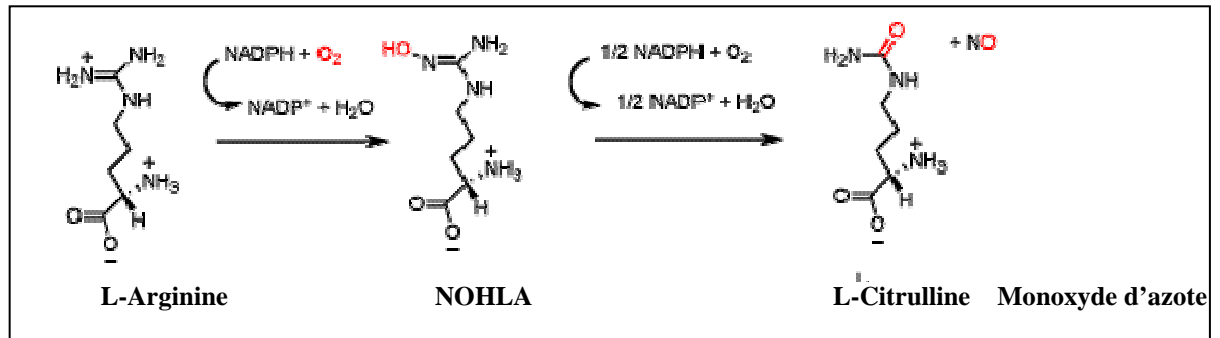


Figure 21: Synthèse de NO et de L-citrulline par l'eNOS à partir de la L-arginine (Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998 modifié).

Les principaux déterminants de l'expression de l'eNOS sont la méthylation du promoteur et la déacétylation des protéines kinases histones associées. Le temps de demi-vie de l'ARNm *eNOS* est de 10 à 35 heures. Un des principaux mécanismes de régulation de l'activité de l'eNOS est la phosphorylation. Ce mécanisme implique diverses kinases et phosphatases. Six sites de phosphorylations sont connus à ce jour (Schmitt and Dirsch, 2009 ; Kolluru *et al.*, 2010):

- Ser¹¹⁷⁷, le plus important site de régulation positive. Cette sérine est phosphorylée en réponse à la plupart des stimuli d'activation de l'eNOS, ce qui conduit à une augmentation du flux d'électrons. Cette phosphorylation est catalysée par l'Akt³⁵ et d'autres kinases.
- Thr⁴⁹⁵, le site majeur de régulation négative. Cette thyrosine est constitutivement phosphorylée dans les cellules endothéliales en culture. La phosphorylation atténue l'activité de l'eNOS en interférant avec la liaison avec la calmoduline. Elle est rapidement déphosphorylée par des agonistes, principalement ceux qui provoquent une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{++} .
- Ser⁶³³ pour la maintenance de la synthèse du NO après activation de l'eNOS au niveau de la Ser¹¹⁷⁷

³⁵ Akt : Enzymes appartenant à la famille des protéines kinases et impliquées dans la signalisation cellulaire, principalement dans la survie cellulaire en inhibant les processus apoptotiques.

- Ser¹¹⁷⁹ phosphorylée par la CaM kinase II
- Ser⁶¹⁵ et ¹¹⁴ (mécanismes encore incompris)

D'autres mécanismes de régulation existent : la déacétylation de la Lys⁴⁹⁵ et de la Lys⁵⁰⁶ par la SIRT 1³⁶ peut augmenter l'activation de l'eNOS. La S-nitrosylation de l'eNOS conduit à une inhibition catalytique et une redistribution sub-cellulaire de celle-ci. Les interactions protéine-protéine jouent également un rôle important dans la régulation de la production endothéliale du NO :

- Calmoduline : la liaison à la calmoduline augmente le flux d'électrons avec l'enzyme
- Hsp 90 augmente l'affinité eNOS-calmoduline
- eNOS co-localise avec les protéines du cytosquelette et CAT-1 pour la captation de la L-arginine.

Dans le système cardiovasculaire, l'eNOS est inhibée par le L-NAME³⁷. Celui-ci inhibe également le relâchement du NO par les cellules endothéliales et les tissus vasculaires. L'activité de l'eNOS est étroitement régulée au niveau enzymatique par la biodisponibilité du substrat et des cofacteurs, par les interactions protéine-protéine, par la (de)phosphorylation et par la distribution cellulaire. Les maladies cardiovasculaires sont associées avec une diminution de la biodisponibilité du NO et une sur-régulation des fonctions endothéliales (Schmitt and Dirsch, 2009).

1.4 Propriétés de vasorelaxation du NO

Les effets du NO dans l'organisme sont multiples. Il est impliqué dans de nombreux processus très différents : processus inflammatoires, neurotransmission et régulation du tonus vasculaire. Dans ce dernier cas, il agit comme un puissant agent vasodilatateur faisant intervenir de nombreuses voies métaboliques. De plus, il possède une grande affinité pour le fer et il peut moduler l'activité de diverses enzymes contenant du fer (Wink and Mitchell, 1998). :

- L'activation de la guanylate cyclase soluble (enzyme hémique) (déjà été mentionné plus haut). Le GMPc produit module l'activité de diverses kinases et favorise la sortie de K⁺ et Ca⁺⁺, conduisant à une hyperpolarisation de la membrane cytoplasmique.

³⁶ SIRT 1 : (silent information regulation 2 1 est une enzyme déacétylant les protéines contribuant à la régulation cellulaire.

³⁷ L-NAME : agent vasoconstricteur dépendant de l'endothélium

Cette hyperpolarisation a pour conséquences : une relaxation des fibres musculaires (vasodilatation), une bronchodilatation, un relâchement de l'intestin après un repas pour l'adapter à son contenu, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion de plaquettes à l'endothélium.

- L'inhibition des enzymes non hémiques contenant un atome de fer lié à des atomes de soufre (ribonucléase réductase, NADPH-ubiquinone-oxydoréductase, succinate-ubiquinone-oxydoréductase)
- L'intervention dans le métabolisme intracellulaire du fer. Un excès de NO se comporte comme une déficience intracytoplasmique de fer. Il stimule donc une biosynthèse des récepteurs de la transferrine³⁸ et inhibe celle de la ferritine³⁹ et de l'ALA synthase⁴⁰(Anémie)
- L'interaction avec d'autres molécules comme l'hémoglobine,
- L'ouverture des canaux ATP-dépendant conduisant à une hyperpolarisation cellulaire
- La diminution du Ca⁺⁺ intracellulaire via l'inhibition de canaux calciques associés à une réduction de la libération de Ca⁺⁺ par le réticulum endoplasmique
- L'inhibition de la phospholipase C
- La phosphorylation de protéines accélérant la relaxation et l'inhibition de la kinase Rho⁴¹

Le mécanisme de production du NO a été décrit par Sennequier et Vadon Le Goff (1998). Une variété de stimuli comme l'acétylcholine, l'acide arachidonique, la thrombine et les stimulations électriques sont capables de libérer le NO des cellules endothéliales. Ces substances vasodilatatrices comme l'acétylcholine viennent se fixer sur des récepteurs à la surface de l'endothélium. Cette reconnaissance va permettre l'entrée des ions calciques entraînant ainsi l'association Ca⁺⁺/calmoduline/eNOS. Le NO libéré va ensuite activer la guanylate cyclase qui synthétise le GMPc au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. La hausse de GMPc entraîne une activation de la protéine kinase G responsable de la phosphorylation du phospholambane⁴². Ce dernier favorise le recaptage du Ca⁺⁺ par les

³⁸ Transferrine : Béta-globuline permettant le transport de fer de l'intestin vers les réserves hépatiques.

³⁹ Ferritine : protéine permettant le stockage de fer. Elle régule également les besoins en fer de l'organisme.

⁴⁰ ALA synthase= 5'-aminolévulinate : enzyme jouant un rôle dans la formation des hèmes comme l'hémoglobine.

⁴¹ Rho : protéine intervenant dans la contraction musculaire.

⁴² Phospholambane : protéine de la membrane du réticulum sarcoplasmique exerçant un effet inhibiteur sur les pompes à Ca⁺⁺ SERCAs.

SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{++} -ATPase) et donc la relaxation (Marin and Rodriguez-Martinez, 1997 ; Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998). La formation de GMPc permet donc l'activation des pompes à Ca^{++} au niveau des cellules musculaires lisses, entraînant une diminution intracellulaire de la concentration en Ca^{++} et une diminution du tonus vasculaire. D'autres mécanismes par lesquels la voie du NO/GMPc peut induire une vasodilatation sont les suivants (Zago and Zanesco, 2006):

- Inhibition de la production d'IP3⁴³ dans les cellules musculaires lisses
- La déphosphorylation des chaînes légères de myosine
- L'inhibition du flux de Ca^{++}
- La stimulation de la Ca^{++} -ATPase et l'ouverture des canaux potassiques

Les ions Ca^{++} ont donc un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire. La production de NO au niveau vasculaire peut servir comme marqueur de maladies cardiovasculaires. En absence de L-arginine ou de BH₄, les NOS synthétisent l' O_2^- en préférence au NO : « eNOS uncoupling ». Ce taux faible en BH₄ peut également servir comme marqueur du dysfonctionnement endothélial (Schmitt and Dirsch, 2009).

⁴³ IP3 = inositol 1,4,5-triphosphate : second messenger produit par l'hydrolyse du phospholipide PIP2.

2. Le stress oxydant et son rôle dans le dysfonctionnement endothélial

Le dysfonctionnement endothélial est caractérisé par une diminution de la capacité des cellules endothéliales à supprimer les processus d'inflammation, de thrombose, du stress oxydant, et se traduit donc en une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Schmitt and Dirsch, 2009).

Le terme «dysfonctionnement endothélial» est utilisé en référence à de nombreuses conditions pathologiques, incluant l'altération de la coagulation, les propriétés anti-inflammatoires de l'endothélium, le changement dans la modulation de la croissance vasculaire et la dérégulation de la tonicité vasculaire. Dans la plupart des études *in vitro* et *in vivo*, ce terme se réfère à une perte de NO bioactif dans les vaisseaux. Une perte de l'activité biologique et/ou de l'altération de la production de NO peut avoir plusieurs conséquences conduisant au développement de diverses pathologies (Martin and Andriantsitohaina, 2002) :

- La transformation de l'endothélium de surface anticoagulant en surface pro-coagulante puisque le NO n'exerce plus ces effets antiplaquettaires, et n'inhibe plus l'expression de récepteurs tels que ICAM-1⁴⁴ et VCAM-1. Donc, il y a adhésion des plaquettes et des monocytes.
- L'augmentation de la perméabilité de l'endothélium facilitant la pénétration et le dépôt des lipides, monocytes et cellules musculaires lisses dans l'intima et donc le développement de lésions vasculaires comme l'athérosclérose.
- La prolifération des cellules musculaires lisses avec épaissement de la paroi vasculaire et donc le développement de pathologies vasculaires occlusives.
- L'altération du relâchement dépendant de l'endothélium.

Cette perte d'activité peut être due à des altérations de la transduction du signal dans les cellules endothéliales, à une diminution de la biodisponibilité de la L-arginine et/ou des cofacteurs de l'eNOS, à une modification de l'expression de l'eNOS ou encore à une augmentation de la destruction du NO par les ERO. Le traitement des pathologies liées à une altération de la voie du NO vise aujourd'hui à restaurer une production physiologique du NO (Martin and Andriantsitohaina, 2002). Mais à l'heure actuelle, il est communément admis que l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium est associée à une augmentation de

⁴⁴ ICAM-1 : molécule intracellulaire d'adhérence, présente dans les leucocytes et les cellules endothéliales

la dégradation du NO par les ERO dans plusieurs modèles animaux de diverses pathologies (hypertension, diabète, maladies cardiaques, ...), mais aussi chez l'homme : la vitamine C augmente la vasodilatation chez les patients atteints de ces mêmes pathologies (Cai and Harrison , 2000).

Dans les cellules de mammifères, plusieurs sources enzymatiques de production de ERO existent, dont les plus étudiées sont la xanthine oxydase et la NADH/NADPH oxydase. La plupart de ces sources sont potentiellement capables de produire des ERO pouvant inactiver le NO (Cai and Harrison, 2000). En conditions physiologiques, les radicaux libres sont produits en faible quantité au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. En cas de surproduction, ces ERO échappent aux systèmes de défense et peuvent donc interagir avec le NO pour former le peroxynitrite, très toxique, et réduire ainsi la quantité de NO biodisponible. Ces radicaux libres agissent aussi de manière directe en stimulant des métalloprotéases, stimulant l'activité des molécules d'adhésion, en oxydant les LDL, et perturbant ainsi l'équilibre endothélial.

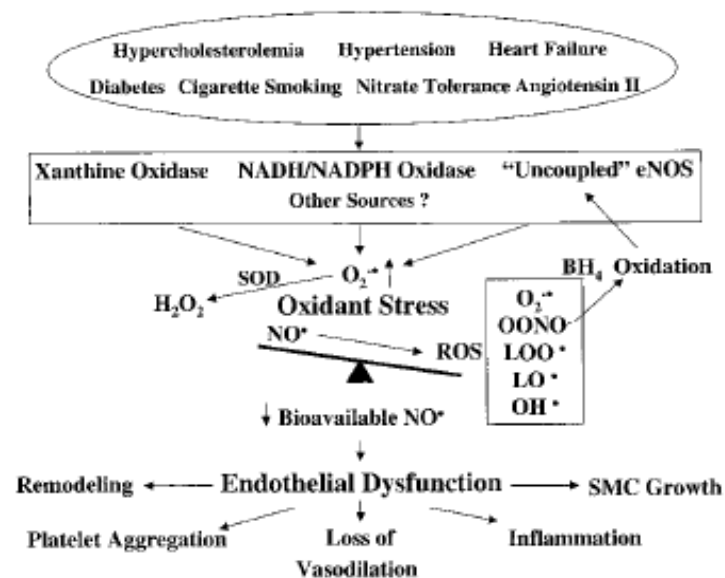


Figure 22: Mécanismes du dysfonctionnement endothélial induit par un stress oxydant dans les maladies vasculaires (Cai and Harrison, 2000).

Les processus d'activation des NO synthases sont accompagnés de l'activation et /ou de l'induction d'autres enzymes produisant des radicaux dérivés de l'oxygène. Le peroxynitrite, combinaison entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde, est un produit cytotoxique très réactif impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives. Il induit l'oxydation et

la nitration de molécules d'intérêts biologiques les affectant dans leurs fonctions : thiols et centres de métaux lourds. Une autre activité des peroxinitrites est d'initier la peroxydation lipidique (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998).

La présence d'un dysfonctionnement endothélial a été démontrée dans diverses pathologies vasculaires : risques coronariens, risques cardiovasculaires (hypertension, hypercholestérolémie, tabagisme, ...). Le manque de NO disponible peut être à l'origine de nombreuses pathologies (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998) dont la principale est l'athérosclérose d'où découle de nombreuses autres pathologies du système circulatoire (Cosentino and Luscher, 2002): L'athérosclérose est une affection très courante qui se caractérise par l'accumulation d'une substance grasseuse sur et dans la paroi artérielle qui s'épaissit et perd de son élasticité. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire dont l'événement précurseur est le dysfonctionnement de l'endothélium. Dans le développement de cette pathologie, l'oxydation des lipoprotéines à basse densité (LDL) est un événement important mais d'autres acteurs sont aussi importants : les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes.

La première étape du développement de l'athérosclérose est l'accumulation de LDL dans l'intima des artères et l'oxydation de ces lipoprotéines. Les LDL oxydées déclenchent une cascade d'événements pro-athérogéniques. La deuxième étape implique les monocytes circulants adhérant à la surface de l'endothélium via l'activation de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM-1). Après leur adhésion, les monocytes sont transformés en macrophages dans l'espace sous-endothélial. Ce processus de transformation est rendu possible grâce à la protéine monocytaire chimiotactique 1 (MCP-1)⁴⁵ et le facteur de stimulation des colonies (M-CSF)⁴⁶. Dans la paroi artérielle, ces macrophages produisent alors de nombreux facteurs pro inflammatoires (TNF- α , IL-1, ...), entraînant ainsi une réaction inflammatoire chronique. Ces cytokines augmentent l'activation endothéliale en stimulant le recrutement de monocytes au niveau de l'endothélium et leur transformation. Cette étape se caractérise par la formation d'une plaque, la plaque d'athérome. Une partie des monocytes ne se transforme pas en macrophages mais en cellules spumeuses en captant les LDL oxydées, via des récepteurs

⁴⁵ MCP-1 : Cette protéine permet le passage des monocytes entre les cellules endothéliales.

⁴⁶ M-CSF : Ce facteur permet la différenciation des monocytes en macrophages et leur prolifération.

« scavengers ». A ce stade, les lipides de la plaque se regroupent pour former un cœur lipidique appelé « centre athéromateux ». S'ensuit la formation d'une chape fibromusculaire composée de cellules musculaires lisses provenant de la media et de protéines de matrice (collagène, élastine et protéoglycanes) qui isole le centre athéromateux de la lumière artérielle. L'évolution de cette plaque peut conduire à sa rupture ou son érosion, les plaques les plus vulnérables étant celles qui possèdent un gros centre lipidique et une chape fibreuse fine. Cette érosion ou rupture est le point de départ de l'évolution thrombotique, dont l'importance est toutefois variable en fonction de la taille des vaisseaux atteints, ... (Marin and Rodriguez-Martinez, 1997 ; Cosentino and Luscher, 2002 ; Kris-Etherton *et al.*, 2004).

Le NO produit par les cellules endothéliales a donc un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose (Zago and Zanesco, 2006):

- par l'inhibition de l'oxydation des LDL oxydées : par son action antioxydante en prévenant la formation d'anions superoxydes ;
- par la prévention de l'agrégation des plaquettes : via le couplage NO/GC soluble pour produire le GMPc qui induit la réduction du Ca^{++} intracellulaire.

D'autres pathologies sont aussi liées à un manque de NO :

- Hypertension artérielle (Marin and Rodriguez-Martinez, 1997) : Elle est caractérisée par des altérations morphologiques des vaisseaux au niveau de l'endothélium et de l'intima. Les anomalies des cellules endothéliales sont considérées comme un facteur important responsable de l'augmentation de la pression artérielle. Plus cette pression est élevée, plus le risque de maladies cardiovasculaires est important.
- Angine de poitrine : C'est la forme la plus classique et la plus fréquente de l'insuffisance coronaire. Celle-ci témoigne presque toujours d'une athérosclérose au niveau des artères coronaires. Elle est définie comme une répétition de douleurs angineuses survenant essentiellement à l'effort, dues à un manque d'oxygène.
- L'hypercholestérolémie est associée à une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium même si le vaisseau n'a pas d'aspect morphologique anormal (Lebranchu, 2000).

- Le diabète de type II est souvent associé à une réduction de NO disponible due à une augmentation de sa destruction par les ERO, une diminution de l'activité de la guanylate cyclase soluble mais aussi due à une augmentation du métabolisme du GMPc et une diminution de l'activité des protéines kinases (Marin and Rodriguez-Martinez, 1997), ...

Il existe également des pathologies liées non pas à un manque de NO mais à un excès de NO. Ces pathologies font souvent référence à une surexpression des NO synthases inductible et neuronale :

- Ischémie cérébrale : Principalement due à une surproduction de NO par la nNOS sous l'effet de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Deplanque, 2003).
- Maladies neurodégénératives : une des premières causes de la maladie d'Alzheimer serait le relargage de NO par les microglies en réponse aux dépôts anormaux de peptides amyloïdes β (PA β) (Goodwin *et al.*, 1995).
- Choc septique : il est accompagné d'une augmentation de la concentration de NO dans le sang, NO produit par l'iNOS en réponse à l'invasion microbienne induisant le choc septique.
- Diabète de type II : Des chercheurs ont montré que l'obésité induite par un régime riche en graisses provoque la production de cytokines par les cellules adipeuses qui, à leur tour, stimulent l'expression de l'iNOS. Cette quantité anormale de NO entrave l'action de l'insuline empêchant le glucose de pénétrer à l'intérieur des muscles. Une résistance à l'insuline se met donc en place.
- Maladies inflammatoires : Lors de processus inflammatoires, l'iNOS des cellules inflammatoires produit du NO et des ERO.

Dans ce type de pathologies liées à un manque de NO, une proportion importante du NO serait consommé par les ERO ou les LDL oxydées, laissant moins de NO disponible pour protéger les LDL nouvellement internalisées dans l'intima.

Etant donné les divers effets physiologiques du NO dans l'organisme, de nombreuses approches thérapeutiques ont été développées se basant sur les mécanismes d'actions du NO :

- Inhalation de NO pour améliorer l'oxygénation artérielle par vasodilatation
- Utilisation des « NO-mimétiques » pour augmenter la concentration du NO :
 - L'arginine, précurseur du NO, pour permettre une augmentation de la biosynthèse du NO
 - L'apport exogène de NO grâce à des médicaments susceptibles de libérer du NO dans l'organisme : Nitroprussiate de sodium⁴⁷, molsidomine⁴⁸, la linsidomine⁴⁹ et les dérivés nitrés (la trinitrine, le tétra nitrate, ...).
- Les inhibiteurs de la voie du NO :
 - Inhibition des NOS : N-nitro-L-arginine (non sélective), L-nitro-arginine méthyle ester (L-NAME pour l'eNOS), l'aminoguanidine (pour l'iNOS) et le 7-nitroindazole (pour la nNOS).
 - Les piègeurs de NO

⁴⁷ Le nitroprussiate de sodium se décompose en NO au niveau des érythrocytes et des tissus en présence de réducteurs comportant une fonction thiols.

⁴⁸ La molsidomine est métabolisée au niveau du foie et libère spontanément du NO.

⁴⁹ La linsidomine est un coronodilatateur.

3. L'effet protecteur des flavonoïdes sur les pathologies vasculaires

La prévention des maladies athérotrombotiques relatives au mode de vie est d'une importance capitale, sociale et urgente dans les populations des pays développés (Gosh and Scheepens, 2009). Une large gamme de produits naturels et d'extraits végétaux peuvent augmenter la production endothéliale de NO (*in vitro* et *in vivo*) (Figure 23).

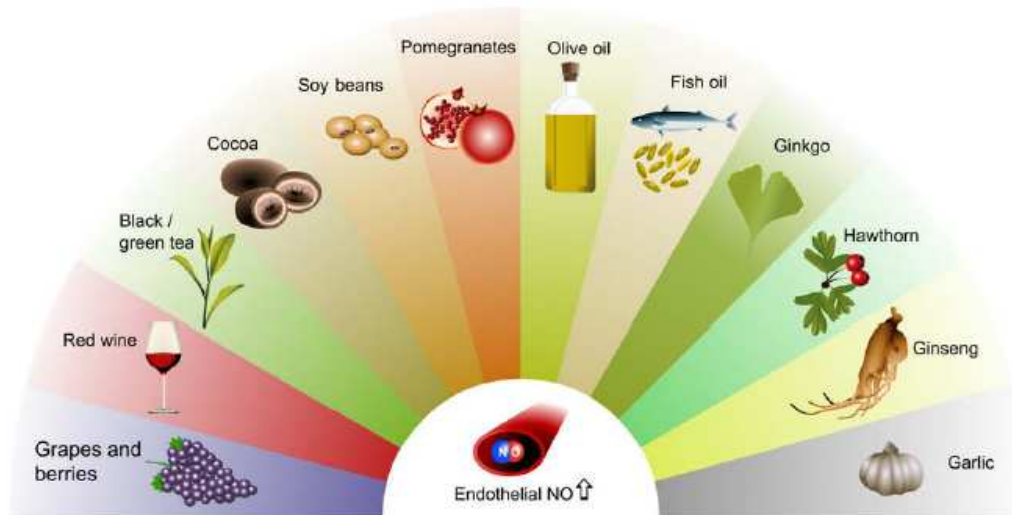


Figure 23: Produits alimentaires riches en flavonoïdes et autres molécules antioxydantes permettant une augmentation du NO disponible (Schmitt and Dirsch, 2009).

La plupart des polyphénols, dont les flavonoïdes, sont de puissants protecteurs du système cardiovasculaire. Ce pouvoir n'est pas uniquement lié à leur effet sur les macromolécules (ex : LDL) ou sur les cellules circulantes mais surtout à leur capacité d'agir directement sur l'endothélium vasculaire (Andriambeloson *et al.*, 1997 ; Aldini *et al.*, 2003).

Des phytonutriments ont déjà montré des effets cérébro-vasculaires : cacao, vin, raisin, baies, thé, tomates, grenade et soja. Les baies sont une source importante de polyphénols, en particulier des flavonols et des anthocyanes. Les anthocyanes sont rapidement absorbées au travers du tractus intestinal vers le plasma après une administration orale mais ne s'accumulent pas dans le plasma. Shin *et al.* (2006) ont démontré qu'un prétraitement avec des doses élevées en anthocyanes (300mg/Kg) peut prévenir la mort des cellules neuronales chez les rats ayant subi une ischémie cérébrale (Gosh and Scheepens, 2009).

Au niveau de la vasomotricité, de nombreuses investigations sur artères isolées (aortes de rats/lapins ; artères coronaires humaines ou porcines) ont montré une amélioration de la

vasodilatation des vaisseaux en présence de flavonoïdes sous forme d'extraits ou de préparations végétales (Figure 24). Des études réalisées sur le vin rouge (Andriambelason *et al.*, 1997, 1998 ; Flesch *et al.*, 1998 ; Diebolt *et al.*, 2001 ; Ndiaye *et al.*, 2003, Zenebe *et al.*, 2003 ; Benito *et al.*, 2007) et sur le vin blanc (Flesch *et al.*, 1998) ont montré une amélioration de cette vasorelaxation dépendante de l'endothélium en présence de vin rouge, par contre, un effet négatif est observé en présence de vin blanc. Cela a permis d'en déduire que les anthocyanes et les tanins sont assez efficaces pour induire un relâchement dépendant de l'endothélium. Cette vasorelaxation est associée à une augmentation de GMPc et est inhibée en présence d'inhibiteurs de l'eNOS. Des investigations ont été réalisées sur artères isolées en présence de composés purs (la quercétine, la rutine, la lutéoline, l'apigénine, l'isorhamnétine, la myricétine) afin de déterminer l'agent vasoactif de ces extraits végétaux. Tous ces composés, excepté la rutine, ont en fait un potentiel vasorelaxant (Andriambelason *et al.*, 1998 ; Burns *et al.*, 2000). De plus, une forte corrélation existe entre l'activité vasodilatatrice des vins rouges et leur contenu en phénols totaux déterminés aussi bien par la méthode de Folin-Ciocalteu que par HPLC (Burns *et al.*, 2000).

	Culture cellulaire		Artères isolées	
	Production NO et expression eNOS		Relaxation	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Fraise			[17]	
Raisin			[4]	
Vin rouge	[7], [10], [11], [14], [16]		[1], [2], [3], [6], [9], [11], [16]	
Vin blanc				[3]
Grenade	[13], [15]		[13]	
Thé vert	[18]		[18]	
Thé noir	[18]		[18]	
Cacao			[5]	
Huile d'olive			[8, indépendante]	
Ail			[12]	

Figure 24 : Tableau récapitulatif de produits alimentaires riches en flavonoïdes affectant la production et/ou la biodisponibilité du NO endothélial et/ou ayant une effet vasorelaxant sur vaisseaux isolés [1] : Andriambelason *et al.*, 1997, [2] : Andriambelason *et al.*, 1998, [3] : Flesch *et al.*, 1998, [4] : Fitzpatrick *et al.*, 2000, [5] : Karim *et al.*, 2000, [6] : Diebolt *et al.*, 2001, [7] : Leikert *et al.*, 2002, [8] : Benkhalti *et al.*, 2003, [9] : Ndiaye *et al.*, 2003, [10] : Wallerath *et al.*, 2003, [11] : Zenebe *et al.*, 2003, [12] : Ashraf *et al.*, 2004, [13] : De Nigris *et al.*, 2005, [14] : Wallerath *et al.*, 2005, [15] : Ignarro *et al.*, 2006, [16] : Benito *et al.*, 2007, [17] : Edirisinghe *et al.*, 2008, [18] : Jochmann *et al.*, 2008.

Au niveau des cellules endothéliales, les polyphénols sont capables de moduler l'activité, l'expression et/ou la sécrétion de divers facteurs impliqués dans le maintien d'une surface endothéliale anticoagulante, fibrinogénique et anti-thrombotique. Des études cliniques et épidémiologiques ont démontré l'importance des produits naturels dans la prévention de pathologies vasculaires en améliorant les fonctions vasculaires par une augmentation de la biodisponibilité du NO (Schmitt and Dirsch, 2009) (Figure 25).

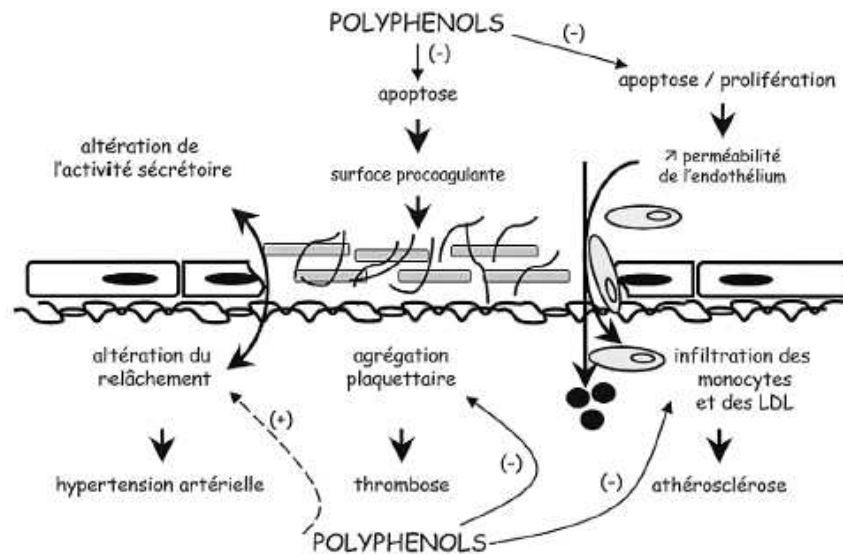


Figure 25: Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire (Martin and Andriantsitohaina, 2002).

Ces composés antioxydants possèdent une large gamme de propriétés chimiques et biologiques pouvant être impliquées dans la protection vasculaire (Stoclet *et al.*, 2004) (Figure 25):

1. Propriétés antioxydantes : activité directe de destruction des ERO ainsi qu'une inhibition directe de l'expression et de la synthèse de l'iNOS (Mladenka *et al.*, 2010). Les flavonoïdes permettent également une réduction des LDL oxydés circulants (Stoclet *et al.*, 2004).
2. Amélioration des fonctions endothéliales :
 - a. Augmentation de l'expression du gène *eNOS* (Leikert *et al.*, 2002 ;Wallerath *et al.*, 2003) et de l'activité de l'enzyme. Le groupe de Li *et al.* (2004) a montré une augmentation du taux d'ARNm *eNOS*, une augmentation de l'activité du

- promoteur de l'eNOS ainsi qu'un pourcentage de production croissant de nitrites/nitrates sur cultures de cellules endothéliales (HUVECs) en présence d'extrait de feuilles d'artichauts. Leikert *et al.* (2002) ont aussi montré que l'extrait de vin rouge dé-alcoolisé permettrait une augmentation de la production de NO avec une augmentation de l'activité de l'eNOS sur des cultures de cellules endothéliales (HUVECs). Cette activité serait probablement due à la présence du resvératrol contenu dans l'extrait de vin et non à la quercétine ou à la delphinidine.
- b. Voie PI3/Akt : Les flavonoïdes induisent la phosphorylation de l'eNOS-Ser¹¹⁷⁷ dans les cellules endothéliales, dès lors l'augmentation de la production de NO. Cela a été montré par ajout d'inhibiteur de la PI3 kinase qui abolit la production de NO (Ndiaye *et al.*, 2003, 2004). L'épigallocatechine gallate induit également une phosphorylation au niveau de la Ser¹¹⁷⁹ (Lorenz *et al.*, 2004) conduisant à une activation rapide et à long terme de l'eNOS.
- c. Inhibition de la synthèse de l'endothéline-1 : L'endothéline-1 est le facteur contractant le plus puissant produit par l'endothélium en réponse aux forces de cisaillement des vaisseaux, à l'hypoxie et/ou l'ischémie. Une fois lié à son récepteur sur les cellules musculaires lisses, il induit une augmentation de Ca⁺⁺ intracellulaire conduisant à une contraction du vaisseau. Corder *et al.* (2001) ont observé une diminution de la synthèse de l'endothéline-1 sur culture de cellules endothéliales d'aorte bovine (BAECs) en présence de vin rouge dé-alcoolisé. Cette répression d'expression se fait par la suppression de la transcription de l'endothéline-1 et est corrélée avec le taux de phénols totaux contenus dans les vins testés. Cette même observation est faite pour les jus de raisins avec un effet moins important. Pour les vins rosés et blancs, aucun effet n'est observé.
- d. Prolifération des cellules endothéliales : Les flavonoïdes inhibent la migration et la prolifération des cellules endothéliales au niveau de leur cycle cellulaire et induisent leur apoptose via l'activation du facteur p53 (Stoclet *et al.*, 2004). Le groupe de Hsieh (1999) ont également démontré ce processus avec le resvératrol (10-100 µM) sur des artères pulmonaires bovines. Le resvératrol bloque la prolifération des cellules endothéliales en accumulant les protéines p53 et p21, ce qui empêche la transition de G1 à S du cycle cellulaire.

3. Effets anti-angiogéniques : L'angiogénèse est un processus complexe caractérisé par une dégradation précoce de la matrice extracellulaire par des métalloprotéinases (MMP) suivie par la migration et la prolifération des cellules endothéliales et donc la formation de nouveaux vaisseaux en réponse à des facteurs pro-angiogéniques. Les flavonoïdes de thé et de vin rouge ont une action préventive sur l'activation des MMP des cellules musculaires lisses. Ils ont également un effet inhibiteur sur la voie de signalisation des MAPKs qui normalement conduit à l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF (Stoclet *et al.*, 2004).

Dans la majorité des cas, l'action des flavonoïdes sur l'endothélium vasculaire dépend de la production de NO. La quercétine et le resveratrol permettent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium en activant les canaux potassiques ou en inhibant les Ca⁺⁺-ATPases du réticulum endoplasmique des cellules endothéliales (McKenna *et al.*, 1996). La delphinidine permet une augmentation du Ca⁺⁺ intracellulaire et la phosphorylation des résidus tyrosines de protéines intracellulaires comme l'eNOS, ce qui provoque une augmentation de la production de NO. La plupart des études sur les produits naturels montrent une activation de l'eNOS par la voie PI3k/Akt (phosphorylation eNOS-Ser¹¹⁷⁷).

Malgré les fortes indications sur les bienfaits santé des polyphénols dans les modèles *in vitro* et sur modèle animal, leur efficacité chez l'humain est limitée par de nombreux facteurs (Gosh and Scheepens, 2009):

- Leur absorption dans l'intestin, le sang et le cerveau est très lente. Le taux maximum de flavonoïdes est observé de 1 à 3 heures après l'administration, taux entre 0.06 et 7.6 µM pour les flavonols, flavanones et flavanols ; et au alentour de 0.15 µM pour les anthocyanes.
- Le temps de demi-vie des flavonoïdes dans le plasma sanguin dépend de la source alimentaire et est de l'ordre de quelques heures.
- Leur métabolisation est intense au niveau de l'intestin, du foie et du cerveau.

Pour contrer ces limitations, une consommation élevée de fruits et légumes (\pm 600 g ou 5 portions) semble être le minimum pour obtenir les activités bénéfiques de ces phytonutriments sur la santé et sur la prévention de certaines pathologies (Ness and Powles, 1997 ; He *et al.*, 2006).

Objectifs

Selon de nombreuses études épidémiologiques, les antioxydants alimentaires semblent être étroitement liés à la prévention de plusieurs pathologies. Certaines boissons largement consommées (le thé, le vin rouge et le cacao) sont riches en composés phénoliques bien connu pour leurs activités antioxydantes élevées (Fernandez-Pachon *et al.*, 2006 ; Lee *et al.* 2003) et pouvant limiter les dommages oxydants aux lipides, à l'ADN, et aux protéines. En plus, de tels composés montrent d'autres activités telles qu'une activité antivirale et antimicrobienne, une activité de chélation empêchant l'activité d'enzymes, une activité de régulation d'expression génétique, ainsi qu'une activité significative sur les fonctions endothéliales (Lee *et al.*, 2003), une activité anti-inflammatoire et la capacité d'empêcher l'agrégation des plaquettes. Les petits fruits constituent une bonne source des substances antioxydantes. Les extraits de mûre, de framboise et de groseille agissent effectivement comme des inhibiteurs de radicaux libres (Heinonen *et al.*, 1998 ; Su and Silva, 2006). Les baies de cassis contiennent des taux très élevés de composés phénoliques, principalement des anthocyanes. Mais d'autres composés phénoliques comme des flavonols sont également présents (Benvenuti *et al.*, 2004). Les bourgeons et les feuilles de cassis sont également utilisés en tant que complément alimentaire. Les bourgeons sont des adaptogènes⁵⁰ toniques et les feuilles sont utilisées comme diurétiques et dans les affections rhumatismales.

L'objectif de ce travail est de mettre au point, à l'échelle du laboratoire, un extrait de cassis riche en flavonoïdes, stable dans le temps et de démontrer ses activités biologiques : sa capacité antioxydante, sa capacité anti-inflammatoire et ses effets sur le processus de relaxation des vaisseaux sanguins. Pour ce faire, différents points seront traités :

- L'optimisation du matériel végétal et l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes : Nous examinerons les différents explants de cassis (feuilles, fruits et bourgeons) en fonction du cultivar ainsi qu'aux différents stades de développement. L'étape d'optimisation de l'extraction nous permettra de mettre au point une technique d'extraction des flavonoïdes permettant la production d'un extrait riche et stable dans le temps en accord avec l'alimentation.

⁵⁰ Une substance adaptogène est une substance qui accroît de manière générale et non spécifique la résistance de l'organisme face à différents stress

Objectifs

- La caractérisation de ses extraits au niveau de la capacité antioxydante et au niveau de leur contenu en composés antioxydants
- L'analyse des effets de l'extrait le plus riche sur le phénomène de relaxation des vaisseaux sanguins, sur culture cellulaire et sur vaisseaux isolés
- Et finalement, l'analyse de la toxicité et de la biodisponibilité de cet extrait sur modèle animal.