



**HAL**  
open science

## Activités anti-inflammatoire et antioxydante d'extraits d'épices et de légumes

Johanna Besnard

► **To cite this version:**

Johanna Besnard. Activités anti-inflammatoire et antioxydante d'extraits d'épices et de légumes. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01650995

**HAL Id: dumas-01650995**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01650995>**

Submitted on 28 Nov 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

AGROCAMPUS  
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



<p>Année universitaire : ...2016.-2017.....</p> <p>Spécialité :</p> <p>Horticulture.....</p> <p>Spécialisation (et option éventuelle) :</p> <p>Master PPAON.....</p>	<p><b>Mémoire de fin d'études</b></p> <p><input type="checkbox"/> d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage</p> <p><input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
--	---

## Activités anti-inflammatoire et antioxydante d'extraits d'épices et de légumes

Par : Johanna BESNARD

**Soutenu à Strasbourg**

**le 22/06/17**

**Devant le jury composé de :**

Président :

Maître de stage : Dr Christian D. Muller

Enseignant référent :

Autres membres du jury (Nom, Qualité) :

**P. RICHOMME / O. GROVEL / D. BELLENOT /  
S. TOMASI / D. SERAPHIN**

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation  
«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»  
disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>





## REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. Eric Marchioni de l'équipe CAMBA (Chimie Analytique des Molécules BioActives) qui m'a permis de réaliser mon stage. Je tiens également à remercier le Dr. Christian D. Muller qui m'a formée à la culture cellulaire et encadrée durant ce stage ainsi que Mr. Serge Dumont pour ses conseils. Je remercie Mr. Hugh Petitjean de la société Benephyt pour ce sujet très intéressant, et Melle Zélie Triaux que j'ai pu accompagner dans sa partie biologique de sa thèse. J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidée au quotidien dans mon stage : Dr Veronica Cakova, Marina Ingremeau, Elodie Bossard, Rafik Haderbach. Enfin je remercie les personnes qui m'ont accompagnée dans ma vie à Strasbourg, Ludivine Schroeder et dans ma vie personnelle, Sylvie Marais, Laura Besnard et Geoffrey Marcellot.

Remerciements .....	3
Abréviation.....	6
Listes Figure.....	7
Introduction .....	8
I. Matériels et méthodes .....	10
I.1 Extraits .....	10
I.2 Culture cellulaire.....	11
I.2.1 Lignées U87 .....	11
I.2.2 Lignées cellulaires THP-1, Jurkat et RAJI .....	12
I.3 Test de toxicité cellulaire <i>in vitro</i> .....	12
I.3.1 Évaluation de l'intégrité membranaire .....	12
I.3.2 Évaluation de l'induction d'apoptose .....	13
I.4 Évaluation de l'activité inflammatoire .....	13
I.5 Tests Antioxydants .....	14
I.5.1 Méthode TEAC .....	14
I.5.2 Méthode ORAC .....	15
II. Résultats .....	17
II.1 Test de toxicité .....	17
II.1.1 Intégrité membranaire .....	17
II.1.2 Apoptose.....	18
II.2 Tests antioxydants .....	20
III. Discussion .....	23
III.1 Toxicité des extraits .....	24
III.1.1 Intégrité membranaire .....	25
III.1.2 Apoptose .....	26
III.2 Activité antioxydante .....	28
Conclusion & Perspectives .....	30



## ABRÉVIATION

**AAPH** : 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride  
**ABTS** : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)  
**ASE** : Accelerated Solvent Extraction / Extraction Accélérée par Solvant  
**CAMBA** : Chimie Analytique des Molécules BioActives  
**COV** : Composés organiques volatiles  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Milieu minimum essentiel de Eagle modifié par Dulbecco  
**DPBS** : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline / Tampon phosphate salin de Dulbecco  
**EC<sub>50</sub>** : Half maximal Effective Concentration / Concentration efficace médiane  
**FBS** : Fetal Bovine Serum / Sérum de Veau Fœtal (SVF)  
**FITC** : Fluorescein Isothiocyanate / Isothiocyanate de fluorescéine  
**HCS** : High Content Screening / Imagerie cellulaire à haut débit  
**IL** : Interleukine  
**IP** : Iodure de Propidium  
**LC<sub>50</sub>** : Lethal concentration / Concentration létale  
**LDH** : Lactate Déshydrogénase  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**ORAC** : Oxygen Radical Absorbance Capacity / Capacité d'absorption des radicaux libres  
**PBS** : Phosphate Buffered Saline / Tampon phosphate salin  
**PE** : Phycoérythrine  
**PLE** : Pressurized Liquid Extraction / Extraction Liquide Pressurisée  
**PS** : Phosphatidylsérine  
**PSM** : Poste de Sécurité Microbiologique  
**ROS** : Reactive Oxygen Species / Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DRO)  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium / Milieu de l'institut Roswell Park Memorial  
**TE** : Trolox equivalent / Equivalent Trolox  
**TEAC** : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity / Capacité antioxydante en équivalent Trolox  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor / Facteur de nécrose tumorale  
**Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique

## LISTE FIGURES

<b>Figure 1</b> : Principe de l'ASE	10
<b>Figure 2</b> : U87 vu au microscope inversé	11
<b>Figure 3</b> : Principe du test de dosage de la sécrétion de TNF par des anticorps monoclonaux	13
<b>Figure 4</b> : Principe des réaction d'oxydation	14
<b>Figure 5</b> : Formation de l'ABTS <sup>•+</sup> par échange d'électro.	15
<b>Figure 6</b> : Toxicité des extraits purs d'épices	17
<b>Figure 7</b> : Toxicité des extraits purs des légumes et du jus de choucroute	18
<b>Figure 8</b> : Effet de l'extrait pur de Cuminum cyminum sur les cellules Jurkat	18
<b>Figure 9</b> : Effet des extraits purs d'épices sur le nombre de Jurkat en apoptose	19
<b>Figure 10</b> : Effet des extraits purs de légumes sur le nombre de Jurkat en apoptose	19
<b>Figure 11</b> : Effet des extraits purs d'épices et de légumes sur les cellules Jurkat en pro apoptose	20
<b>Figure 12</b> : Activité antioxydante des extraits d'épices en équivalent Trolox	21
<b>Figure 13</b> : Activité antioxydant des extraits de légumes en équivalent Trolox	21
<b>Figure 14</b> : Effet du séchage sous azote sur la concentration des terpènes de l'extrait de Thymus vulgaris	24
<b>Figure 15</b> : Précipité formé par les extraits de Cinnamomun verum et Syzgium aromaticum	25
<b>Figure 16</b> : Répartition des cellules en fonction de leur taille et de leur granulosité interne	27

## LISTE TABLEAU

<b>Tableau 1</b> : Concentration des extraits purs après séchage sous azote	23
<b>Tableau 2</b> : P-value des tests de Student entre les légumes biologiques et non biologiques	28

## LISTE ANNEXE

<b>Annexe I</b> : Liste des noms botaniques des plantes analysées	A
<b>Annexe II</b> : Effet du séchage à l'azote sur les terpènes d'extraits d'épices	B
<b>Annexe III</b> : Effet du séchage par évaporateur rotatif sur les terpènes du Thym	E



## INTRODUCTION

Le mémoire réalisé s'inscrit dans le cadre du projet TERPAIN, collaboration entre la société BenePhyt et l'équipe CAMBA UMR7178, CNRS.

Il s'agit d'étudier le potentiel des terpènes afin de réduire les douleurs chroniques, en guidant l'alimentation ou en consommant des compléments alimentaires qui possèderaient des effets anti-inflammatoires ou anti-nociceptives. L'activité biologique des terpènes reste, aujourd'hui encore, peu étudiée (Gershenzon et Dudareva, 2007). Ainsi des extraits terpéniques de plantes choisies (extraction par PLE (Pressurized Fluid Extraction)) ont été effectués afin de déterminer leurs activités potentielles. La partie biologique de ce projet consiste à analyser la toxicité, puis pour les extraits non toxiques, l'effet anti-inflammatoire d'extraits d'épices et de légumes. Après la mise en place du protocole, d'autres plantes seront, par la suite, analysées. Enfin les extraits possédant une activité intéressante seront ensuite fractionnés par fractionnement bio-guidé afin de déterminer si l'activité leur est imputable ou non (suite du projet).

Les extraits d'épices : cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum* J.Presl), clou de girofle (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry), cumin (*Cuminum cyminum* L.), fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), muscade (*Myristica fragrans* Houtt.), piment d'Espelette (*Capsicum annum* L.), thym (*Thymus vulgaris* L.), et de légumes en culture biologiques et non biologiques : oignon (*Allium cepa* L.), potiron (*Cucurbita maxima* Duchesne) et de deux types de choux, le chou blanc et le chou rouge (*Brassica Oleracea* var. *capitata* L. f. *alba* et f. *rubra*) ainsi que du jus de choucroute seront étudiés. Les extraits sont obtenus par la méthode PLE. Cette méthode innovante est encore peu exploitée. Seuls quelques articles traitent de son application aux épices et légumes étudiés dans le cadre de ce travail (cf. comparaison de méthode pour le fenouil (Rodríguez-Solana et al., 2014) ; étude du contenu phénolique (thym, Orłowska, 2014) ; effet anti-inflammatoire de la cannelle (Gunawardena, 2015)).

Les épices ont été et sont toujours utilisées principalement pour leurs saveurs (Srinivasan, 2005). Plus de 8,5 millions de tonnes sont ainsi produites chaque année dans le monde (FAOSTAT). Leurs propriétés sont nombreuses : propriétés tinctoriales, propriétés conservatrices, exhausteur d'arômes, mais aussi propriétés médicinales. Utilisées traditionnellement dans de nombreuses cultures, les épices ont été très étudiées afin de déterminer plus précisément quels étaient leurs intérêts pour la santé humaine. De nombreux bienfaits ont ainsi été déterminés. La cannelle très étudiée a démontré des activités antidiabétique, anticancéreuse, antimicrobienne, antifongique, ... (Rao et Gan, 2014). Il en est de même pour le cumin (Johri, 2010), le clou de girofle (Cortés-Rojas et al., 2014), le fenouil (Rather et al., 2011), la muscade (Nagja et al., 2016), le piment (Khan, 2014) et le thym (Basch, 2004).

Concernant les légumes, le but du projet TERPAIN est de pouvoir guider l'alimentation du patient en mettant à jour des propriétés anti-inflammatoires ou antioxydantes de légumes communs. Le chou blanc est l'un des légumes les plus cultivés au monde et possède, entre autres, des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Šamec et al., 2017). L'oignon aurait des propriétés anti-inflammatoires, anti-cholestérol, anticancéreuses et antioxydantes potentiellement dû aux phénols et flavonoïdes (Upadhyay, 2016). Le potiron possède également des propriétés médicinales (par exemple il est anti-parasitaire), mais c'est majoritairement la graine qui est étudiée et très peu sa pulpe (Fu et al., 2006). L'impact des pesticides sur les résultats sera également évalué, en prenant pour chaque légume, son homologue biologique. Afin de mettre en avant les produits de la région alsacienne, en plus de l'étude du chou, sera également analysé le jus de choucroute.

Les propriétés qui nous intéressent dans ce travail sont celles anti-inflammatoires et antioxydantes. L'effet antidouleur pour calmer les douleurs chroniques inflammatoires et l'effet antioxydant pour piéger les radicaux libres et donc stopper ou ralentir le phénomène

d'inflammation.

Lorsqu'un organisme subit une agression chimique, physique ou biologique, les mécanismes de l'inflammation se déclenchent. Les monocytes, entre autres, détectent les antigènes de l'agresseur grâce à leurs récepteurs membranaires, et mettent en marche des voies de signalisation pour libérer des médiateurs comme les interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), l'histamine ou encore des prostaglandines. Ces médiateurs incitent les leucocytes, monocytes et macrophages de passer la barrière sanguine pour rejoindre le lieu d'agression par diapédèse. Ce phénomène déclenche les symptômes connus de l'inflammation (douleur, rougeur, chaleur et gonflement). La phagocytose des agents pathogènes et la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (i.e. l'IL-10) permet normalement de mettre fin à la réaction. Cependant l'inflammation peut persister devenant alors chronique et donnant lieu à de nombreuses maladies comme la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI). Les douleurs chroniques touchent jusqu'à 30 % des personnes en France (étude Inserm). Les douleurs associées sont souvent dues à une surexpression des voies de signalisation de l'inflammation. C'est pourquoi, le test mis en place pour détecter les effets anti-inflammatoires des extraits, mesure le taux de TNF- $\alpha$ , afin de savoir si cette voie peut-être inhibée ou au moins diminuée.

Durant l'inflammation, lors de la phagocytose, des ROS (Reactive Oxygen Species) sont générés par les cellules immunitaires. Ces espèces chimiques sont transportées dans le sang et endommagent les cellules malignes mais aussi les cellules saines (stress oxydatif). Elles peuvent être à l'origine de maladie (**Alzheimer**), ou bien y contribuer comme pour les maladies chroniques inflammatoires ou encore le cancer (Aruoma, 1998). Les ROS peuvent devenir des messagers de l'inflammation en induisant la formation de cytokines et de facteurs de transcription pro-inflammatoire. L'effet antioxydant des extraits obtenus sera donc également testé selon deux méthodes complémentaires : ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) qui sont parmi les plus utilisées et qui testent deux mécanismes différents de l'oxydation.

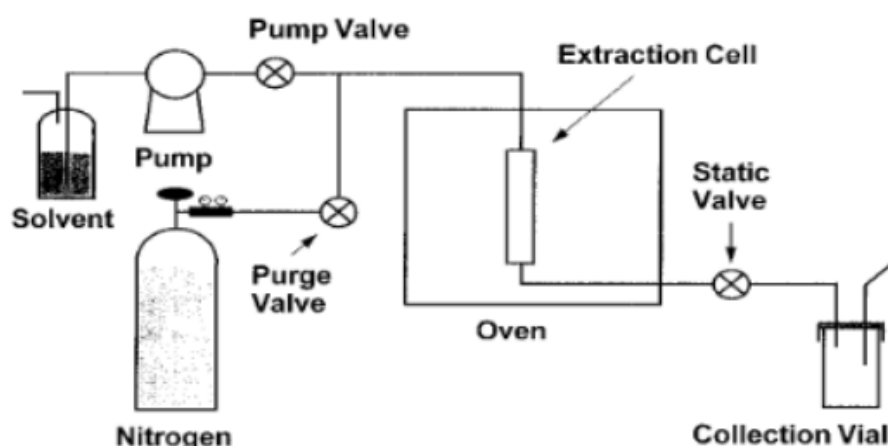
Bien que de nombreuses études aient déjà été réalisées concernant l'effet anti-inflammatoire, certaines plantes sont peu investiguées vis à vis des terpènes comme le fenouil, le cumin ou encore le potiron. La cannelle, à contrario, a révélé un fort potentiel anti-inflammatoire imputable à des molécules comme dont l'eugénol (Edet, 2004). Cependant sa toxicité peut poser problème comme celles d'autres épices (test sur la viabilité de crevette, Mahmoud et al., 1992). La toxicité est par ailleurs, rarement bien définie. De plus, la toxicité de certains terpènes reste controversée (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015). Ici, chaque extrait sera testé sur des cellules d'origine gliales (lignée U87) et hématopoïétiques (monocytes THP-1 ou lymphocyte B RAJI), à des concentrations croissantes, afin de déterminer s'il y a destruction de l'intégrité cellulaire. Le phénomène d'apoptose sera également testé sur les cellules hématopoïétiques (lymphocyte TCD4 Jurkat).

Certains terpènes sont déjà bien connus pour leurs propriétés médicinales comme le thymol, issues du thym, qui est antibactérien, antimicrobien, analgésique, antiépileptique (Parsae et al, 2016). D'autres ont des activités antioxydantes et anti-inflammatoires comme l'eugénol présent dans de nombreux extraits (Srinivasan, 2005) ou encore le 4-terpinéol (Noguera et al., 2014). Cependant la majorité des effets pharmacologiques de ces extraits de plantes sont imputables à d'autres molécules comme la capsaïcine pour le piment (Srinivasan, 2016). Comme les terpènes du piment ne sont que peu étudiés concernant ces propriétés, ils pourraient donc avoir le même type d'effets pharmacologiques.

Le but de ce mémoire est d'évaluer en premier lieu la toxicité des extraits d'épices et de légumes, obtenus par PLE, en utilisant deux méthodes : soit la perte de l'intégrité membranaire, soit le pourcentage de cellules induits en apoptose. Les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes des extraits seront ensuite testées afin de déterminer les plus actives d'entre eux.

## I.1 EXTRAITS

Les épices de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum* J. Presl), de cumin (*Cuminum cyminum* L.), de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), de clou de girofle (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry), de piment d'Espelette (*Capsicum annuum* L.), de thym (*Thymus vulgaris* L.), de muscade (*Myristica fragrans* Houtt.) ainsi que l'oignon (*Allium cepa* L.), le potiron (*Cucurbita maxima* Duchesne) et deux types de choux, le chou blanc et le chou rouge, (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *alba* et f. *rubra*) et du jus de choucroute seront extraits puis étudiés. Les noms latins des plantes sont repris dans l'annexe 1. Les épices sont de la marque Ducros, excepté la cannelle et le thym qui sont de la marque Chamsyl et le cumin de la marque La Conquête des saveurs. Le jus de choucroute a été acheté dans un magasin bio (côté nature). Les légumes sont achetés en grande surface, bio et non bio. Les extraits sont obtenus par la méthode PLE avec un mélange eau/éthanol 50/50 (%v/v), compatible avec les tests biologiques. La cellule contenant 3 g d'épices ou 5 g de légumes avec du sable de Fontainebleau (calciné à 400 °C pendant 4h), est chauffée à 125 °C à 100 bar pendant 7 min. Ces paramètres ont été optimisés lors d'un précédent stage (Cuenca, 2016). Le rendement est d'environ 10 à 15 mL d'extrait pur sont obtenus. L'appareil utilisé est l'Accelerated Solvent Extractor ASE 350 (figure 1, fabriqué par Dionex). Les extraits ainsi obtenus contiennent les molécules volatiles issues des épices dont les terpènes qui sont le sujet d'étude principal ainsi que d'autres composés. (Richter et al, 1996).



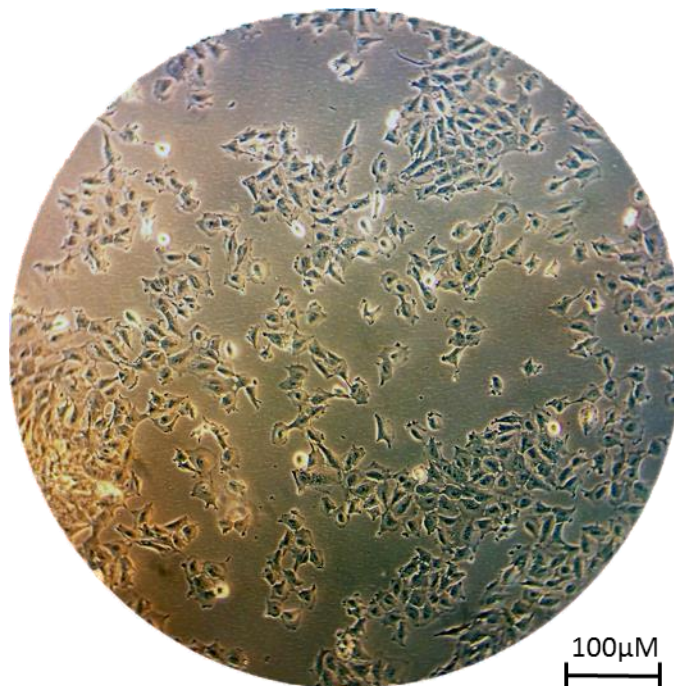
**Figure 1** : Principe de l'ASE (Richter et al, 1996). Une cellule contenant la matrice à extraire est placée dans un four qui sera chauffé à 125°C et sous une pression de 100 bars. Le mélange éthanol/eau 50/50 (%v/v) passe dans la cellule et entraîne avec lui les composés qui seront collectés dans un vial.

## I.2 CULTURE CELLULAIRE

Toutes les manipulations sont réalisées sous hôte de culture cellulaire (PSM de type II) en portant des gants. Les tampons, milieu de culture et autres solutions entrant en contact avec les cellules sont préalablement réchauffées au bain-marie à 37°C.

### I.2.1 Lignées U87

Les cellules utilisées pour tester la toxicité sont des cellules U-87 MG (figure 2) données par le professeur Maxime Lehmann de l'UMR 7213 CNRS-Laboratoire Biophotonique et Pharmacologie. Il s'agit de cellules adhérentes de glioblastome humain. Ces cellules étant des cellules issues du cerveau et donc très sensibles, elles serviront pour évaluer la toxicité des extraits sur les membranes.



*Figure 2 : U87 vu au microscope inversé (Zélie Triaux, 2017). La confluence est estimée à l'œil nu par le même examinateur tout le long des expériences. Les cellules rondes sont des cellules en cours de division qui se détachent pour réaliser la mitose.*

Les cellules U87 sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) High Glucose contenant de la glutamine stabilisé (Dutscher, France), complété avec 1 % de pénicilline (10000 UI/mL, Gibco™) et de streptomycine (10000 µg/ml, Gibco™) ainsi que 10 % de FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco™, USA), dans des flasques soit de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> avec possédant un bouchon à membrane filtrante (0,22 µm). Le milieu ainsi préparé est alors dénommé milieu complet. Tous les 2 ou 3 jours un passage est réalisé si les cellules sont à 80% de confluence, sinon le milieu est simplement changé pour un milieu frais. Lors d'un passage le milieu est retiré et 1 mL de trypsine 1X (préalablement réchauffée à 37 °C pour un effet maximal de l'enzyme) est ajouté pour les flasques de 25 cm<sup>2</sup> et 2,5 mL pour les flasques de 75 cm<sup>2</sup>. Les flasques sont placées à l'étuve (incubateur New Brunswick™ Galaxy® 170S) à 37 °C, 5 % de

CO<sub>2</sub> jusqu'au décollement des cellules adhérentes (environ 3 min). 10 mL de milieu complet frais est ajouté. Généralement, d'une flasque de 25 cm<sup>2</sup>, une autre flasque de 25 cm<sup>2</sup> est réalisée (3/10) et ainsi qu'une autre de 75 cm<sup>2</sup> (5/10). Du milieu est ensuite rajouté pour compléter à 10 mL pour les flasques de 25 cm<sup>2</sup> et à 20 mL pour les flasques 75 cm<sup>2</sup>. Les flasques sont remises à l'étuve jusqu'à la prochaine manipulation.

## I.2.2 Lignées cellulaires THP-1, Jurkat et RAJI

La lignée cellulaire utilisée pour les tests anti-inflammatoires est la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 obtenue auprès de l'ATCC (LGC Standard, Molsheim, France) ainsi que la lignée cellulaire lymphocytaire B RAJI gentiment offert par Mme Cendrine Seguin de l'UMR 7199, CNRS - Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives. Les monocytes sont décongelés, centrifugés 6 min à 125 g (500 tr/min) afin de retirer le DMSO nocif pour les cellules, et cultivés en suspension dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + Glutamax (ThermoFisher, USA) supplémenté avec 10 % de FBS décomplémenté et 1% de pénicilline (10000 UI/mL, Gibco™) et streptomycine (10000 µg/mL, Gibco™). Ces cellules étant non adhérentes, les passages se font par dilution et non plus à l'aide de la trypsine. Les cellules sont divisées en 2 flasques où du milieu frais est ajouté. Le changement de milieu se fait par centrifugation, tout en gardant 2 mL de l'ancien milieu. Cela permet de garder les différentes molécules émises par les cellules qui sont essentielles à leur croissance. La lecture du nombre de cellules se fait à l'aide d'un cytomètre en flux, le Guava EasyCyte 12HT. Le passage est réalisé lorsque les cellules atteignent une concentration de  $8,0 \cdot 10^5$  cells/mL. La densité ne doit pas dépasser  $1,0 \cdot 10^6$  cells/mL pour de bonne condition de culture. Trop diluées les cellules entraineraient un ralentissement de leur croissance. Elle serait bloquée si les cellules étaient trop nombreuses. Les Jurkat (lymphocytes T-CD4 humain), offert par le Dr. Marc Mousli de l'UMR 7213 CNRS - Laboratoire Biophotonique et Pharmacologie sont cultivés de la même façon que les THP-1.

## I.3 TEST DE TOXICITÉ CELLULAIRE *IN VITRO*

### I.3.1 Évaluation de l'intégrité membranaire

#### **La toxicité est ici définie comme la perte de l'intégrité membranaire de la cellule.**

Les tests sont réalisés en premier lieu sur des cellules U87 en plaques 96 puits à bords noirs (Greiner bio-one, France) pour éviter d'observer une potentielle fluorescence due au plastique lors de la lecture. Une flasque de 75 cm<sup>2</sup> permet de réaliser 2 plaques si la confluence est entre 70 à 80%. Le milieu de culture est retiré de la flasque et remplacé par 2,5 mL de trypsine. La flasque est placée à l'étuve à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'au décollement des cellules adhérentes. 20 mL de milieu DMEM complet frais sont ajoutés aux cellules et 200 µL de cette suspension cellulaire sont transvasés dans chaque puits.

Après 6 à 8h d'incubation (le temps de permettre aux cellules d'adhérer), 2 µL d'extraits de concentrations croissantes sont ajoutés respectivement à chaque puits, ainsi que 2 µL de mélange eau/éthanol 50/50 (%v/v) pour le puits contrôle. Le temps d'incubation est selon l'expérimentation de 16 ou de 24 h, avant lecture au cytomètre à image, High Content Screening (HCS) (Celigo Nexcelom). La révélation se fait à l'aide de fluorochromes : le réactif de Hoechst (fluorescence bleu marquant l'ADN et permettant de dénombrer la totalité des cellules présentes, mortes et vivantes), l'IP (Iodure de Propidium, intercalant de l'ADN et ne fluoresçant en rouge que s'il est intercalé dans l'ADN) et enfin la calcéine (fluorescence verte mesurant la viabilité des cellules). La calcéine-AM rentre passivement dans les cellules où, elle sera clivée par une estérase, conférant alors une fluorescence verte à toute cellule vivante et intègre. L'IP pénètre dans les cellules uniquement quand la membrane plasmique est endommagée. C'est pour cela que ce test mesure l'intégrité membranaire. 100 µL du mix dilué dans du PBS est ajouté à chaque

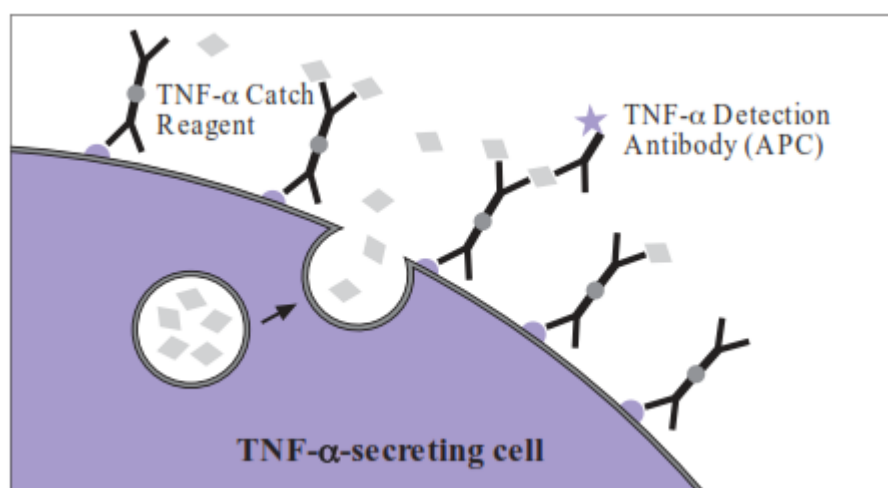
puits. La plaque est incubée pendant 30 min à 37 °C avant rinçage du mix et ajout de 100 µL de PBS. 3 répétitions indépendantes seront réalisées pour chaque extrait.

### I.3.2 Évaluation de l'induction d'apoptose

L'apoptose sera mesurée sur les cellules Jurkat à l'aide de l'Annexine-V/FITC (Isothiocyanate de fluorescéine). L'Annexine se fixe à la phosphatidylsérine (PS) normalement dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Quand la cellule déclenche le signal d'apoptose, la PS est présentée dans le feuillet externe de la membrane où l'annexine peut alors se fixer et cette dernière fluoresce en vert grâce au FITC. De l'IP est additionné afin de distinguer les cellules dont la membrane est endommagée. Le célastrol (50 µM) est utilisé comme contrôle positif car il induit l'apoptose (Feng et al., 2013). Le contrôle négatif correspond à des puits avec de l'eau/éthanol 50/50 (%v/v) à la place des extraits. Les plaques de culture cellulaire 96 puits TPP (Dutscher, France) sontensemencées avec 200 µL de cellules à une densité de  $1.10^5$  cells/mL. 2 µL d'extrait pur sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée durant 24 h de 37° C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 3 µL d'annexine V/FITC et 3 µL d'IP sont ajoutés. La plaque est agitée pendant 1 min et elle est mise à incuber pendant 10 min à température ambiante dans le noir. La fluorescence est ensuite mesurée au cytomètre en flux (Guava EasyCyte 12HT). Les extraits purs ayant montré une toxicité seront re testés selon une gamme de concentration afin de déterminer l'EC<sub>50</sub> (Half maximal effective concentration) grâce au logiciel d'analyse InCyte.

### I.4 ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ INFLAMMATOIRE

Le test anti-inflammatoire réalisé est basé sur la suppression de sécrétion de TNF-α par les cellules THP-1 et RAJI, après activation par lipopolysaccharide (LPS) issu de *Salmonella abortus equi* S-form (Enzo Life Sciences, Lörrach, Allemagne). Cela déclenche une réaction inflammatoire avec relargage du TNF par les THP-1. C'est cette molécule qui sera ensuite mesurée au cytomètre en flux à l'aide d'anticorps. Un premier complexe de capture composé de 2 anticorps monoclonaux spécifique (catch reagent) se fixe à la surface des leucocytes et capture le TNF-α sécrété par ces derniers. Un anticorps de détection conjugué à la phycoérythrine (PE, fluorescence jaune) lie le TNF-α et permet par la mesure de la fluorescence verte associée ou non à la cellule de vérifier son taux d'activation ou d'inhibition (figure 3).

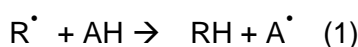


**Figure 3 :** Principe du test de dosage de la sécrétion de TNF par des anticorps monoclonaux (© Miltenyi Biotec). Le complexe de capture se fixe au récepteur de la cellule, tout en fixant le TNF-α sécrété. Un anticorps de révélation couplé à un fluorochrome (PE) fixe à son tour le TNF-α. La fluorescence jaune émise sera ensuite mesurée par le cytomètre en flux.

Le protocole est réalisé suivant celui de Nabergoj (2014). Des plaques de culture cellulaire 96 puits TPP sontensemencées à raison de  $3,0 \cdot 10^5$  cells/mL. 180  $\mu$ L de milieu RPMI complet contenant les cellules sont déposées ainsi que 20  $\mu$ L d'extraits dilués dans le milieu RPMI complet. Le LPS (concentration finale de 1  $\mu$ g/mL) est également ajouté (2  $\mu$ L /puits) pour activer les cellules. La plaque est mise à incuber 2h dans une étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. 2  $\mu$ L du complexe de capture est ajouté ainsi que 2  $\mu$ L de l'anticorps de détection. La plaque est remise à incuber 2 h à l'étuve dans les mêmes conditions. Le contenu des puits est ensuite placé dans des plaques MultiScreen<sub>HTS</sub>-BV, avec filtre de 1,2  $\mu$ m, où le surnageant est aspiré sous vide. La plaque est lavée 2 fois avec du Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS). Les cellules sont re suspendues entre chaque lavage. 200 $\mu$ L de milieu frais est ajouté à chaque puits ainsi que 3  $\mu$ L d'IP, puis les cellules sont transférées dans une plaque de culture cellulaire 96 puits TPP. La lecture est ensuite faite au cytomètre en flux. Les cellules mortes, fluoresçant en rouge grâce à l'IP, sont écartées de l'analyse. Un contrôle négatif est également réalisé en déposant les 180  $\mu$ L de cellules mais sans les activer par le LPS. Un contrôle positif du relargage de TNF- $\alpha$  est effectué en ajoutant 180  $\mu$ L de cellules, pas d'extrait mais du LPS. Enfin un contrôle positif de la baisse du taux de TNF- $\alpha$  est réalisé en utilisant du céléstrol qui a des propriétés anti-inflammatoires (Venkatesha et al., 2016).

## I.5 TESTS ANTIOXYDANTS

Les deux tests utilisés pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits sont le test TEAC, qui permet de quantifier l'activité antioxydante liée au transfert d'électrons, et le test ORAC, pour quantifier celle liée au transfert de protons (figure 4). Il s'agit de 2 tests différents, cependant la même gamme d'étalonnage du Trolox est utilisée. Le Trolox est une molécule antioxydante servant de référence et permettant la comparaison des pouvoirs antioxydants des extraits. Ce dernier est donc exprimé en équivalent Trolox (TE).

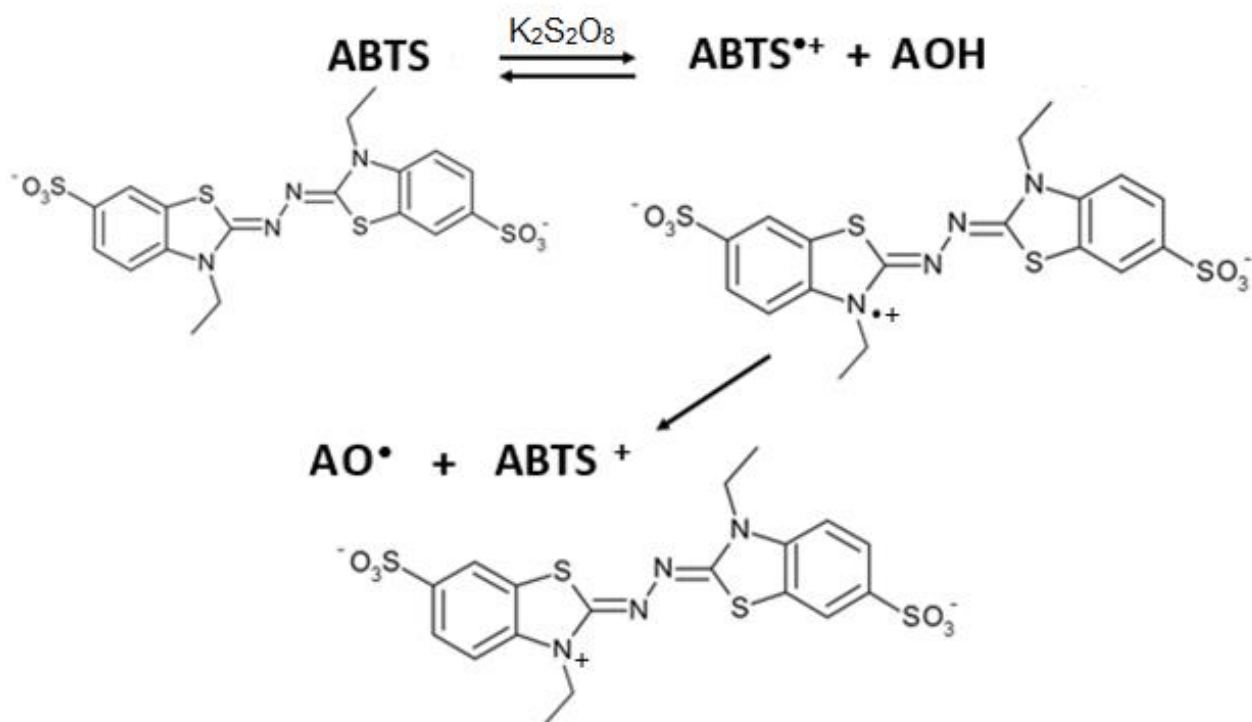


*Figure 4 : Principe des réaction d'oxydation. (1) : antioxydant par transfert de proton ; (2) : antioxydant par transfert d'électron ; R<sup>•</sup> : radical ; AH : antioxydant. (R. Van Der Werf, 2013)*

Une solution mère de Trolox est préparée à 1 mmol/L dans un mélange eau MilliQ/méthanol (50/50 %v/v). Des dilutions sont ensuite réalisées dans le même mélange eau/méthanol de concentrations suivantes : 10  $\mu$ mol/L, 50  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ mol/L, 250  $\mu$ mol/L et 500  $\mu$ mol/L. La gamme est choisie assez large pour obtenir une courbe d'étalonnage suffisamment grande pour quantifier les activités antioxydants des extraits. Une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) est également préparée contenant : 8,2 g de NaCl (140 mmol/L) ; 1,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (9,8 mmol/L) ; 0,27 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mmol/L) et 0,15 g de KCl (23 mmol/L) dissout dans 1 litre d'eau MilliQ.

### I.5.1 Méthode TEAC

Le principe de la méthode TEAC est de quantifier l'activité antioxydante d'un extrait par sa capacité à réduire le radical ABTS<sup>•+</sup> formé (un radical coloré bleu/vert absorbant à 734nm) en donnant un proton (figure 5). On observe alors une décoloration de la solution. L'absorbance sera alors mesurée par spectrométrie grâce à un lecteur de microplaques à fluorescence (Varioskan Thermo Scientific).



*Figure 5 : Formation de l'ABTS<sup>•+</sup> par échange d'électron en présence de persulfate de potassium. La molécule antioxydante ou le Trolox peut alors réduire le radical formé en donnant un H<sup>•</sup>.*

Suivant le protocole de R. Van Der Werf (2013), une solution mère d'ABTS est préparée à 7,5 mmol/L avec du persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) à 2,5 mmol/L dissout dans du PBS. La réaction qui s'effectue entre K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> et l'ABTS permet la formation du radical cation ABTS<sup>•+</sup>. La solution est mise dans l'obscurité à 4 °C pendant une nuit. De cette solution, une solution fille d'ABTS à 2 % est préparée dans le PBS. Les extraits sont déposés dans une plaque 96 puits, à raison de 10 µL par puits. 200 µL de la solution fille sont ensuite ajoutés dans l'obscurité. La gamme de Trolox est également mise sur plaque (10 µL/puits) ainsi qu'un triplicat des 2 solvants correspondant au blanc : eau/méthanol pour le Trolox et eau/éthanol pour les extraits (10 µL/puits). La plaque est ensuite mise dans le lecteur de microplaque à fluorescence (Varioskan Thermo Scientific), où elle sera incubée à 37 °C pendant 10 min, avant d'être agitée 10 s. L'absorbance à 734 nm (correspondant au pic d'absorbance de l'ABTS (Re et al., 1999)), de chaque puits, est ensuite lue. Une courbe d'étalonnage du Trolox est ensuite réalisée ([Trolox]=f(Absorbance)) afin de quantifier l'activité des extraits en équivalents Trolox.

### I.5.2 Méthode ORAC

La méthode ORAC est basée sur un principe de compétition entre une sonde fluorescente (la fluorescéine, 3H-xanthène-3-one) et les molécules antioxydantes présentes dans les extraits. Lorsque la fluorescéine est dégradée par des réactions d'oxydation dues à des transferts de protons, sa fluorescence décroît. Cependant si dans le milieu des molécules antioxydantes sont présentes, ces dernières seront dégradées avant la sonde entraînant alors un retard de la décroissance de fluorescence. C'est donc une cinétique qui sera suivie lors de cette méthode. L'AAPH est également utilisé comme initiateur de la réaction car il se dissocie à 37 °C, libérant des peroxydes permettant la réaction d'oxydation.

Selon le protocole de R. Van Der Werf (2013), une solution mère de fluorescéine est



préparée à  $2,8 \cdot 10^{-2}$  g/L dans le PBS. De cette solution une solution fille est préparée de concentration à  $2,8 \cdot 10^{-5}$  g/L. Une solution d'AAPH est également réalisée, dans le PBS, à 41,5 g/L. Les extraits sont déposés dans une plaque 96 puits à raison de 10  $\mu$ L par puits. 150  $\mu$ L de la solution fille de fluorescéine sont ensuite ajoutés dans l'obscurité. Il en est de même pour le triplicat de la gamme de Trolox, et les triplicats des 2 blancs comme pour la méthode TEAC. La plaque est ensuite placée dans le même lecteur de microplaque à fluorescence (Varioskan Thermo Scientific). La plaque est agitée pendant 20 s, puis incubée à 37 °C pendant 15 min. L'AAPH est ensuite ajoutée par un dispenseur automatique (30  $\mu$ L par puits) afin que la cinétique commence en même temps pour chaque puits. Il y a de nouveau une agitation de 5 s puis la lecture de l'intensité de la fluorescence à 528 nm se fait toutes les 5 minutes. On peut ainsi observer une courbe de décroissance de la fluorescence.

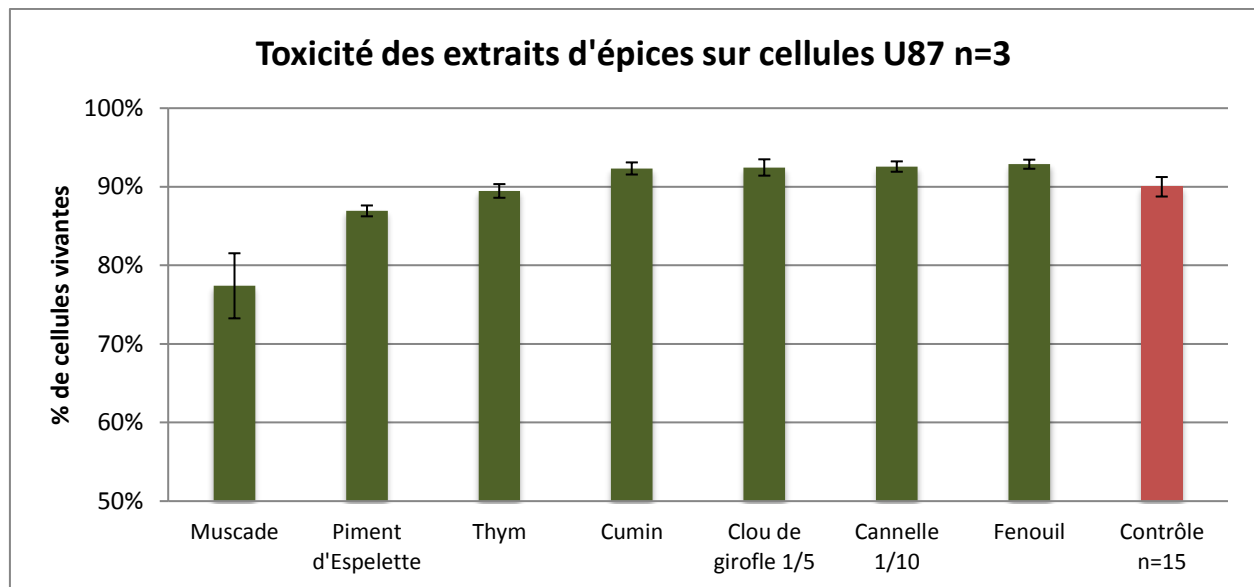
Afin de quantifier le pouvoir anti oxydant des extraits, on trace une courbe d'étalonnage du Trolox : ([Trolox]=f(Aire sous la courbe de Trolox – aire sous la courbe du blanc (eauMiliQ/méthanol))). Les résultats seront exprimés en équivalent Trolox.

## II.1 TEST DE TOXICITÉ

### II.1.1 Intégrité membranaire

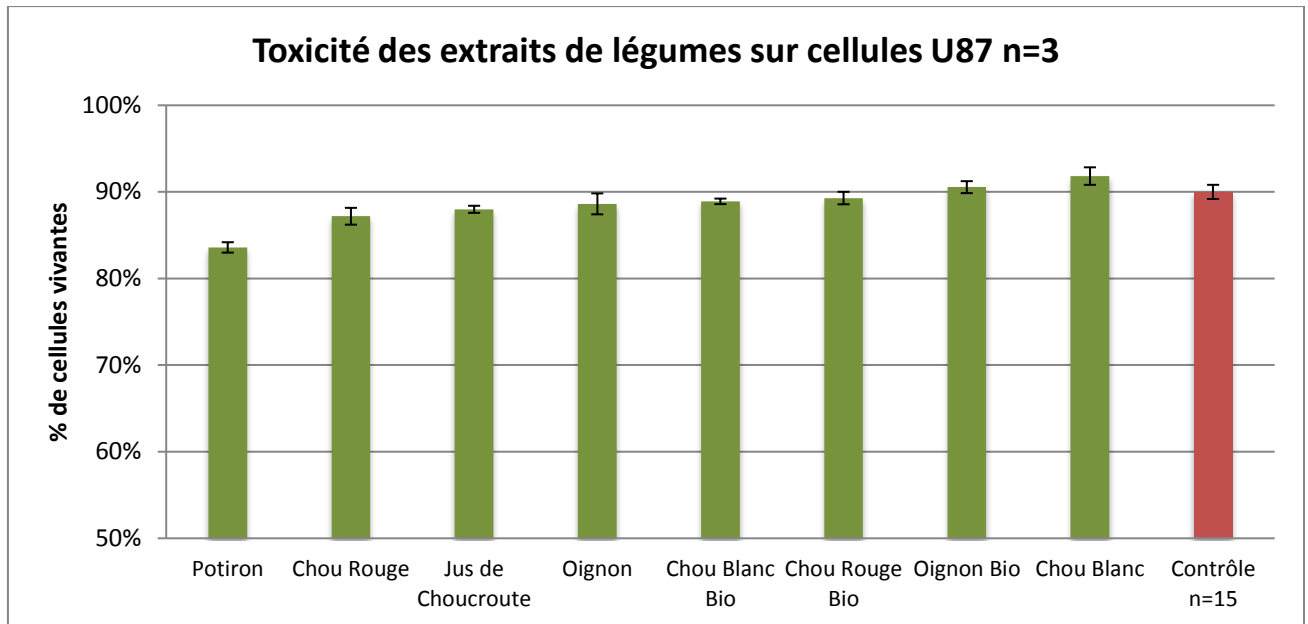
Les premiers extraits testés sont ceux des épices. Ne connaissant pas la concentration exacte des extraits, il a été choisi de faire des dilutions. Ces dernières vont de 0,001 à 0,500 par rapport à l'extrait pur. Le pourcentage de cellules vivantes est déterminé par le cytomètre à image par rapport au nombre total de cellules présentes dans chaque puits (noyaux cellulaires marqués au Hoechst). Les résultats sur les extraits purs sont montrés figure 6. Les tests statistiques (Test de Fischer et test de Student unilatéral par Microsoft Excel) ont montré qu'aucune différence significative de toxicité (*i.e.* perte d'intégrité membranaire) entre les différents extraits d'épices et le contrôle n'était décelable.

Par ailleurs, les extraits de cannelle et de clou de girofle précipitent aux concentrations plus élevées (pur, 1/2 et 1/5), ce qui empêche toute exploitation de ces résultats.



**Figure 6 :** Toxicité des extraits purs d'épices (excepté pour la cannelle et le clou girofle dont les extraits sont respectivement dilués à 0,1 et 0,5) sur les cellules U87 après 3 répétitions. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) Aucune significativité n'a été trouvée par rapport au contrôle.

Il a été fait de même pour les légumes et le jus de choucroute (figure 7). Les résultats ne montrent aucune toxicité significative des extraits de légumes par rapport au contrôle. Il n'y a également pas de différences significatives entre les légumes et leurs homologues biologiques.

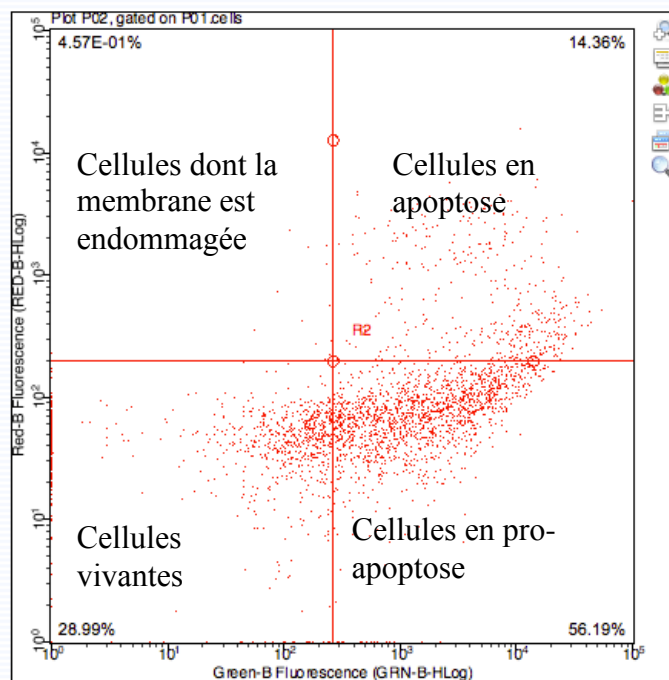


**Figure 7 :** Toxicité des extraits purs des légumes et du jus de choucroute sur les cellules U87 après 3 répétitions. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) Aucune significativité n'a été trouvée par rapport au contrôle.

## II.1.2 Apoptose

L'apoptose se mesure au cytomètre en flux qui va déterminer le nombre de cellules suivant les fluorescences associées. En fonction de ces dernières des régions sont définies grâce au contrôle positif et négatif et permettent d'obtenir un pourcentage de cellules qui sont soit vivantes, en pro-apoptose, en apoptose ou qui ont perdu leur intégrité membranaire (figure 8).

**Figure 8 :** Effet de l'extrait pur de *Cuminum cyminum* sur les cellules Jurkat en fonction de la fluorescence verte



(annexine-V/FITC) en abscisse et de la fluorescence rouge (IP) en ordonné, analysé à l'aide du logiciel InCyte.

À partir de ces analyses, il a été montré que parmi tous les extraits, ceux de thym, de cannelle, de clou de girofle, de muscade ont un effet positif sur l'apoptose avec respectivement

70,9 ± 1,7 %, 45,5 ± 0,1 %, 62,6 ± 7,9 %, et 43 ± 3,2 % de cellules en apoptose (figure 9). Ces extraits seront par la suite testés avec une gamme de concentration décroissante afin d'obtenir l'EC<sub>50</sub>. Ce pourcentage est en dessous de 3 % pour tous les extraits de légumes (figure 10). Le Célastral a bien induit chez la majorité des cellules une apoptose (98,6 ± 1,6 %).

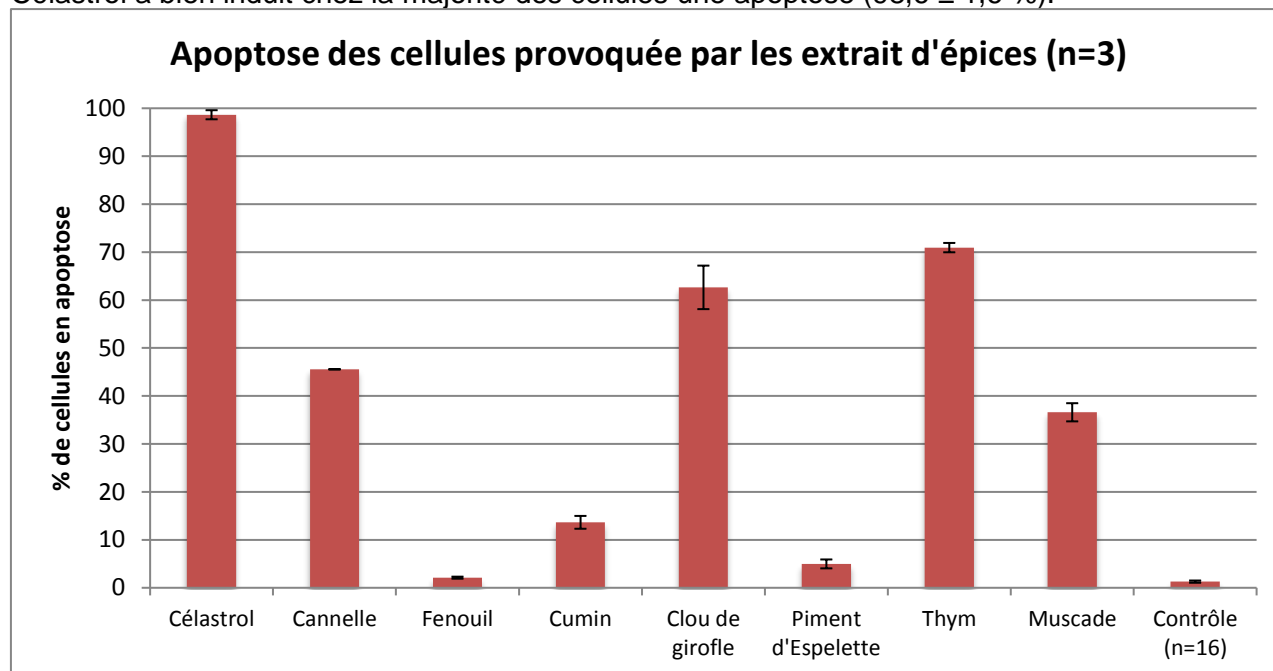


Figure 9 : Effet des extraits purs d'épices et de 1/5 pour le clou de girofle et 1/10 pour la cannelle, sur le nombre de Jurkat en apoptose. Contrôle négatif : 1,3 ± 1,2 % de cellules en apoptose.

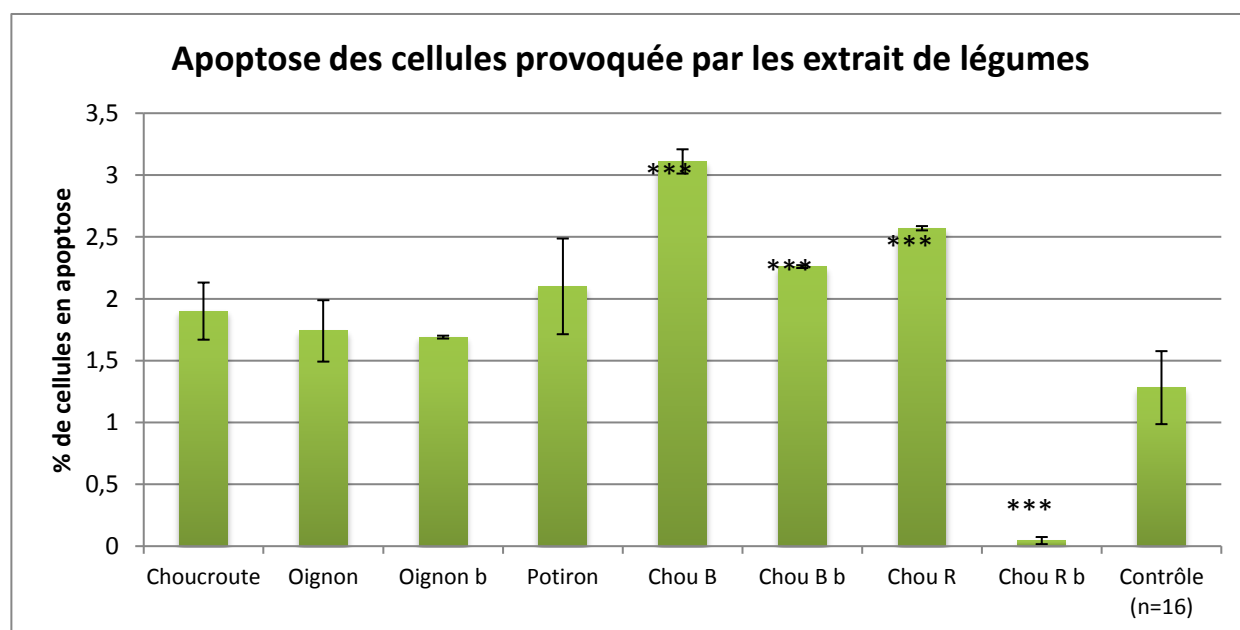
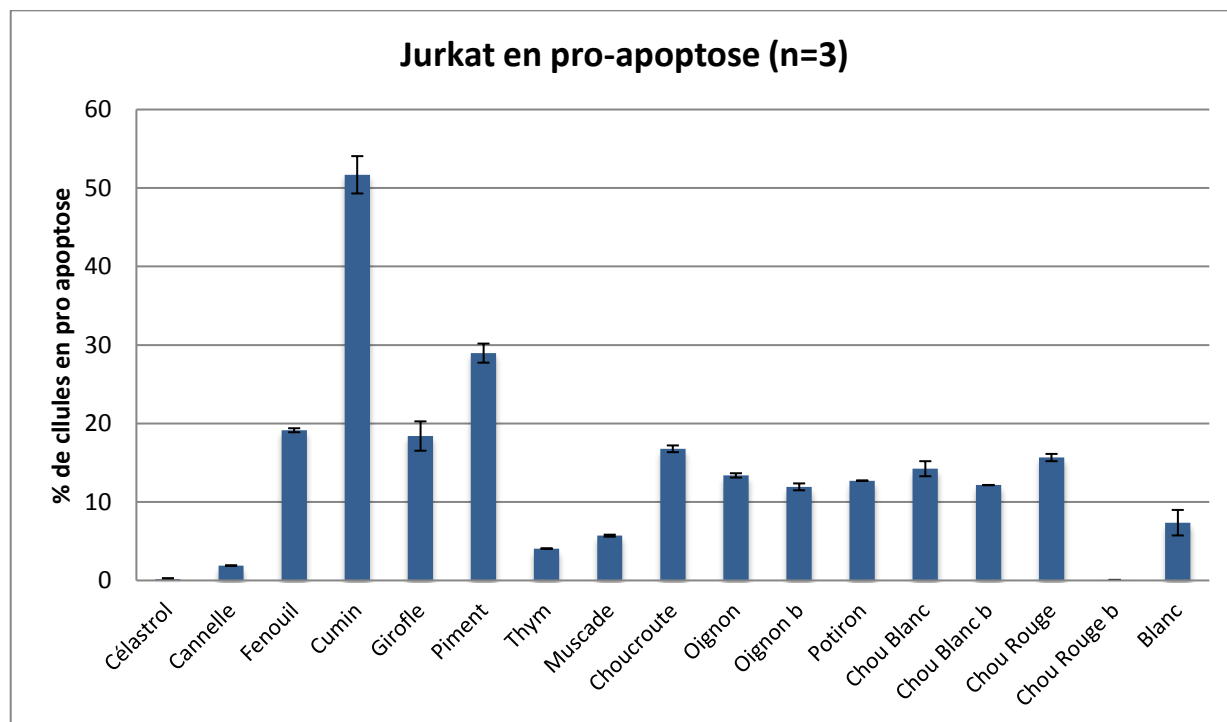


Figure 10 : Effet des extraits purs de légumes sur le nombre de Jurkat en apoptose. Contrôle négatif : 1,3 ± 1,2 % de cellules en apoptose. (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005)

Le cumin bien que son pourcentage de cellules en apoptose soit inférieur à 14 ± 0,8 % %, montre la plus grande quantité de cellule en pro-apoptose 51,6 ± 2,0 % % contre 7,4 ± 1,2 % % pour le contrôle négatif (figure 11). Il y a donc un effet du cumin qui induit le phénomène d'apoptose mais avec moins de vigueur que les extraits de clou de girofle ou de cannelle.

Aucun extrait n'a montré de toxicité (perte de l'intégrité membranaire), ce qui concorde avec les résultats obtenus sur les U87 précédemment (données non présentées ici).



**Figure 11 :** Effet des extraits purs d'épices et de légumes (1/5 pour le clou de girofle et 1/10 pour la cannelle), sur les cellules Jurkat en pro apoptose. Ces cellules sont encore vivantes mais possèdent le signal d'apoptose sur leur membrane. b = biologique.

## II.2 TESTS ANTIOXYDANTS

Les activités obtenues pour chaque méthode ont des résultats significativement différents pour la majorité des extraits (figure 12 et 13). Un mécanisme d'oxydation se réalise donc préférentiellement à un autre, excepté pour la cannelle, le piment, la choucroute, le chou blanc et le potiron.

Le potentiel antioxydant des extraits pour la méthode TEAC est le suivant du plus fort au plus faible : *S. aromaticum* > *C. verum* > *T. vulgaris* > *M. fragrans* > *C. cyminum* > *F. vulgare* > *C. annuum* > *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra* > *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra* bio > *A. cepa* bio > *A. cepa* > *B. oleracea* var. *capitata* f. *alba* bio > *C. Maxima* > jus de choucroute > *B. oleracea* var. *capitata* f. *alba*.

L'ordre n'est que peu changé pour la méthode ORAC pour les épices : *S. aromaticum* > *C. verum* > *T. vulgaris* > *M. fragrans* > *C. cyminum* > *C. annuum* > *F. vulgare* > *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra* > *A. cepa* > *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra* bio > *C. Maxima* > *A. cepa* bio > jus de choucroute > *B. oleracea* var. *capitata* f. *alba* > *B. oleracea* var. *capitata* f. *alba* bio. La tendance reste la même que pour la méthode TEAC sauf pour le fenouil dont l'activité augmente et pour le piment dont l'activité diminue.

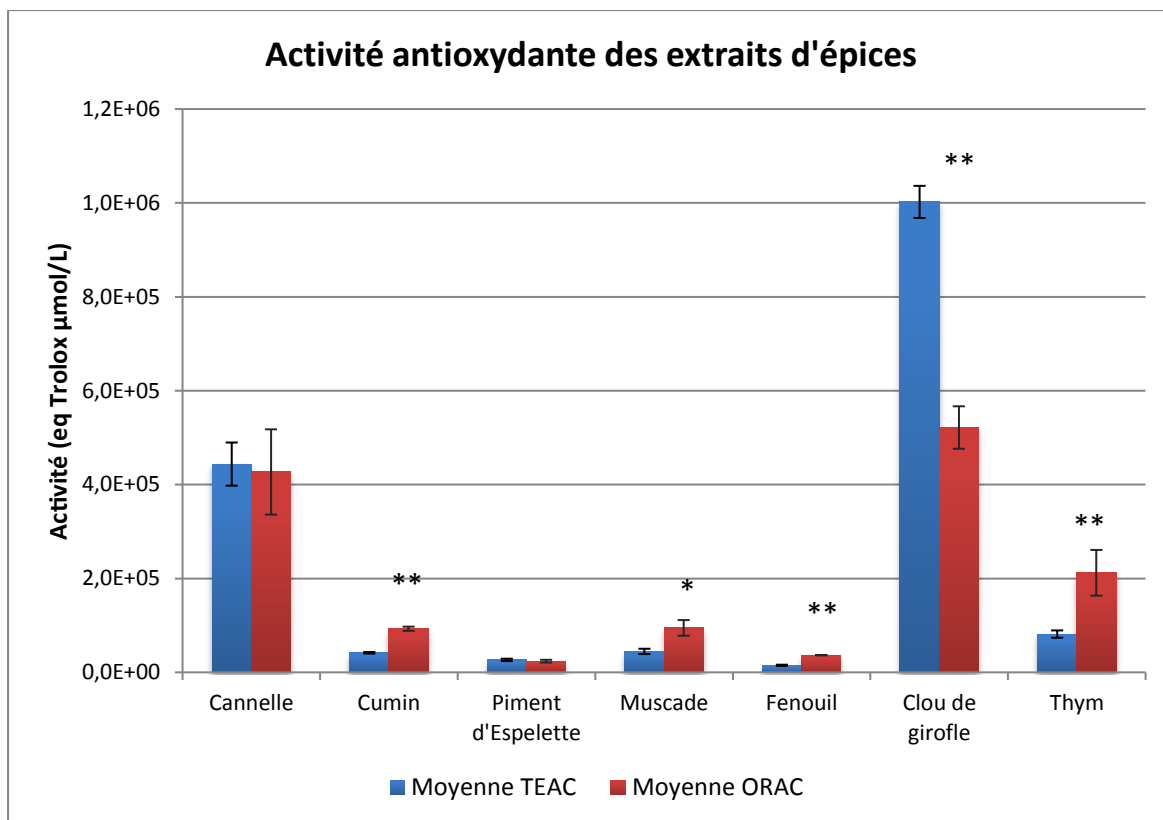


Figure 12 : Activité antioxydante des extraits d'épices en équivalent Trolox. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre les 2 méthodes TEAC et ORAC)

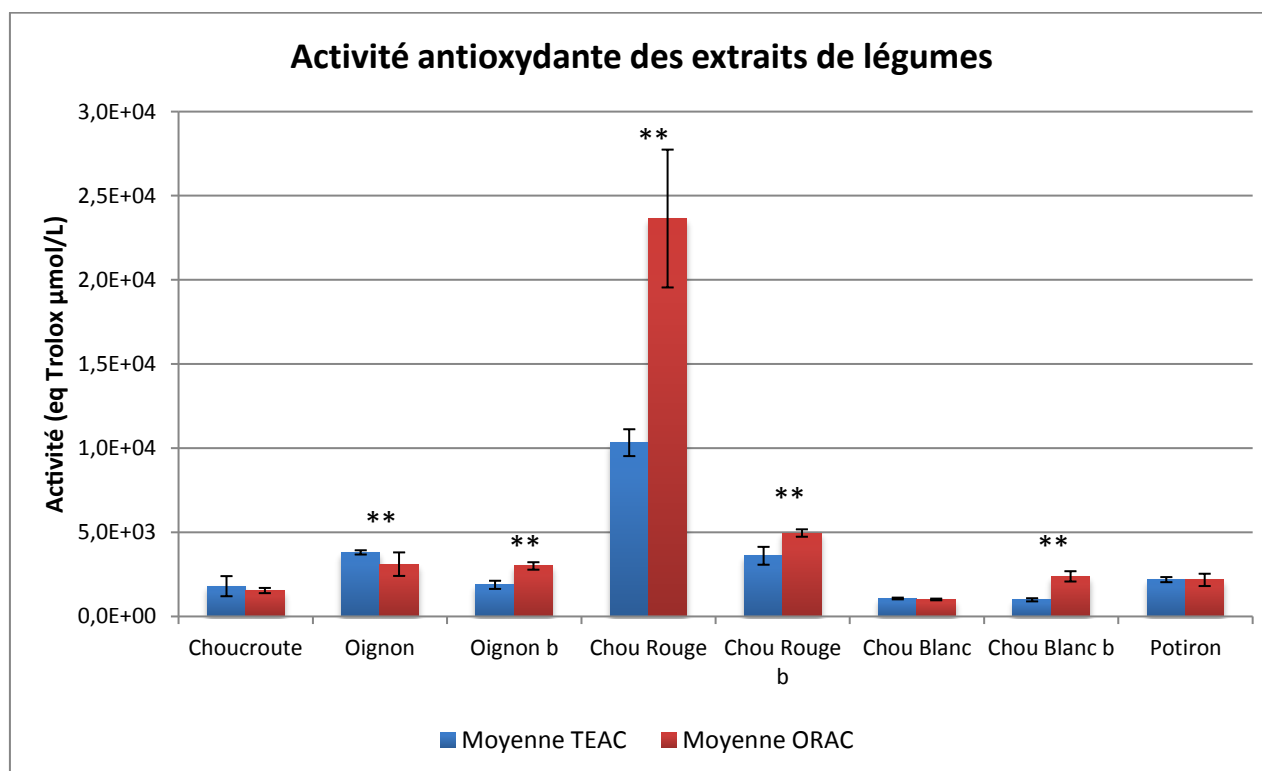


Figure 13 : Activité antioxydant des extraits de légumes en équivalent Trolox. b= biologique (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre les 2 méthodes TEAC et ORAC)

De façon générale, les légumes biologiques ont une activité antioxydante moins forte que leurs homologues non biologiques, excepté pour le chou blanc biologique avec la méthode

ORAC ( $2381 \pm 306$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) qui est plus antioxydant que le chou blanc non bio ( $1010 \pm 50$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) (figure 13).

Les résultats expérimentaux obtenus ont montré que les épices ont une activité antioxydante beaucoup plus importante que les légumes (jusqu'à 100 fois plus entre le clou de girofle ( $1.002.150 \pm 34.220$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) et le chou rouge ( $10.330 \pm 800$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) pour la TEAC), et ceci concorde pour les deux méthodes.

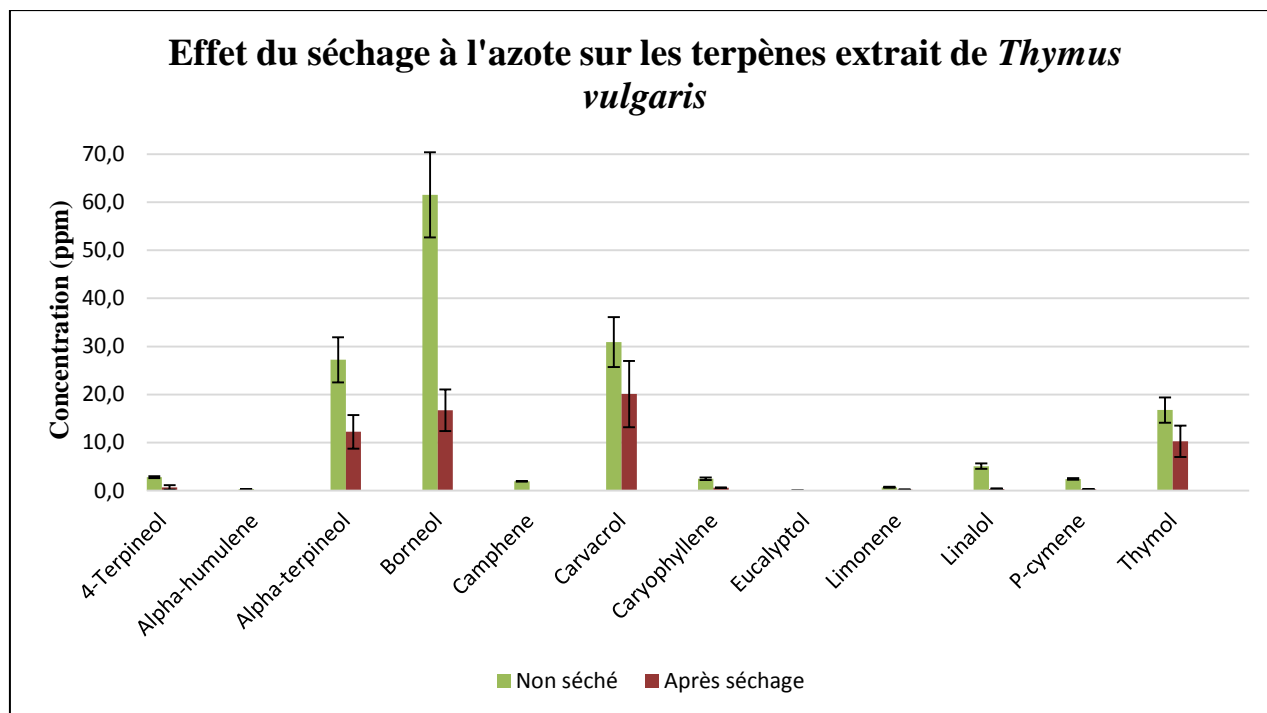
Afin de comparer les résultats avec ceux de la littérature, il était important d'avoir une valeur de la concentration des extraits. Les extraits ont donc été séchés sous azote (TurboVap® LV, Biotage). Une pesé avant et après séchage permet d'obtenir une concentration, ces résultats sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Concentration des extraits purs après séchage sous azote pour 3g d'épice et 5g de légumes ; concentration des extraits purs en contact avec les cellules lors des tests biologiques, ramené à 1g d'extrait sec.

	Concentrations des extraits purs (mg/mL)	Concentrations des extraits purs au contact des cellules (µg/mL)
Clou de girofle	146,4	488,0
Piment d'Espelette	84,2	280,0
Cumin	41,6	138,0
Oignon	68,1	136,0
Thym	39,7	132,0
Muscade	24,3	81,0
Cannelle	23,1	77,0
Chou Blanc	27,2	54,4
Chou Blanc bio	24,4	48,8
Chou Rouge	22,3	44,6
Oignon bio	22,1	44,3
Choucroute	20,8	41,6
Chou Rouge bio	13,8	27,6
Fenouil	7,7	25,7
Potiron	8,0	16,0

Afin de vérifier si ces concentrations sont correctes, les extraits sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avant et après séchage afin de vérifier qu'il n'y a pas de perte trop importante des terpènes. La figure 14, pour le thym, montre qu'il y a bel et bien une perte. Certains terpènes ne sont plus détectables alors que d'autres ont une baisse de concentration importante par rapport à l'extrait n'ayant pas subi de séchage. En effet, les terpènes étant des composés organiques volatiles (COV), et qui sont donc volatiles à température ambiante, leur conservation est plus difficile. Des résultats similaires ont été observés sur les autres épices (Annexe II).





**Figure 14 :** Effet du séchage sous azote sur la concentration des terpènes de l'extrait de *Thymus vulgaris*, analysé en chromatographie en phase gazeuse. (Zélie Triaux, 2017)

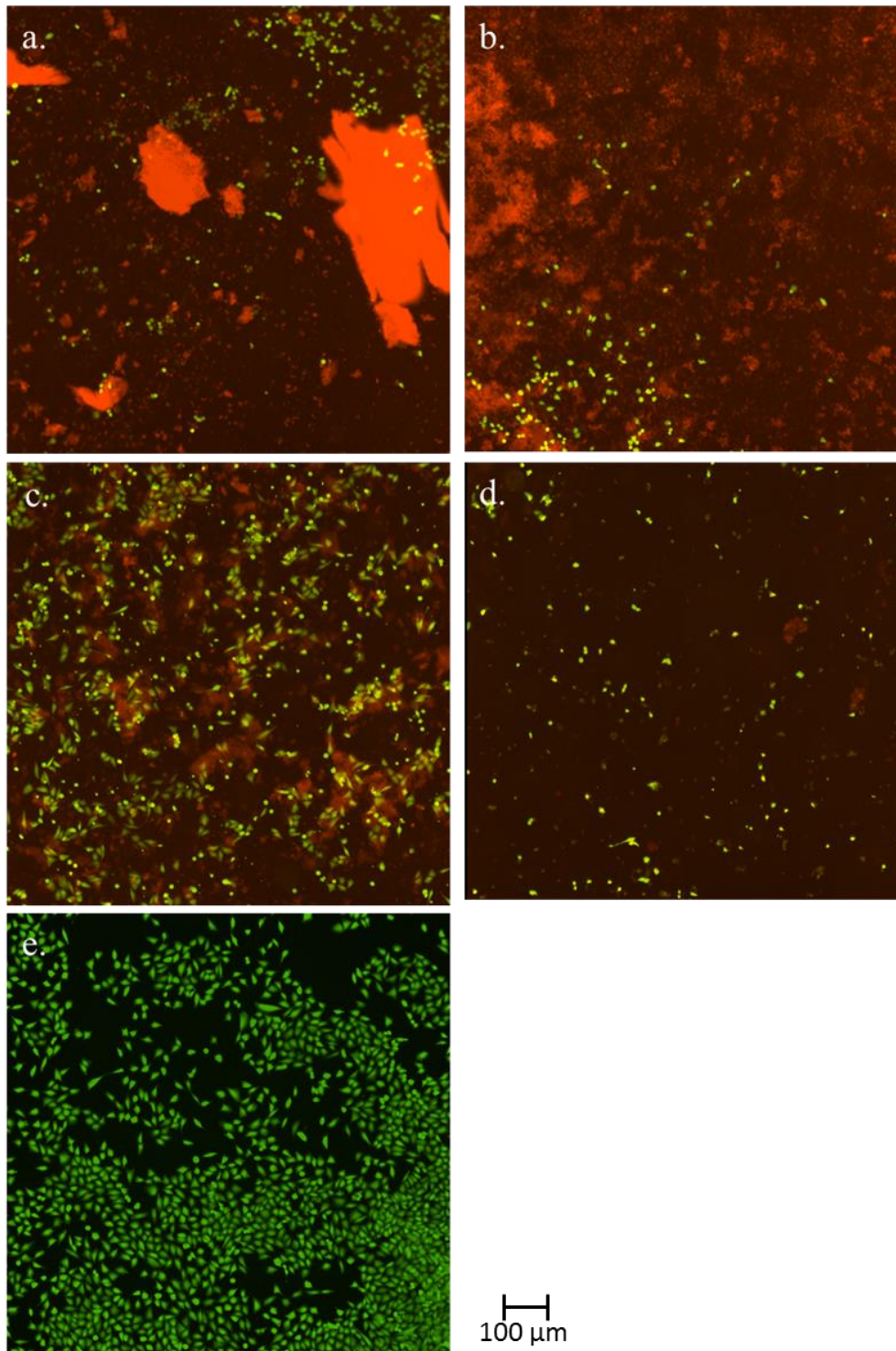
Une seconde méthode de séchage par évaporation rotative (Heidolph VV 2000) a été essayée pour l'extrait de thym, afin de vérifier si ce séchage plus doux permettrait de conserver la bonne concentration des terpènes. Bien que la diminution de concentration des terpènes soit plus faible, un résultat similaire au séchage à l'azote a été obtenu pour le séchage par évaporateur rotatif (Annexe III).

La concentration des extraits est donc, en réalité, plus élevée que celle mesurée. La perte observée pour la concentration des terpènes est plus ou moins importante selon les extraits. Ces concentrations serviront tout de même de point de comparaison pour la suite.

### III.1 TOXICITÉ DES EXTRAITS

De nombreux tests de toxicité existent que ce soit sur les lignées cellulaires cancéreuses ou non, par formation de « précipités chromophores » (MTT, LDH (lactate déshydrogénase)), avec différents colorants (IP, Annexine V-FITC, mitotracker™, bleu trypan, ...) ou encore sur des modèles in vivo. Tous ces tests ne mesurent pas le même type de toxicité. Bien que le test MTT soit le plus répandu, l'un des défauts de ce test est l'interférence de molécules antioxydantes avec le test (oxydation du substrat par les enzymes mitochondriales). Les épices ayant démontrées un fort potentiel antioxydant dans la littérature, ce test a été écarté. Les tests effectués lors de ce projet avec la calcéine, met en avant la perturbation de l'intégrité membranaire, alors que celui avec l'Annexine V étudie l'apoptose des cellules. Les autres formes de toxicité (autophagie, oncosé, pyroptose, pyronécrose...) ne seront pas discutées ici (Marie Bénétteau, 2006).

### III.1.1 Intégrité membranaire



**Figure 15 :** *a. Précipité formé par l'extrait pur de Cinnamomun verum. b. Précipité formé par l'extrait pur Syzgium aromaticum. c. Précipité formé par l'extrait de Cinnamomun verum dilué au 1/5. d. Précipité formé par l'extrait de Syzgium aromaticum dilué au 1/5. e. Puits contrôle sans extrait. Images réalisées au cytomètre à image avec marquage à l'IP (fluorescence rouge) et à la calcéine (fluorescence verte).*

Tous les extraits testés ici ne perturbent pas l'intégrité membranaire. Les épices et légumes étudiés étant utilisés et consommés depuis des générations, les résultats ne sont pas surprenants.

Les extraits purs de cannelle et de girofle sont peu solubles dans le solvant éthanol/eau et précipitent ou cristallisent parfois dans les milieux de cultures utilisés (figure 15). La haute

concentration en NaCl des milieux (6,4 g/L pour le DMEM et 6,0 g/L pour le RPMI) peut expliquer ce phénomène. Ainsi non seulement la concentration finale serait faussée mais la précipitation de l'extrait rend impossible la lecture au cytomètre à image de par la fluorescence rouge générée.

Lorsque les dilutions des extraits brutes sont plus élevées une baisse du pourcentage de cellules vivantes reste notable. En effet, sur la figure 15d, bien qu'il n'y est plus aucun précipité, le nombre de cellules vivantes restent plus faible que pour le contrôle. De même pour la figure 15c, les cellules vivantes sont bien visibles, mais elles sont moins concentrées et de formes arrondies, ce qui pourrait présager un détachement des cellules, détachement précurseur d'une potentielle mort à venir.

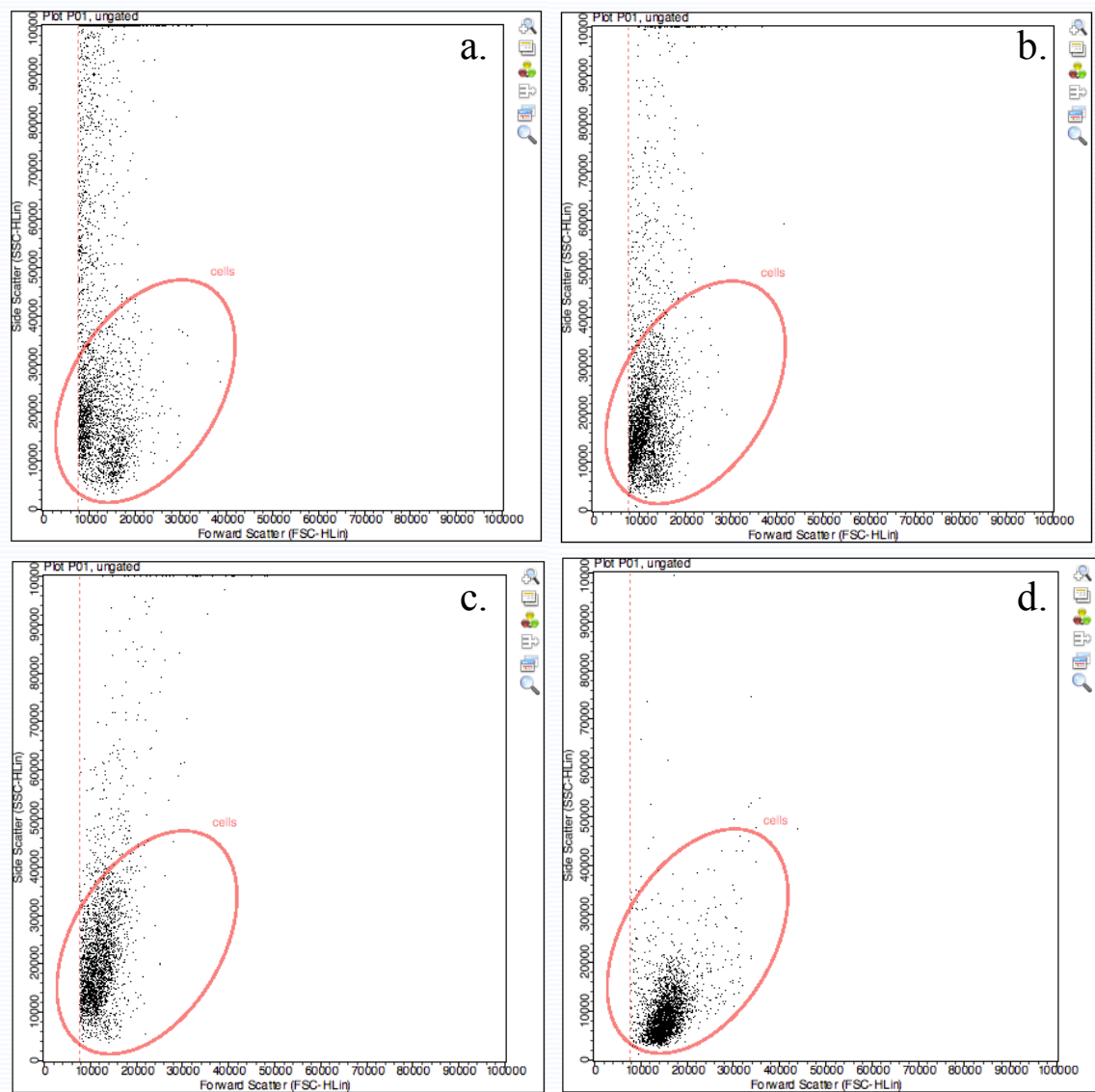
Une étude réalisée sur des monocytes humains (Gunawardena, 2015) montre qu'un extrait éthanolique (obtenu par ASE) de *C. verum* présente une  $LC_{50}$  de  $646 \pm 46 \mu\text{g/mL}$ , une valeur équivalente à l'extrait brut de ce mémoire. Ces résultats concorderaient donc avec l'innocuité des extraits de cannelle sur l'intégrité membranaire.

En revanche pour le clou de girofle, une étude réalisée avec de l'huile essentielle sur des fibroblastes humains montre une toxicité (Prashar et al., 2006) qui serait directement imputable à l'eugénol présent en forte concentration, tout comme dans l'extrait réalisé par PLE. Ces résultats associés à ceux présentés ici indiquent une toxicité potentielle de *S. aromaticum*.

L'extrait à la toxicité la plus faible est celui de *Foeniculum vulgare* avec  $93 \pm 0,6 \%$  de cellules vivantes une valeur équivalente au contrôle ( $90 \pm 1,2 \%$ ). Cette légère cytoprotection des extraits de fenouil avait déjà été prouvée par Pradhan et al., (2008) envers des lymphocytes humains. Un extrait méthanolique contient plus de molécules qu'un extrait éthanolique, cela pourrait expliquer cette différence. La cytoprotection potentielle du fenouil pourrait être due à un ensemble de molécules dont certaines se trouvent uniquement dans les extraits méthanoliques.

### III.1.2 Apoptose

Certains extraits comme ceux *C. verum*, influence en cytométrie de flux la réfringence et la complexité relative interne (SSC), signe d'un stress des cellules. La porte (taille et granulation) définie lors de l'analyse, se doit d'englober la totalité des cellules, sinon cela diminuerait les valeurs de l'induction apoptotiques de ces extraits. Or la forte complexité relative interne des cellules provoquées par certains extraits ne permet pas de prendre en compte la totalité des cellules (figure 16).



**Figure 16 :** Répartition des cellules en fonction de leur taille (abscisse) et de leur granulosité interne (ordonnée) au logiciel InCyte. **a.** extrait de cannelle, **b.** extrait de clou de girofle, **c.** extrait de Thym (résultat semblable pour la muscade), **d.** contrôle sans extrait.

L'extrait dilué à 1/10<sup>e</sup> de cannelle (concentration estimée à 15,4 µg/mL) montre une induction de l'apoptose. Une étude réalisée sur l'extrait aqueux confirme également cet effet en précisant qu'il viendrait d'un dérèglement du potentiel de la membrane mitochondriale (Koppikar et al., 2010). Un test au mito tracker pourrait valider cette hypothèse. Un pourcentage très faible de cellules (4,8 %) a perdu son intégrité membranaire confirmant le test à la calcéine.

L'extrait de *C. cyminum* bien que ne provoquant pas l'apoptose, favorise la pro-apoptose selon les résultats de ce mémoire (figure 11). Une étude réalisée sur des cellules de rat, PC12, montre également cette tendance, bien que l'extrait testé ne déclenche pas la mort des cellules (Morshedi et al., 2014).

Des extraits déterminés comme non toxiques par la méthode à la calcéine, ont cependant donné des résultats positifs pour l'induction de l'apoptose. La toxicité de ces extraits agirait donc selon un mode différent. La présence de l'IP dans le test à l'Annexine-V confirme qu'il n'y a pas d'activité toxique sur l'intégrité membranaire des cellules, que ces dernières soient adhérentes ou non. Cependant les résultats de ces tests peuvent varier suivant la lignée cellulaire utilisée, c'est pourquoi un test à l'Annexine sera également fait sur les THP-1 et RAJI.

Le test à l'Annexine-V qui mesure l'apoptose est également un test permettant de voir le potentiel anti-cancéreux d'un extrait. En effet, lors d'un cancer les cellules ne répondent plus à l'injonction de passer en apoptose données par les cellules immunitaires, entraînant alors une prolifération illimitée des cellules. Des extraits qui seraient capable de redéclencher l'apoptose pourrait alors être de bon candidat pour de futurs médicaments. De plus, les 4 extraits qui ont cette capacité (cannelle, clou de girofle, thym et muscade) n'influent pas sur l'intégrité membranaire. Réaliser ce même test à l'Annexine-V sur une lignée cellulaire, non plus cancéreuse, mais saine (lignée humain BJ par exemple), permettrait de mettre en avant si l'induction de l'apoptose est spécifique à des cellules cancéreuses.

### III.2 ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante des épices est bien plus importante que celle des légumes, cela peut s'expliquer par le fait que les épices sont plus concentrés en molécules actives que ces derniers (tableau 1). L'oignon est le plus concentré des légumes, même plus que certaines épices, mais il ne possède pas l'activité antioxydante la plus forte des légumes ( $3806 \pm 126$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$  en TEAC) qui est détenu par le chou rouge non biologique ( $23.645 \pm 4000$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$  en ORAC et  $10.330 \pm 800$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$  en TEAC). Le classement des pouvoirs antioxydants ne suit pas celui des concentrations estimées des extraits bruts.

Les légumes biologiques sont moins concentrés que les non biologiques et ont des activités antioxydantes plus faible. Cependant, après avoir fait des tests statistiques entre les légumes biologiques et non biologiques (tableau 2), la différence est significative dans la majorité des cas. Il y a donc bien un effet des pesticides notamment sur le chou rouge non bio qui a un effet antioxydant 4,7 fois plus grand ( $23.645 \pm 4000$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) que celui du chou rouge biologique ( $5000 \pm 220$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) par la méthode ORAC et 2,8 fois plus grand par la méthode TEAC. Il en est de même pour l'oignon et la méthode TEAC. À l'inverse, le chou blanc biologique a un pouvoir plus antioxydant ( $2400 \pm 300$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) que son homologue non bio ( $1000 \pm 50$  eq Trolox  $\mu\text{mol/L}$ ) par la méthode ORAC.

*Tableau 2 : P-value des tests de Student effectués entre les légumes biologiques et non biologiques pour un même test d'antioxydant. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )*

	ORAC	TEAC
Oignon	0,53	$3,96 \cdot 10^{-6***}$
Chou rouge	0,001***	$2,15 \cdot 10^{-8***}$
Chou blanc	$5,79 \cdot 10^{-5***}$	0,07

Les extraits obtenus par la méthode PLE contiennent des terpènes, mais pas uniquement. Ils peuvent également contenir des polyphénols qui sont majoritairement responsable de l'activité antioxydante. Pérez-Jiménez (2010), recense les 100 sources de nourritures les plus riches en phénols. Avec plus de 20 items, les épices sont les plus représentées du classement, les légumes arrivant en 4<sup>ème</sup> position avec 16 items. En tête du classement, le clou de girofle a le pouvoir antioxydant le plus important, ainsi que le contenu phénolique le plus important, suivit par la cannelle de Ceylan. Ces résultats concordent avec ceux trouvés ici. Le cumin arrive 11<sup>e</sup>, thym 15<sup>e</sup> et l'oignon jaune 64<sup>e</sup> or dans les résultats présentés ici, le thym est 3<sup>e</sup> et la muscade est 4<sup>e</sup> devant le cumin. Il n'y a donc pas que les polyphénols qui jouent sur l'activité antioxydante. Le thym possède du thymol et du carvacrol qui sont 2 terpènes phénols antioxydants (Aeschbach et al. 1993). L'activité antioxydante des terpènes est encore peu évaluée aujourd'hui par rapport à la quantité de terpènes différents qui existe (**González-Burgos et Gómez-Serranillos, 2012**). **Réaliser les tests antioxydants sur des étalons des terpènes compris dans les extraits permettrait de comprendre mieux l'activité de ces derniers.**

Une étude de Ninfali et al. (2005), mesure la capacité antioxydante d'extrait d'épice et de

légume imputable au contenu phénolique par la méthode ORAC. Pour le thym, l'activité trouvée est semblable à celle observé dans ce mémoire (274 250 TE contre 212 000 TE environ dans ce mémoire), de même pour le fenouil (36 100 TE contre 36 600 TE). La majorité du pouvoir antioxydant de ces extraits vient donc potentiellement du contenu phénolique. À contrario, le cumin a une activité mesurée à 92 900 TE dans ce mémoire contre 768 000 TE dans l'article, l'oignon également a une activité mesurée à seulement 3 100 TE contre 34 200 TE dans l'article. Cela indique que la méthode d'extraction utilisée (PLE) ne permet pas d'extraire tous les phénols (ce qui n'est pas le but), et donc que l'activité antioxydante calculée ne peut pas lui être entièrement imputable.

Pour la méthode TEAC, la lecture de l'absorbance se fait directement après la mise en plaque et l'incubation de 10 min. Cependant rien n'indique que la cinétique de la réaction est finie. La lecture se fait à un instant  $t$  donné, il faudrait donc réévaluer l'absorbance à différents temps  $t + n$  pour s'assurer que le pouvoir anti oxydant mesuré est à son maximum.

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

En conclusion, les légumes, peut-être parce qu'ils moins riches en molécules actives et qu'ils ont des propriétés antioxydantes plus faibles, restent les moins étudiés (notamment au niveau des terpènes) bien que moins toxiques que les épices testées. Parmi tous les légumes, le chou rouge semble le plus prometteur (le plus antioxydant tout en étant non toxique). Chez les épices, les extraits ayant le plus fort potentiel antioxydant sont aussi ceux ayant le plus fort pourcentage d'induction d'apoptose. La détermination de l'EC<sub>50</sub> ainsi que le test d'apoptose sur les THP-1 permettra de déterminer à quel point ces extraits sont néfastes pour les cellules. De plus, seulement deux formes de « toxicité » ont été ici évaluées (intégrité membranaire et apoptose). D'autres tests, comme celui de la respiration cellulaire mitochondriale, pourraient être réalisés afin de préciser la toxicité de *Ceylanicum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* et *Myristica fragrans* (test Mitotracker®).

Si un extrait anti-inflammatoire est souvent antioxydant, la réciproque n'est pas vraie. Il n'est donc pas possible de prédire l'activité anti-inflammatoire à la seule vue des résultats des tests antioxydants. Cependant, dans la littérature, l'une des propriétés des épices est de réduire l'inflammation que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Il est donc probable que les conclusions obtenus sur l'activité antioxydante soit équivalentes à celle de l'activité anti-inflammatoire.

Ce mémoire s'inscrit dans la partie biologique de la première année du projet TERPAIN. Dans un futur très proche, les tests anti-inflammatoires seront réalisés afin d'optimiser le protocole et d'avoir de premiers résultats concernant cette propriété. Les tests cellulaires pourraient également être réalisés avec une meilleure optimisation de la méthode (cycle plus long afin d'extraire le maximum de terpènes par exemple). Les différents tests réalisés ici serviront par la suite de protocole à suivre pour des extraits issus de plantes innovantes, peu étudiées mais usuelles. La seconde partie, en biologie, consistera à réaliser un fractionnement bio-guidée afin d'isoler les fractions ayant le plus de potentiel (i.e. ayant des composés anti-inflammatoires, non toxique, avec des terpènes peu analysés ou inconnus). Enfin, si la fraction sélectionnée contient des terpènes encore non référencés, leur identification se devra d'être faite.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aeschbach, R., Lölliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. et Aruoma, O. I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*. **1993**. Vol. 32, n°1, 31-36.
- Aruoma, O. I., Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*. **1998**. Vol. 75, n°2, 199-212.
- Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A. et Sollars, D., Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. *Journal of herbal pharmacotherapy*. **2004**. Vol. 4, n°1, 49-67.
- Bénéteau, Marie. *La modulation de l'apoptose dépendante du récepteur Fas: étude des évènements précoces de la voie de signalisation apoptotique dans un modèle de lymphocytes T humains*. **2006**. Thèse de doctorat en sciences biologiques et médicales. Université Bordeaux 2, n°1328. 192 p.
- Caili, F. U., Huan, S. et Quanhong, L. I., A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant foods for human nutrition*. **2006**. Vol. 61, n°2, 70-77.
- Chirathaworn C., Kongcharoensuntorn W., Dechdougchan T., Lowanitchapat A., Sa-nguanmoo P. et Poovorawan Y., *Myristica fragrans* houtt. methanolic extract induces apoptosis in a human leukemia cell line through SIRT1 mRNA downregulation. *Journal of the Medical Association of Thailand*. **2007**. Vol. 90, n°11, 2422-8.
- Cortés-Rojas, D.F., de Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2014**. Vol. 4, n°2, 90-96.
- Cuenca Clara., *Mise au point et optimisation de techniques d'extraction et analyse des terpènes*. **2016**. Mémoire de fin d'étude, Université de Barcelone, faculté de pharmacie, 59 p.
- Dibazar, S. P., Fateh, S. et Daneshmandi, S., Clove (*Syzygium aromaticum*) ingredients affect lymphocyte subtypes expansion and cytokine profile responses: An in vitro evaluation. *Journal of food and drug analysis*. **2014**. Vol. 22, n°4, 448-454.
- Dunja S., Pavlović I. et Salopek-Sondi B., White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*. **2016**. Vol. 16, 117-135.
- Edet, Fabienne. *La cannelle de Ceylan et ses activités biologiques*. **2004**. Thèse : d'exercice, Pharm., Faculté de pharmacie de Grenoble, n°7030. 157 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) – FAOSTAT [en ligne] <http://www.fao.org/faostat/> consulté le 07/02/2017
- Farhan A. K., Tariq M., Muhammad A., Abdul S. et Aneela M., Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. *Natural product research*, **2013**. V. 18, n°16, 1267-1274.
- Feng, L., Zhang, D., Fan, C., Ma, C., Yang, W., Meng, Y. et Liu, X., ER stress-mediated apoptosis induced by celastrol in cancer cells and important role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the signal network. *Cell death & disease*. **2013**. Vol. 4, n°7, e715.
- Gershenson, J. et Dudareva, N., The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. **2007**, Vol. 3, n°7, 408-414.
- Gonzalez-Burgos, E. et Gomez-Serranillos, M. P., Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current medicinal chemistry*. **2012**. Vol. 19, n°31, 5319-5341.
- Gunawardena, D., Karunaweera, N., Lee, S., Kooy, F., Harman, D. G., Raju, R., Bennett, L., Gyengesi, E., Sucher, N. J. et Münch, G., Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts – identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. *Food & Function*. **2015**. Vol. 6, n°3, 910-919.
- Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale) [en ligne] <https://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/douleur> consulté le 23/05/2017
- Johri, R. K., *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update. *Pharmacognosy Reviews*. **2011**.



Vol. 5, n°9, 63-72.

- Koppikar, S. J., Choudhari, A. S., Suryavanshi, S. A., Kumari, S., Chattopadhyay, S. et Kaul-Ghanekar, R., Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. *BMC cancer*. **2010**. Vol. 10, n°1, 210.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Gutierrez-Praena, D., Angeles, J. et Camean, A., M., In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review. *Food and Chemical Toxicology*. **2015**. Vol. 81, 9-27.
- Mahmoud, I., Alkofahi, A. et Abdelaziz, A., Mutagenic and Toxic Activities of Several Spices and Some Jordanian Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacognosy*. **1992**. Vol. 30, n°2, 81-85.
- Morshedi, D., Kesejini, T. S., Aliakbari, F., Karami-Osboo, R., Shakibaei, M., Marvian, A. T., Khalifeh M. et Soroosh, M., Identification and characterization of a compound from *Cuminum cyminum* essential oil with antifibrillation and cytotoxic effect. *Research in pharmaceutical sciences*. **2014**. Vol. 9, n°6, 431.
- Nabergoj, Dominik. *Evaluation of anti-inflammatory and proapoptotic activities of synthetic clathrocin analogues in human THP-1 monocytic leukemia cells*. **2014**. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. 49p.
- Nagja, T., Vimal, K. et Sanjeev, A., *Myristica fragrans*: A comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **2016**. Vol. 8, n°2, 27-30.
- Nogueira, M. N. M., Aquino, S. G., Junior, C. R., et Spolidório, D. M. P., Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflammation Research*. **2014**. Vol. 63, n°9, 769-778.
- Orłowska, M., Stanimirova, I., Staszek, D., Sajewicz, M., Kowalska, T. et Waksmundzka-Hajnos, M., Optimization of Extraction Based on the Thin-Layer Chromatographic Fingerprints of Common Thyme. *Journal of AOAC International*. **2014**. Vol. 97, n°5, 1274-1281.
- Parsaei, P., Bahmani, M., Naghdi, N., Asadi-Samani, M. et Rafieian-Kopaei, M., A review of therapeutic and pharmacological effects of thymol. *Der Pharmacia Lettre*. **2017**. Vol. 8, n°2, 150-154.
- Pick, N., Cameron, S., Arad, D. et Av-Gay, Y., Screening of compounds toxicity against human Monocytic cell line-THP-1 by flow cytometry. *Biological Procedures Online*. **2004**. Vol. 6, n°1, 220-225.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F. et Scalbert, A., Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition*. **2010**. Vol. 64, S112-S120.
- Pradhan, M., Sribhuaneswari, S., Karthikeyan, D., Minz, S., Sure, P., Chandu, A. N., Mishra, U., Kamalakannan, K., Sivakumar, A. et Saravanankumar T., In-vitro Cytoprotection Activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in Cultured Human Blood Lymphocytes and Antitumour Activity against B16F10 Melanoma Cell Line. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. **2008**. Vol. 1, n°4.
- Prakash E. et Gupta D. K., Cytotoxic activity of ethanolic extract of *Myristica fragrans* (Houtt) against seven human cancer cell lines. *Universal Journal of Food and Nutrition Science*. **2013**. Vol. 1, 1-3.
- Prashar, A., Locke, I. C. et Evans, C. S., Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*. **2006**. Vol. 39, n°4, 241-248.
- Rao, P. V., et Gan, S. H., Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2014**. Vol. 2014, 12.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B.A. et Qurishi, M. A., *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*. **2016**. Vol. 9, Supplement 2, S1574-S1583.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. et Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**. Vol. 26, n°9-10, 1231-1237.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N. et Pohl, C., Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*. **1996**.

- Vol. 68, n°6, 1033-1039.
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., et Cortés-Diéguéz, S., Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. *Industrial Crops and Products*. **2014**. Vol. 52, 528-536.
- Srinivasan, K., Role of spices beyond food flavoring: nutraceuticals with multiple health effects. *Food reviews international*. **2005**. Vol. 21, 167-188.
- Srinivasan, K., Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annuum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Food Science and Nutrition*. **2016**. Vol. 56, n°9, 1488-500.
- The Plant List [en ligne] <http://www.theplantlist.org/> consulté le 13/05/2017
- Upadhyay, R. K., Nutraceutical, pharmaceutical and therapeutic uses of *Allium cepa*: A review. *International Journal of Green Pharmacy*. **2016**. Vol. 10, n°1.
- Van Der Werf, Remmelt, *Evaluation du pouvoir anti-oxydant des aliments : recherche de leurs effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète*. **2013**. Thèse de doctorat : Chimie/Chimie Analytique. Université de Strasbourg. N° 2013STRAF049. 243p.
- Venkatesha, S. H., Dudics, S., Astry, B. et Moudgil, K. D., **2016**. Control of autoimmune inflammation by celastrol, a natural triterpenoid. *Pathogens and Disease*. **2016**. Vol. 74, n°6.

# ANNEXE I : LISTE DES NOMS BOTANIQUES DES PLANTES ANALYSÉES

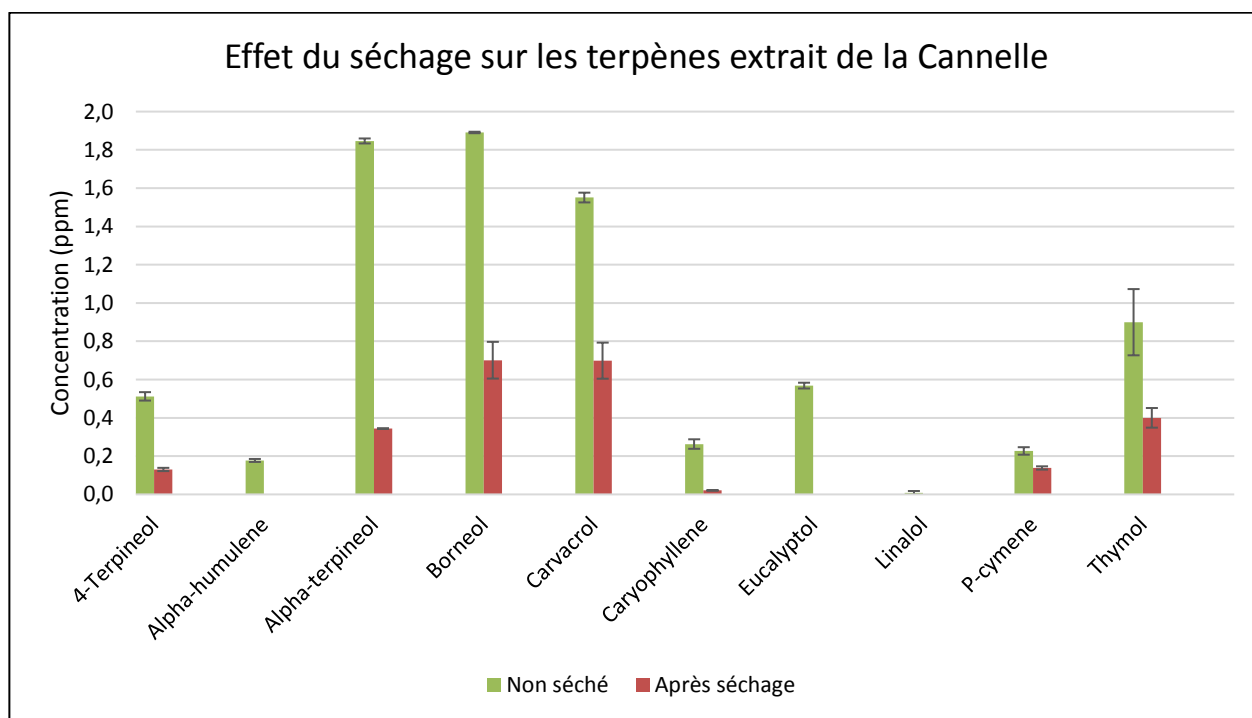
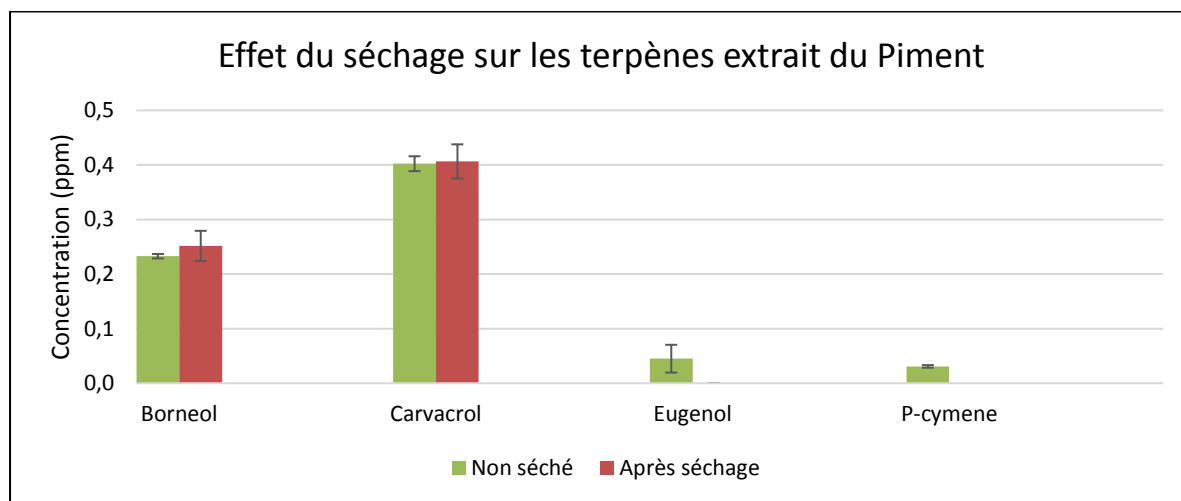
## Épices

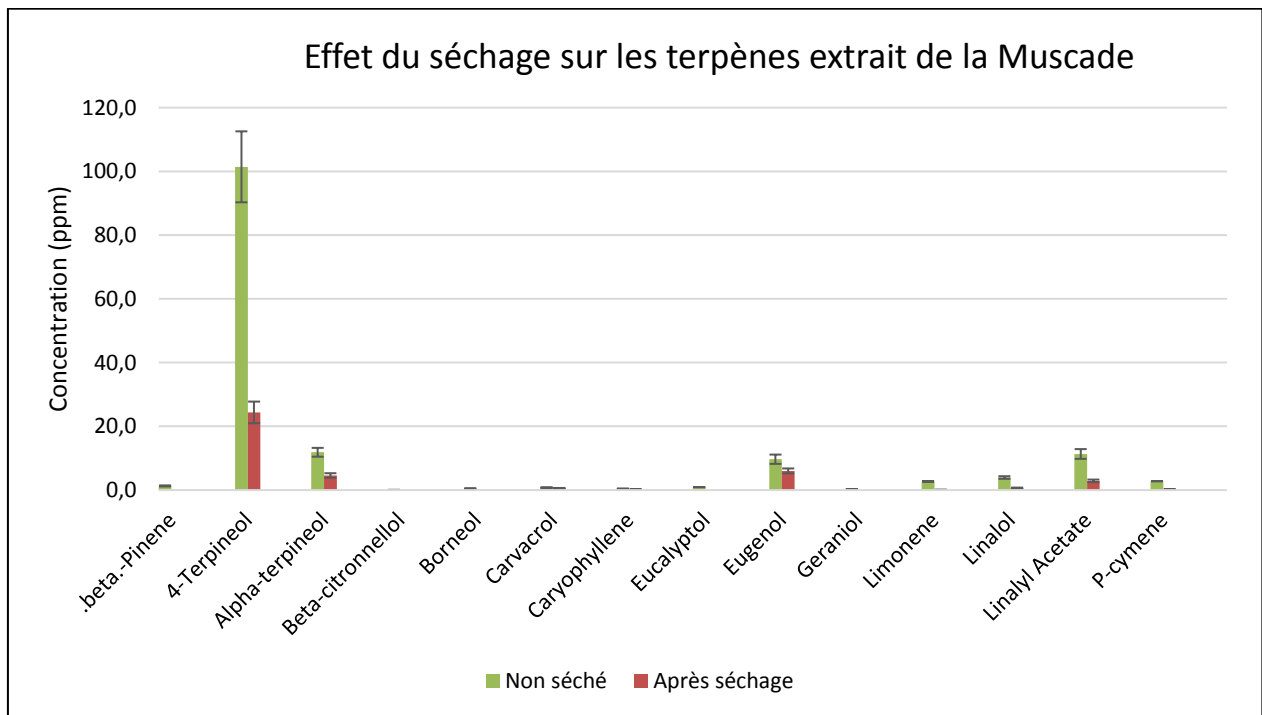
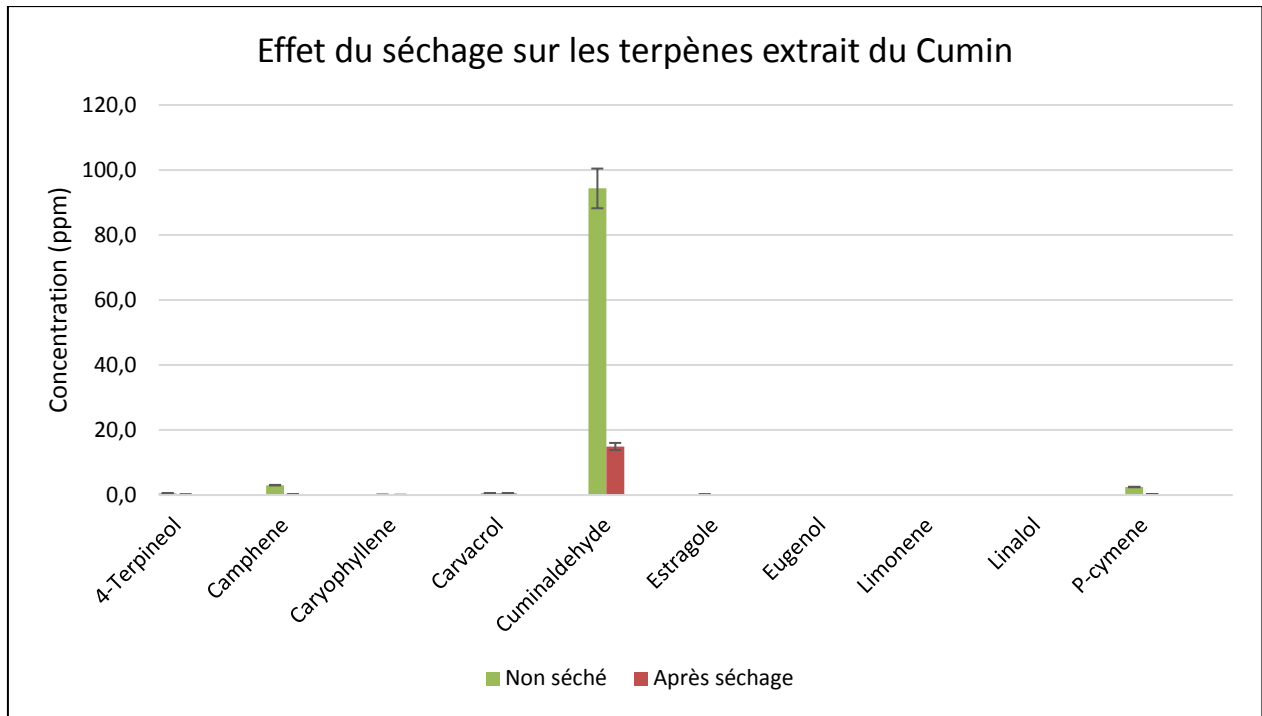
Noms latins	
Cannelle de Ceylan	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry
Cumin	<i>Cuminum cyminum</i> L.
Fenouil	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.
Muscade	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.
Piment d'Espelette	<i>Capsicum annum</i> L.
Thym	<i>Thymus vulgaris</i> L.

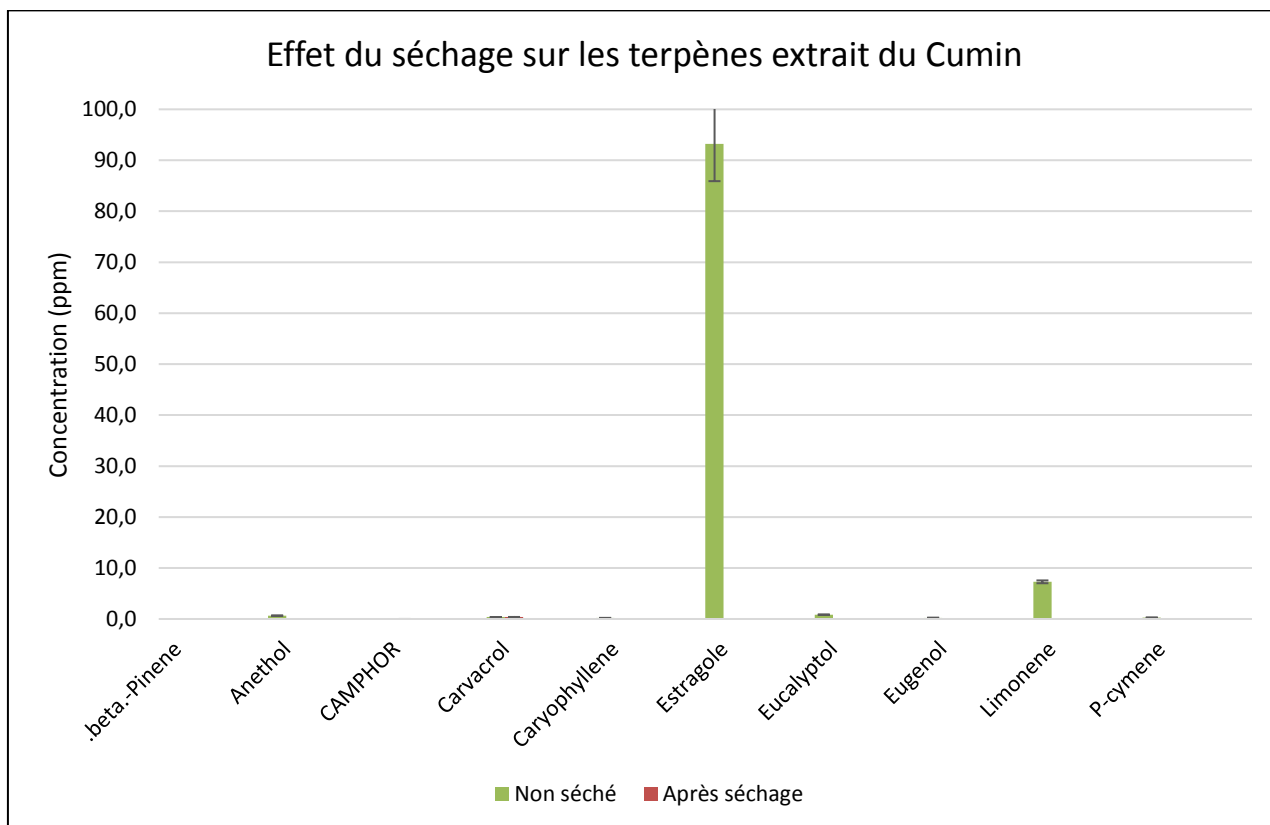
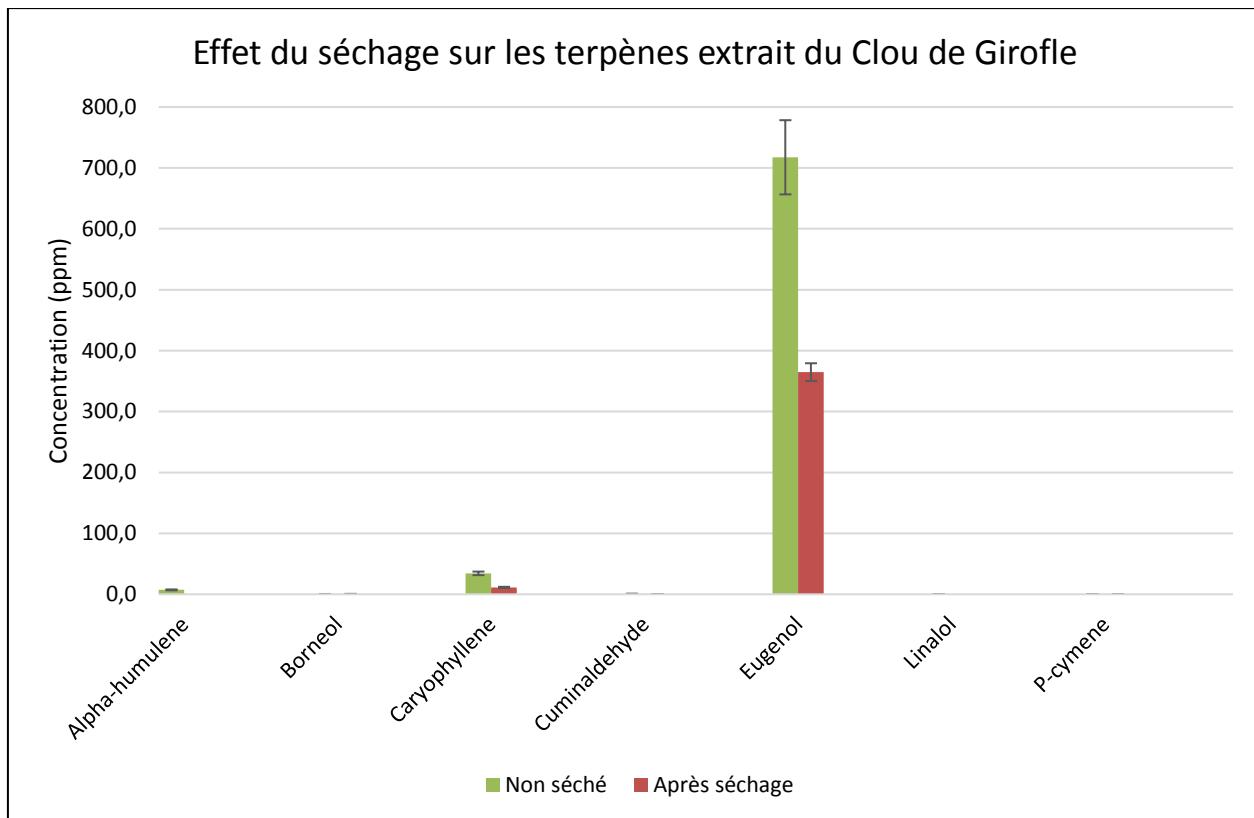
## Légumes

Noms latins	
Chou blanc	<i>Brassica oleracea var. capitata</i> L. f. <i>alba</i>
Chou rouge	<i>Brassica oleracea var. capitata</i> L. f. <i>rubra</i>
Oignon	<i>Allium cepa</i> L.
Potiron	<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne

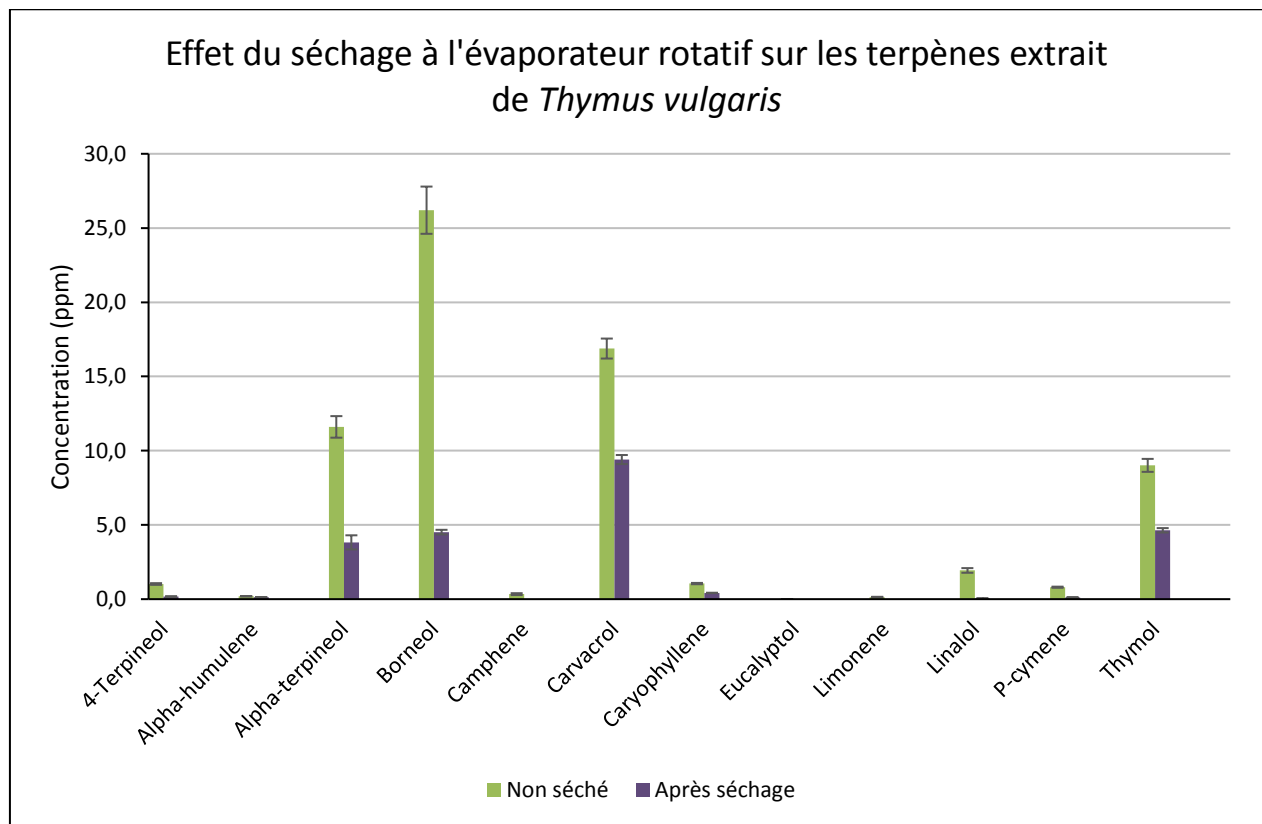
## Annexe II : Effet du séchage à l'azote sur les terpènes d'extraits d'épices







## Annexe III : Effet du séchage par évaporateur rotatif sur les terpènes du Thym



**Johanna BESNARD, 2017 : « Activités anti-inflammatoire et anti-oxydante d'extraits d'épices et quelques légumes. »**

Equipe CAMBA — UMR 7178 CNRS Institut Pluridisciplinaire Hibert Curien, Faculté de Pharmacie – Université de Strasbourg, 74, Route du Rhin CS 60024 - 67401 ILLKIRCH

**RESUME** : Différentes épices (cannelle de Ceylan, cumin, clou de girofle, fenouil, muscade, piment d'Espelette et thym) et différents légumes (oignon, potiron, chou blanc, chou rouge et jus de choucroute) sont extraits par une nouvelle méthode (ASE). Leurs toxicités (perturbation de l'intégrité membranaire, induction de l'apoptose) sont testées sur des lignées cellulaires humaines (U87, Jurkat). Seuls les extraits de muscade, de cannelle, de thym et de clou de girofle montrent une activité apoptotique. L'activité antioxydante est également mesurée selon deux méthodes (TEAC et ORAC). L'extrait de clou de girofle est le plus antioxydant, suivie par la cannelle et le thym, toutes méthodes confondues. Parmi les légumes, l'extrait de chou rouge est le plus antioxydant, cependant cette activité, ainsi que celle des légumes, sont bien moins importante que celles des extraits d'épices (jusqu'à 100 fois moins importante). L'activité anti-inflammatoire des extraits sera évaluée sur les lignées cellulaires humaines (monocytes (THP-1) ou de lymphocytes (RAJI)) en mesurant par cytométrie en flux la quantité de TNF- $\alpha$  sécrétée par les cellules, après activation par LPS.

**Mots-clés** : EAS, culture cellulaire, TEAC, ORAC, toxicité

---

**Johanna BESNARD, 2017 : « Anti-inflammatory and antioxidant activity of extracts of spices and some vegetables. »**

Equipe CAMBA — UMR 7178 CNRS Institut Pluridisciplinaire Hibert Curien, Faculté de Pharmacie – Université de Strasbourg, 74, Route du Rhin CS 60024 - 67401 ILLKIRCH

**ABSTRACT**: Different spices (cinnamon from Ceylan, caraway, clove, fennel, nutmeg, Espelette pepper, thyme) and different vegetables (onion, pumpkin, white cabbage, red cabbage and juice of sauerkraut) are extracted with ASE method. Their toxicity (Perturbation of membrane integrity, apoptosis' induction) are tested on human cells line (U87, Jurkat). Only extracts of nutmeg, cinnamon, thyme and clove extracts show an apoptotic activity. Antioxidant activities are measured by two methods (TEAC and ORAC). Clove extract shows, all methods combined, the more antioxidant activity, followed by cinnamon and thyme. Among vegetables, red cabbage extract is the strongest antioxidant, however, its activity, as well as the other vegetables' extract, is less important than the activities of spices' extract (up to 100 times less). Anti-inflammatory activity of extracts will be tested, later, on monocytic cell line (THP-1) or lymphocytic cell line (RAJI), by flow cytometry, by measuring the amount of TNF- $\alpha$  released by the cells once LPS have activated them.

**Key words**: ASE, cells culture, TEAC, ORAC, toxicity