

**EFFETS DES EXTRAITS DES FEUILLES D'*Alchornea cordifolia* (EUPHORBIACEAE) SUR LE
PEROXYDE D'HYDROGENE PRODUIT PAR LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES HUMAINS
STIMULES**

EFFECTS OF *Alchornea cordifolia* (EUPHORBIACEAE) EXTRACTS ON HYDROGEN PEROXIDE
PRODUCED BY STIMULATED HUMAN NEUTROPHILS.

**KOUAKOU – SIRANSY G.¹, NGUESSAN IRIE G.¹, KAMENAN A.¹, KOUAKOU L.¹, GRESSIER B.
², KABLAN BROU J.¹**

¹Laboratoire de pharmacologie, pharmacie clinique, thérapeutique et physiologie, UFR
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Cocody-Abidjan, B.P. V 34, Abidjan,
Côte d'Ivoire.

²Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie Clinique, Faculté des
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lille 2, 3 rue du Professeur Laguesse,
B.P. 83, 59006 Lille Cedex, France.

Titre court : Effet antioxydant d'*Alchornea cordifolia* vis-à-vis de H₂O₂ .

Auteur correspondant : G. Kouakou Siransy

E-mail: giselekouakou@yahoo.fr

Tel: (225)07494409. Fax: (225)22486068.

Adresse postale: Laboratoire de pharmacologie et physiologie, UFR Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Université Cocody-Abidjan BP V 34.

Résumé

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est l'initiateur d'espèces oxygénées très toxiques. En Côte d'Ivoire *Alchornea cordifolia* est fréquemment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement d'affections variées dans lesquelles sont impliquées les espèces réactives de l'oxygène. Faisant suite à deux études préliminaires, le but de cette présente étude est de rechercher, un effet antioxydant des feuilles d'*Alchornea cordifolia* vis-à-vis du H_2O_2 relargué par le polynucléaire neutrophile stimulé. Deux extraits ont été préparés à partir des feuilles séchées: un macérât aqueux et un extrait à l'acétate d'éthyle. Une gamme de concentrations allant de 0,1 à 15mg/l a été testée. Le polynucléaire neutrophile a été stimulé par le phorbol myristate acétate. Le dosage de H_2O_2 relargué suite cette stimulation, s'est fait selon la méthode de Pick et Keisari basée sur l'oxydation du rouge de phénol par H_2O_2 par l'intermédiaire de la peroxydase. Les résultats ont montré une inhibition de l'activité de H_2O_2 de manière dose-dépendante. Les concentrations inhibitrices 50% (CI50%) sont 2,87 et 5,73mg/l pour le macérât aqueux et l'extrait acétate d'éthyle respectivement. Les CI50 50% observées sont inférieures à celles de substances pharmacologiques telles que le glutathion et la N-acétylcystéine, connues comme étant de potentielles substances antioxydantes. Ainsi *Alchornea cordifolia* aurait des effets inhibiteurs intéressants sur le relargage de H_2O_2 une espèce oxygénée très toxique.

Mots clés : *Alchornea cordifolia*, stress oxydant, peroxyde d'hydrogène.

Summary

Oxidative stress is implicated in many diseases as a trigger or associated with complications of evolution. Among the reactive oxygen species, hydrogen peroxide (H_2O_2) is the initiator of highly toxic oxygen species. In Côte d'Ivoire *Alchornea cordifolia* is widely used in traditional medicine for treating various diseases in which reactive oxygen species are involved. Following two preliminary studies, the purpose of this study is to research, an antioxidant effect of *Alchornea cordifolia* leaf towards H_2O_2 release by neutrophils stimulated. Two extracts were prepared from the dried leaves: an aqueous extract and an ethyl acetate extract. A range of concentrations from 0.1 to 15mg/l was tested. The neutrophils were stimulated by phorbol myristate acetate. The dosage of H_2O_2 release after the stimulation was done following the method of Pick and Keisari based on the oxidation of phenol red by H_2O_2 via peroxidase. The results showed an inhibition of the activity of H_2O_2 in a dose-dependent manner. 50% inhibitory concentrations are 2.87 and 5.73 mg / l for aqueous extract and ethyl acetate extract respectively. The 50% inhibitory concentrations observed were lower than those of pharmacological substances such as glutathione and N-acetylcysteine, known as potent antioxidant. Also *Alchornea cordifolia* could have interesting inhibitory effects on the release of a very toxic oxygen species H_2O_2 .

Keywords : *Alchornea cordifolia*, oxidative stress, hydrogen peroxide

INTRODUCTION

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. Parmi les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a la particularité d'être neutre et donc de traverser facilement les membranes. Il est l'initiateur d'ERO conduisant ainsi à une altération des propriétés fonctionnelles de la cellule pouvant aller jusqu'à la lyse complète.

En Côte d'Ivoire *Alchornea cordifolia* est fréquemment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement d'affections variées liées à une inflammation chronique, affections respiratoires, rhumatismales (Adjanohoun, 1994 ; Adjanohoun et Aké Assi, 1979). Au cours de ces affections l'activation prolongée des polynucléaires neutrophiles (PNN) génère des ERO qui entraînent des dommages sur les éléments structuraux cellulaires (Afonso et al., 2007 ; Henrotin et al., 2005 ; Roos, 1001).

Dans une étude préliminaire nous avons mis en évidence un effet inhibiteur direct d'*Alchornea cordifolia* sur le H_2O_2 (Kouakou-Siransy et al, 2010a), mais également un effet inhibiteur sur le relargage de l'anion superoxyde par le polynucléaire neutrophile stimulé (Kouakou-Siransy et al, 2010b). L'anion superoxyde est, certes, la première étape de la formation des ERO les plus agressives, mais sa détection et son dosage présente de nombreuses difficultés à cause de son instabilité en solution aqueuse (Fridovich 1997). Dans cette présente étude notre objectif est de rechercher un effet inhibiteur indirect sur H_2O_2 plus dangereux que l'anion superoxyde, mais également plus stable.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Matériel végétal

Les feuilles fraîches adultes d'*Alchornea cordifolia* (Schum et Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) ont été récoltées au Centre National de floristique d'Abidjan et vérifiées par un expert botaniste (professeur Aké Assi, Département de botanique, Université d'Abidjan).

Préparation de l'extrait aqueux

Les feuilles séchées ont été broyées dans un mixer, et 50 g de poudre fine a été macéré pendant 48 heures à 25 ° C dans un ballon en verre contenant 500 ml d'eau distillée. L'extrait aqueux est filtré et lyophilisé. Le lyophilisat est conservé (dans un flacon en verre) à la température de +4 ° C.

Préparation de l'extrait à l'acétate d'éthyle

Les feuilles séchées ont été broyées dans un mixer, et 50 g de poudre fine a été macéré pendant 24 heures à 4 ° C dans un ballon en verre contenant 500 ml d'un mélange méthanol/acétone/eau (70:70:30, v/v/v). Le filtrat est ensuite concentré à basse pression à 30°C. La phase aqueuse résultante, après centrifugation, est lavée au dichlorométhane afin d'éliminer tous les pigments lipophiles puis soumise à une extraction par l'acétate d'éthyle. La phase acétate d'éthyle est ensuite évaporée à sec. L'extrait sec est conservé à 4°C.

Réactifs et solutions de travail

Phorbol myristate acétate (PMA), rouge de phénol - peroxydase, Hanks Buffer Salt Solution - Hepes (HBSS-H), Ficoll - Histopaque, kit Sigma Diagnostic (LDH opt. Lactat. Deshydrogenase E. C. 1.1.1.27 UV test) ont été commandé chez Sigma Chem. (St. Louis, MO, USA)

Méthodes

Préparation des polynucléaires neutrophiles

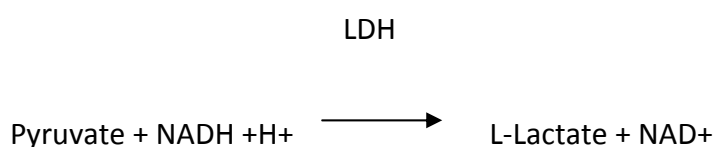
Les polynucléaires neutrophiles (PNN) ont été isolés selon la technique de Cabanis et al. (1994) basée sur un gradient de densité.

A partir d'un pool de sang total (15ml) provenant de donneurs volontaires, recueilli sur héparinate de lithium dans un tube gradué conique (Blue Max Facon 2070), les PNN et les hématies sont séparés des autres éléments figurés du sang par centrifugation (centrifugeuse SIGMA 3K10 Osterode am Hartz, Germany) 1500 tours/min pendant 10 min) sur gradient de Ficoll. Puis une solution froide de chlorure d'ammonium entraîne une hémolyse, ce qui permet d'obtenir les PNN seuls. Ces derniers sont alors remis en suspension dans un tampon Hanks Buffer Salt Solution - Hepes (HBSS-H), pH 7,40.

Mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH)

Principe :

La mesure est fondée sur la réaction suivante



Il consiste en la détermination cinétique de l'activité LDH en suivant la diminution de l'absorbance du cofacteur NADH à la longueur d'onde de 340 nm (Srinivas 1993).

Mode opératoire :

La gamme de concentration testée pour chaque extrait est la suivante : 1000 mg/l ; 500mg/l ; 200mg/l et 100mg/l. Les tubes de dosage contenant 400 µl de suspension de PNN ($5 \cdot 10^6$ PNN/ml) et 50 µl d'extrait d'*Alchornea cordifolia* à différentes concentrations sont mis à incuber à 37°C pendant 30 minutes. Dans le tube de référence, l'extrait de plante est remplacé par du tampon HBSS-H qui n'a aucun effet cytotoxique. Puis, les cellules sont stimulées avec 50µl de PMA (160 nM) pendant 15 minutes à 37°C. Après centrifugation, à 1500 tours/min pendant 10 min, 400 µl de chaque surnageant sont prêts à être dosés.

Les PNN du tube de référence sont lysés par choc osmotique en ajoutant 0,5 ml d'eau distillée sur le culot. Une seconde centrifugation permet de récupérer le surnageant (dit du lysat) qui contient la totalité de LDH libérée. L'activité LDH a été mesurée grâce au kit Sigma Diagnostic (LDH opt. Lactat. Deshydrogenase E. C. 1.1.1.27 UV test).

La valeur de l'activité LDH totale est donnée par la somme :

$$X = (\text{activité LDH}_{\text{surnageant de réf.}}) + (\text{activité LDH}_{\text{lysat des PNN}})$$

Pour chaque concentration d'extrait de plante, on calcule

$$Y = (\text{activité LDH}_{\text{surnageant avec extrait de plante}}) - (\text{activité LDH}_{\text{surnageant de réf.}})$$

Le pourcentage d'activité LDH relarguée imputé à l'extrait de plante est

$$\% \text{ activité LDH } (Y/X) \times 100.$$

Dosage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Principe : La méthode est basée sur l'oxydation du rouge de phénol par l'H₂O₂ par l'intermédiaire de la peroxydase (Pick et Keisari, 1980). Nous observons un changement de coloration révéle en milieu basique et détecté au spectrophotomètre (Kontron Uvikon 860) à 610 nm. La quantité d'H₂O₂ est déduite d'une courbe étalon $DO = f([H_2O_2])$. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) est déterminée à partir de la courbe % inhibition de $H_2O_2 = f(\text{concentration en extrait de plante})$.

Mode opératoire : deux cent microlitres de suspension cellulaire ($2,5 \times 10^6$ PNN/ml), 100 µl de chaque extrait d'*Alchornea cordifolia* à différentes concentrations (0,1mg/l à 15 mg/l) sont mis à incuber pendant 30 minutes à 37°C dans un volume final de 1 ml de tampon HBSS-H. Puis les cellules sont stimulées 15 minutes à 37°C par du PMA (16 nM). 1 ml de solution de rouge de phénol/péroxydase est ajouté dans tous les tubes. Après 5 minutes de centrifugation (2500 tours/min), l'absorbance du surnageant est alors lue après ajout de 50µl de NaOH (1 N).

Test statistique

Le test statistique utilisé pour comparer les moyennes est celui de Wilcoxon. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

Activité LDH

Ce test permet d'évaluer la cytotoxicité des extraits testés. La LDH est une enzyme exclusivement cytoplasmique et relativement stable. Sa présence dans le milieu extracellulaire et donc l'augmentation de son activité dans le surnageant permet de détecter

une altération de la perméabilité membranaire. Le potentiel cytotoxique de chaque extrait d'*Alchornea cordifolia* a été testé avec une gamme de concentration de 100mg/l à 1000mg/l. La viabilité des PNN, évaluées par la libération de la LDH, n'a montré aucune modification de l'activité de la LDH après une incubation de 1h avec chaque extrait.

Effet des extraits d'*Alchornea cordifolia* sur le relargage de H₂O₂.

L'extrait aqueux et l'extrait acétate d'éthyle d'*Alchornea cordifolia* ont montré un effet inhibiteur dose-dépendant de la production du H₂O₂ par le PNN activé par le PMA (figure 1).

Les concentrations inhibitrices 50% des différents extraits sont représentées sur la figure 2 et comparée à celle du glutathion et de la N-acétylcystéine.

DISCUSSION

Alchornea cordifolia est une plante très appréciée en médecine traditionnelle dans le traitement de pathologies variées. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont impliqués dans la survenue de nombreuses situations physiopathologiques à forte composante inflammatoire tels que l'asthme bronchique, le rhumatisme articulaire aigue. (Chabot et al, 1998 ; Fujisawa 2005, Henricks et Nijkamp, 2001; Sahinoglu et al, 1996).

Parmi les ERO, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est une espèce peu réactive est cependant l'initiateur d'espèces oxygénées très réactives et toxiques tels que l'acide hypochloreux (HOCl) et radical hydroxyl (OH°).

Les résultats ont montré une inhibition de l'activité de H₂O₂ de manière dose-dépendante des deux extraits d'*Alchornea cordifolia*. Les CI₅₀ observées sont meilleures à celles de substances pharmacologiques telles que le glutathion et la N-acétylcystéine, connues comme étant de potentielles substances antioxydantes (Gressier et al, 1995).

Le PMA est un ester de phorbol utilisé comme stimulus du PNN. Il induit une activation de la protéine kinase C (PKC) considérée comme le point de départ de la cascade oxygénée. L'action du PMA est comparée à celle du diacylglycérol (DAG) (Curnutte et al, 1994). Le DAG après fixation sur son site de reconnaissance active directement la protéine kinase C (PKC) en entraînant un changement de conformation qui rend accessible le site catalytique de la PKC. Cette activation se fait en association avec le Ca fixé sur la calmoduline. La PKC activée par le DAG stimule la NADPH oxydase en la phosphorylant (Sha'afi et Molski, 1988). Ainsi l'effet inhibiteur, sur la stimulation du PNN induit par le PMA, par les extraits des feuilles d'*Alchornea cordifolia* pourrait être médié par une action inhibitrice sur la PKC. *Alchornea cordifolia* pourrait s'interposer à l'action du DAG en se fixant sur son récepteur et donc en empêchant le déclenchement d'une production d'ERO au sein du PNN. Ces résultats viennent confirmer notre étude préliminaire dans laquelle, dans un modèle acellulaire, nous avons mis en évidence un effet antioxydant des feuilles d'*Alchornea cordifolia* par piégeage des ERO (Kouakou-Siransy et al, 2010a). Les CI50% obtenues dans cette présente étude sont de deux à trois fois inférieures à celle obtenues dans le modèle acellulaire. Ainsi l'effet antioxydant des feuilles d'*Alchornea cordifolia* pourrait être médiée par un effet direct associé à un effet indirect par inhibition du relargage du H₂O₂.

La littérature ne rapporte que très peu d'étude sur l'activité antioxydante d'*Alchornea cordifolia*. Une activité antioxydante visant les espèces radicalaires, mise en évidence par réduction du radical diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) a été décrite chez *Alchornea cordifolia* par Nia et al (2005).

Une activité anti-inflammatoire des feuilles d'*Alchornea cordifolia* a été mise en évidence par Osadebe et Okoye (2003) ainsi que Mavar-Manga(2004) par inhibition de l'œdème provoqué

sur l'oreille de souris et la patte du rat. Par ailleurs Yoshikawa et al (1983) mettent en valeur la part importante que jouent les ERO dans le processus inflammatoire.

Ainsi l'activité antioxydante révélée par nos tests pourrait justifier cette activité anti-inflammatoire des feuilles d'*Alchornea cordifolia*

En comparant les CI50% des extraits nous remarquons que l'extrait aqueux est approximativement deux fois plus actif que l'extrait acétate d'éthyle. Dans nos études antérieures nous avons mis en évidence un taux plus élevé en polyphénols dans l'extrait acétate d'éthyle (Kouakou-Siransy 2010a). Cependant il est bien connu qu'il existe une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols (Hatano et al 1989). Cette prédominance du macérat aqueux suggère que la nature des polyphénols, ou d'autres composés chimiques de la plante pourrait intervenir dans la manifestation du pouvoir antioxydant.

CONCLUSION

Ainsi au vu de nos résultats les feuilles d'*Alchornea cordifolia* auraient des effets inhibiteurs significatifs vis-à-vis du relargage du H₂O₂ une espèce oxygénée très toxique. *Alchornea cordifolia* pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique dans les pathologies où les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées.

Remerciements

Nous remercions le Pr Aké Assi (Centre National de Floristique de l'Université de Cocody) pour l'identification des plantes.

Références

Adjanohoun EJ 1994. Fiche espèce: *Alchornea cordifolia*. *Bull Med Trad Pharm* 8: 203–13.

Adjanohoun EJ et Aké Assi L. 1979. Contribution au recensement des plantes médicinales en Côte d'Ivoire, 41 - 218. Abidjan : Edition CRESS.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., et Collin, P. 2007. Radicaux libres derives de l'oxygene et superoxydes dismutases: Role dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme et des Maladies Osteo-Articulaires* 74 : 636–43.

Cabanis A, Gressier B, Lebegue S, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, et Cazin JC .1994. A rapid density gradient technique for separating polymorphonuclear granulocytes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 102: 109-21.

Chabot F, Mitchell JA, Guteridge CMM et Evans TW 1998. Reactive oxygen species in acute lung injury. *European Respiratory Journal* 11: 745-7.

Curnutte JJ, Erickson RW, Ding J, Badwey JA 1994. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *Journal of Biological Chemistry* 269 (14): 10813-19.

Fridovich I. 1997. Superoxide Anion Radical ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272: 18515-7.

Fujisawa T 2005. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Current Drug Targets Inflammation & Allergy*; 4 (4): 505-6.

Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC 1995. Scavenging of reactive oxygen species by letosteine, a molecule with two blocked-SH groups. Comparison with free-SH drugs. *Pharmacy World and Sciences* 17: 76–80.

Hatano T, Edmatsu R, Hiramatsu M, Moti A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T 1989. Effects of the interaction of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1 diphenyl 2 picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37: 2016–21.

Henricks PA et Nijkamp FP : 2001. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulmonary Pharmacology Therapeutics* 14: 409-20.

Henrotin Y, Kurz B, Aigner T 2005. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: Friends or foes? *Osteoarthritis and Cartilage* 13: 643–54.

Kouakou – Siransy G, Sahpaz S, Irié-Nguessan GA, Dattes YJ, Kablan J, Gressier B, et Bailleul F. 2010a. Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West african plants. *Food Chemistry*. 118: 430-435.

Kouakou – Siransy G, Sahpaz S, Irié-Nguessan GA, Dattes YJ, Kablan J, Gressier B, et Bailleul F. 2010b. Effets of *Alchornea cordifolia* on elastase and superoxide anion produced by human neutrophils. *Pharmaceutical Biology*. 48 (2): 128-133.

Mavar-Manga MH, Brkic D, Marie DEP, et Quetin-Leclercq J 2004. In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schmach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92: 209–14.

Nia R, Paper DH, Franz G, et Essien EE 2005. Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-oxidant potential of an African Recipe : *Alchornea cordifolia* seeds. *Acta Horticulturae* 678:91-6.

Osadebe PO et Okoye EC (2003): Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 19–24.

Pick E, et Keisari Y. 1980. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. 38: 161-70.

Roos D. 1991. The respiratory burst of phagocytic leukocytes. *Clinical Drug Investigations*. 3: 48-58.

Sahinoglu T, Stevens CR, Bhatt B et Blake DR. 1996. The role of reactive oxygen species in inflammatory disease : evaluation of methodology. *Methods* 9: 628-34.

Sha'afi RI et Molski TFP 1988. Activation of the neutrophil. *Progress in Allergy* 42:1-64.

Srinivas VC, Habibullah CM, Ayesha Q, Hassan SI, Khaleel VR, Rehman K, et Moshins S. 1993. Lactate deshydrogenase: a marker of cellular integrity. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 15: 709-13.

Yoshikawa T, Tanaka H, et Kondo M. 1983. Effect of Vitamin E on adjuvant arthritis in rats. *Biochemical Medicine* 29: 227-34.

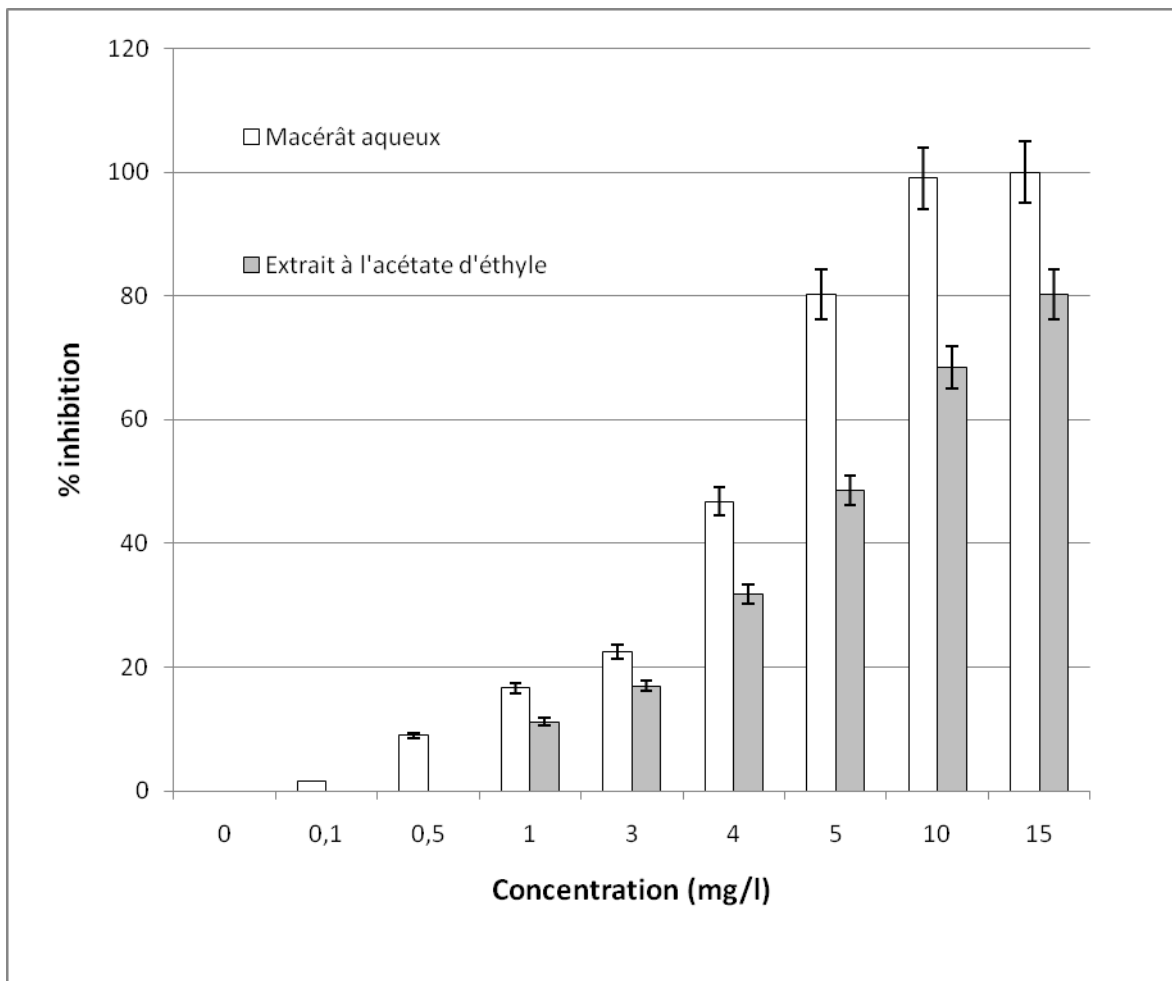


Figure 1

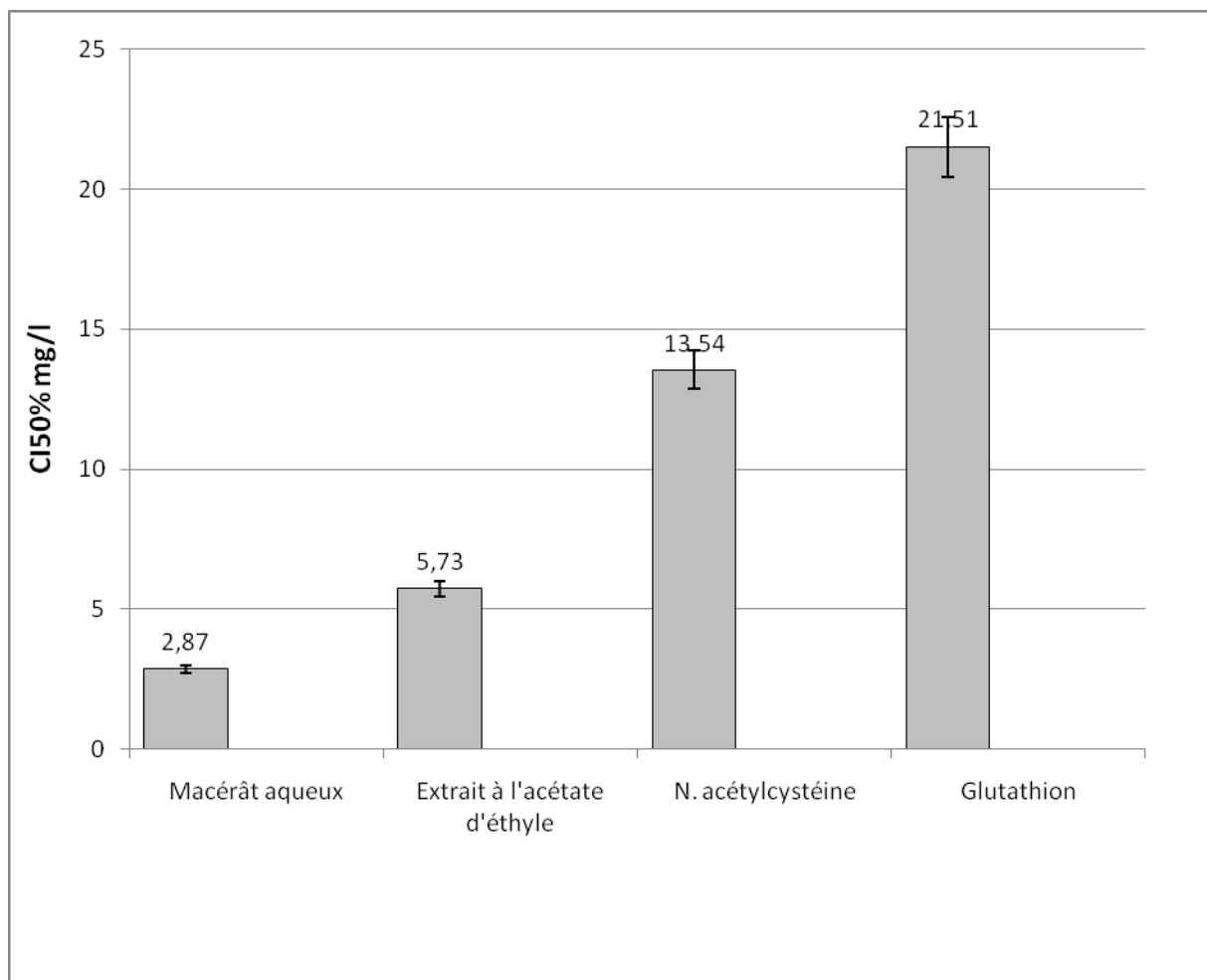


Figure 2

Figure 1 : Effets des extraits d'*Alchornea cordifolia* sur H₂O₂ relargué par les polynucléaires neutrophiles activés.

Figure 2 : Concentrations inhibitrices des extraits d'*Alchornea cordifolia* vis-à-vis de H₂O₂. (n=4). Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type. (p<0,5).