



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n° 90

T H È S E

pour le DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 02/10/2017

par

M. BONNARD Ludovic

Né le 08 octobre 1993

à Rillieux-la-Pâpe (69)

UMBU-CAJA, UN FRUIT REGIONAL BRESILIEN DU GENRE SPONDIAS :
CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DES EFFETS
CARDIOVASCULAIRES CHEZ LE RAT

JURY

Madame DIJOUX-FRANCA Marie-Geneviève, Professeur

Madame MARCEL CHATELAIN Dominique, Maître de Conférences des Universités - HDR

Monsieur MICHALET Serge, Maître de Conférences des Universités

Mme BERTRAM Delphine, Docteur en Pharmacie

M. TIXIER Julien, Docteur en Pharmacie

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|--|-----------------------|
| • Président de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| • Présidence du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| • Vice-Président de la Commission Recherche | M. Fabrice VALLEE |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie
Universitaire | M. Philippe CHEVALIER |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- | | |
|--|---|
| • UFR de Médecine Lyon Est | Directeur : M. Gilles RODE |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux | Directeur : Mme Carole
BURILLON |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directrice : Mme Christine
VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie | Directeur : M. Denis
BOURGEOIS |
| • Institut des Techniques de Réadaptation | Directeur : M. Yves
MATILLON |
| • Département de formation et centre de recherche en
Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie
SCHOTT |

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- | | |
|---|-------------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. Fabien DE
MARCHI |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques
et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick
VANPOULLE |
| • Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) | Directeur : M. Pascal
FOURNIER |
| • I.U.T. LYON 1 | Directeur : M. Christophe
VITON |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance
(ISFA) | Directeur : M. Nicolas
LEBOISNE |
| • ESPE | Directeur : M. Alain
MOUGNIOTTE |

ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon
LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIETHERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
 - Madame Pascale COHEN (Pr)
 - Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
 - Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
 - Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
 - Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
 - Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
 - Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
 - Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
 - Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
 - Madame Angélique MULARONI (MCU)
 - Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
 - Monsieur Anthony FOURIER (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
 - Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
 - Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)
- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
 - Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
 - Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
 - Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
 - Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
 - Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
 - Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
 - Madame Angélique MULARONI (MCU)
 - Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)
- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
 - Monsieur Alexandre JANIN
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
 - Monsieur Karim MILADI (85ème section)
 - Monsieur Antoine ZILLER (87ème section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

A l'ensemble des membres de mon jury de thèse,

Madame le Professeur Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse et d'évaluer ce travail. Je vous en remercie

Madame le Professeur Dominique MARCEL-CHATELAIN, pour avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre patience, votre disponibilité et votre écoute accordée.

Monsieur le Professeur Serge MICHALET, pour m'avoir permis de réaliser l'analyse chromatographique à mon retour en France. Je vous remercie également pour le temps passé sur ce travail.

Madame le Docteur Delphine BERTRAM, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et surtout de m'avoir permis de découvrir le laboratoire de pharmacologie cardiovasculaire dirigé par Isac. Sans toi je n'aurais pas pu vivre une expérience hors-norme de 3 mois dans le Nordeste Brésilien. Je t'en suis très reconnaissant.

Monsieur le Docteur Julien TIXIER, tu as accepté d'évaluer mon travail en participant à mon jury et je t'en remercie. La boucle est bouclée...

A l'ensemble du laboratoire de pharmacologie cardiovasculaire de l'UFPB,

Muito obrigado o *Professor Isac!* para sua generosidade e sua confiança que você nos deu para fazer vários trabalhos no laboratório. Estou muito reconhecido por isso e também para me ter dado a oportunidade de escrever minha tese sobre a fruta umbu-cajá.

Muito obrigado a *Professora Thais PORTO* para sua imensa bondade e paciência durante os tres meses em João Pessoa. Nenhuma palavra minha poderia descrever os momentos vividos, descobriendo a vida nordestina.

Eu quero agradecer também todas as pessoas do lab: *Fátima, Marcella, Fran, Camilla, Arthur, Pablo* e muito mais...

Vocês me dão saudade !

A ma famille,

Mes Parents, mon frère *Guillaume*, vous qui m'avez soutenu et permis de m'épanouir pendant ces années d'études depuis la première année à Saint-Etienne et ce jusqu'à aujourd'hui.

Mes grands-parents, *Mamie village* et *Papy et Mamie du Lac* pour toute l'affection que vous me portez.

Mes cousins, cousines, oncles et tantes...

A mes amis,

De la Fac, *Coline, Aurane*, depuis les premières heures (même avant au Lycée), *Ambre* et *Charlotte* mes binômes, et tous les pharma-ingés... !

De l'EMSE, de belles rencontres avec *Cris* et *Jaime*. *Anthime* pour ces deux années de travail acharné. Les AST : *Asma, Océane, Romain, Pierre, Max, Jules (le pharma...), Marie,*

Victoire et *Thomas*, vous avez une place particulière puisque vous étiez là lors des premières expériences de ce travail (je ne dirais pas qui a abandonné le plus vite...). En tout cas, je suis très heureux d'avoir pu partager tous ces moments avec vous : toutes ces péripéties, footing sur la plage, ces rencontres privilégiées et toutes les caïpirinhas goûtées « total flex » !

Du Lycée,

De Saint-Martin, les conscrits...

De la team-Théa (*C U bisous*),

Et bien sûr aux plus fidèles *Simon, Quentin, Justine, Mélanie, Soline, Sophie, Maman Lucie, Théo, Loïc, Nico, Stéphan, Polo, Solène, Cécile, Chloé, Anaïs, Johanna...*

Table des Matières

LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	15
INTRODUCTION	18
PARTIE I : RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. Le genre Spondias L.....	22
1.1 Définition.....	22
1.2 Origine et localisation.....	23
2. Spondias sp ou umbu-cajazeira.....	24
2.1 Taxonomie.....	24
2.1.1 Description botanique.....	24
2.1.2 Analyse chromosomique	26
2.2 Aspect régional.....	27
2.2.1 Origine et localisation.....	27
2.2.2 Exploitation et usages traditionnels.....	29
2.3 Etude phytochimique du fruit.....	30
2.3.1 Caractéristiques physico-chimiques	30
2.3.2 Activité anti-radicalaire	33
3. Le système cardio-vasculaire.....	39
3.1 Rappels anatomiques et physiologiques.....	39
3.1.1 Vaisseaux sanguins et pression artérielle	39
3.1.2 Mécanisme endothélial et facteurs vasculaires circulants.....	41
3.2 L'hypertension artérielle.....	43
3.2.1 Définition.....	43
3.2.2 Epidémiologie.....	43
3.2.3 Etiologie et facteurs de risque	44

3.2.4	Altérations vasculaires.....	44
3.2.5	Traitements actuels contre l'HTA	48
3.3	Rôles des antioxydants dans la santé humaine : cas des polyphénols.....	49
3.3.1	Généralités	49
3.3.2	Polyphénols et endothélium	51
3.3.3	Etudes chez l'Homme.....	54
PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES		57
1.	Obtention de l'extrait méthanolique à partir d'exocarpe d'umbu-cajá.....	58
1.1	Matière première.....	58
1.2	Etapas d'obtention de l'extrait d'exocarpe.....	58
2.	Analyse phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique	60
2.1	Tests généraux	60
2.1.1	Pouvoir antioxydant: DPPH	60
2.1.2	Contenu phénolique total (TPC).....	61
2.2	Analyses UHPLC DAD-ESI/QTOF.....	61
3.	Evaluation in vivo des paramètres cardiovasculaires	62
4.	Evaluation des effets pharmacologiques sur le système artériel	64
4.1	Réactivité d'anneaux artériels mésentériques supérieurs ex vivo	64
4.2	Activité antioxydante évaluée au microscope à fluorescence sur des coupes de micro- vaisseaux.....	66
4.2.1	Préparation des tissus	66
4.2.2	Marquage et visualisation des ROS.....	67
5.	Tests statistiques	68
PARTIE III : RÉSULTATS		71
1.	Analyse phytochimique	72
1.1	Pouvoir antioxydant.....	72
1.1.1	DPPH.....	72
1.1.2	Contenu Phénolique Total (TPC)	73
1.2	Chromatographie UHPLC/Q-TOF	74

2. Evaluation des effets pharmacologiques de l'extrait.....	77
2.1 Evaluation in vivo des paramètres cardiovasculaires après injection i.v.	77
2.2 Mesure la réactivité vasodilatatrice d'anneaux artériels mésentériques supérieurs	80
2.3 Activité antioxydante évaluée au microscope à fluorescence.	81
 PARTIE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	87
1. Préambule	88
2. Analyse phytochimique	88
2.1 Pouvoir antioxydant in vitro	88
2.2 La rutine et ses dérivés	90
3. Activité pharmacologique de l'extrait	91
3.1 Hypotension aigüe provoquée in vivo	91
3.2 Relâchement musculaire des anneaux mésentériques ex vivo	93
3.3 Caractérisation physico-chimique de l'effet (pro)-oxydant in vitro	94
4. Perspectives	96
5. Conclusions.....	98
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100

Liste des Tableaux

TABLEAU 1. CLASSIFICATION DU GENRE SPONDIAS L.....	22
TABLEAU 2. COMPOSES NUTRITIFS PRESENTS DANS LA PULPE DE SPONDIAS SP	31
TABLEAU 3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE PLUSIEURS ECHANTILLONS DE FRUITS.....	32
TABLEAU 4. ACTIVITE ANTI RADICALAIRE DE PLUSIEURS FRUITS DE L'ESPECE SPONDIAS.....	34
TABLEAU 5. TPC ET TFC DE LA PULPE SUR DIFFERENTES ESPECES DE SPONDIAS	37
TABLEAU 6. VALEURS ET CLASSIFICATION DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE	43
TABLEAU 7. VALEURS DES POUVOIRS ANTIOXYDANTS DE TROIS ESPECES DE SPONDIAS	73
TABLEAU 8. VALEURS DES TPC OBTENUES (EN MG. EAG. G ⁻¹).....	74

Liste des Figures

FIGURE 1. REPARTITION MONDIALE DU GENRE SPONDIAS	23
FIGURE 2. UMBU-CAJAZEIRA ET SES FRUITS	25
FIGURE 3. CAJARANA DO SERTAÕ ET SES FRUITS	26
FIGURE 4. CARYOGRAMME-FISH DE S. TUBEROSA, S. MOMBIN, SPONDIAS SP	27
FIGURE 5. REGION GEOGRAPHIQUE DE LA CAATINGA	28
FIGURE 6. PHOTOGRAPHIES DE LA CAATINGA.	28
FIGURE 8. FRUITS VENDUS SUR UN MARCHÉ.....	29
FIGURE 7. CONFITURES A BASE D'UMBU-CAJA	29
FIGURE 9. FRUIT DE UMBU-CAJA : OVALE; PIRIFORME; ROND, OBOVOÏDE.....	30
FIGURE 10. FORMULES CHIMIQUES DE QUELQUES POLYPHENOLS	36
FIGURE 11. TPC DE PLUSIEURS JUS DE FRUITS EXOTIQUES ET DE VINS COMMERCIAUX.....	38
FIGURE 12. DIFFERENTES COUCHES DES VAISSEAUX : VEINE , ARTERE.....	39
FIGURE 13. PRINCIPAUX FACTEURS VASODILATATEURS	42
FIGURE 14. DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE	45
FIGURE 15. ACTION DES ROS SUR LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DU NO ET SES CONSEQUENCES	46
FIGURE 16. IMPLICATION DES NOX DANS LE MECANISME PRO-OXYDANT.....	47
FIGURE 17. REPARTITION MOYENNE DES PRINCIPAUX TYPES DE POLYPHENOLS.....	50
FIGURE 18. CLASSIFICATION SOMMAIRE DES POLYPHENOLS.....	51
FIGURE 19. REPRESENTATION SYNTHETIQUE DE L'ACTION VASODILATRICE.....	54
FIGURE 20. MISE EN FORME DE L'EXTRAIT : TRITURATION, TAMISAGE	59
FIGURE 21. SPECTRES D'ABSORPTION DU DPPH SOUS LA FORME REDUITE ET OXYDEE.....	60
FIGURE 22. SYSTEMES D'INJECTION ET D'ENREGISTREMENT	63
FIGURE 23. SYSTEME D'ACQUISITION ET CUVES A ORGANE ISOLE.....	65
FIGURE 24. CHROMATOGRAMME UV 280 NM – EXTRAIT SPONDIAS SP (UMBU-CAJA).....	75
FIGURE 25. SPECTRE DE MASSE ET COMPARAISON AVEC UNE BASE DE DONNEES	76
FIGURE 26. EVOLUTION DES PARAMETRES CARDIOVASCULAIRES ENREGISTRES CHEZ LE RAT	78
FIGURE 27. COURBE EFFET-DOSE DE LA REACTIVITE D'ANNEAUX D'ARTERES MESENTERIQUES.....	80
FIGURE 28. ACTIVITE FLUORESCENTE DES MICRO-VAISSEAUX REFLETANT LA QUANTITE DE ROS.....	82
FIGURE 29. PHOTOGRAPHIES DES COUPES DE MICRO-VAISSEAUX MARQUEES AU DHE.....	84

Liste des Abréviations

ABTS	: Acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
Ad	: Adrénaline
Akt	: Protéine kinase B
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique
ARA II	: Antagoniste du récepteur de l'angiotensine II
AT1	: Angiotensine 1
AT2	: Angiotensine 2
AVC	: Accident vasculaire cérébral
BA	: Bahia
Br	: Brésil
CAT	: Catalase
CML	: Cellules musculaires lisses
COX-1	: Cyclooxygénase de type 1
CTL	: Contrôle
CYP450	: Cytochrome P450
DC	: Débit cardiaque
DHE	: Dihydroéthidium
DHP	: Dihydropyridine
DPPH	: Diphényl-picrylhydrazyle
EAG	: Acide gallique équivalent
EDHf	: Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EGF	: Facteur de croissance épidermique
eNOS	: NO synthétase endothéliale
ET-A et B	: Endothéline -A et B
F2-iso	: F ₂ -isoprostane
FC	: Fréquence cardiaque
FDR	: Facteur de risque
FISH	: Fluorescent in situ hybridation
Fr	: France
FRAP	: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
GMPc	: Guanosine monophosphate cyclique
GPx	: Glutathion peroxydase
HMG-coA	: Hydroxylméthylglutaryl-coa
HO-1	: Hème oxygénase-1
UHPLC	: Chromatographie liquide à ultra-haute pression
HTA	: Hypertension artérielle
i.v.	: Intra veineux
ICAM	: Molécule d'adhésion intercellulaire
IEC	: Inhibiteurs de l'enzyme de conversion
IKca	: Canaux potassiques calcium dépendant à moyenne conductance

PI ₃ k	: Phosphoinositide-3 kinase
LDL	: Lipoprotéines de basse densité
L-NAME	: N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	: Macrophage chemoattractant protein-1
MCV	: Maladies cardiovasculaires
mm Hg	: Millimètre de mercure
MMP-9	: Matrix métalloprotéinase-9
MnTMPyP	: Manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin
NO	: Nitrique oxyde
NOX	: NADPH oxydase
OCT	: Optimum cutting temperature
ONOO	: Peroxynitrite
ORAC	: Oxygen radical absorbance capacity
PA	: Pression artérielle
PAD	: Pression artérielle diastolique
PAM	: Pression artérielle moyenne
PAS	: Pression artérielle systolique
PB	: Paraiba
PDGF	: Facteur de croissance dérivés des plaquettes
PE	: Pernambuco
PGE ₂	: Prostaglandine E ₂
PGF ₂ alpha	: Prostaglandine F ₂ alpha
PGI ₂	: Prostacycline GI ₂
Phe	: Phényléphrine
QE	: Quercétine équivalent
ROS	: Espèce réactive oxygénée
RP	: Résistance périphérique
S.E.M	: Erreur type de la moyenne (Standard Error of the Mean)
SHR	: Spontanément hypertendus
SKca	: Canaux potassiques calcium dépendant à haute conductance
SOD	: Superoxyde dismutase
SRAA	: Système rénine angiotensine aldostérone
TC	: Caroténoïdes totaux
TEAC	: Concentration en équivalent Trolox
TEMPOL	: 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFC	: Contenu en flavonoïde total
TGF	: Facteur de croissance transformant
TPC	: Contenu phénolique total
TTA	: Acidité totale titrable
TTS	: Concentration totale des solides solubles
UV	: Ultra-violet
VCAM	: Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1
VCEAC	: Concentration en équivalent Vitamine C
XO	: Xanthine-oxydase

Introduction

Les sources naturelles comme les plantes, les venins et les champignons constituent un réservoir important pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. L'étude des végétaux dans leurs utilisations traditionnelles (ethnobotanie) est souvent utilisée comme première piste de réflexion pour dénicher des familles chimiques potentiellement actives sur certaines pathologies. Dans ce sens, notons que 80 % de la population mondiale a déjà eu recours aux ressources des flores et des pharmacopées locales pour se soigner à défaut ou par volonté de ne pas utiliser la médecine scientifique conventionnelle (1). Ceci renforce l'intérêt de la botanique dans le domaine pharmaceutique en particulier.

Plusieurs molécules issues de sources végétales sont déjà utilisées dans les pathologies du système cardiovasculaire. C'est le cas de la digitaline, un glycoside cardiotonique, issue de la plante *Digitalis purpurea* (digitale pourpre) exploitée pour traiter l'insuffisance cardiaque. La rutine et ses dérivés rutosidiques comme la diosmine retrouvée dans les espèces du genre *Vicia*, sont usuellement préconisés en thérapeutique dans l'insuffisance veineuse chronique (2,3).

Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules potentiellement intéressantes, les chercheurs disposent de différentes méthodes, parmi lesquels se distinguent les tests *in vitro* et *in vivo*. Cela permet, entre autres, de mettre en évidence la famille chimique responsable de l'effet biologique révélé. Ce type de recherche, pouvant être qualifiée de recherche préclinique, occupe de nombreux laboratoires notamment au Brésil, pays bénéficiant d'une faune et d'une flore très riche et diversifiée. C'est pourquoi l'état brésilien offre un financement aux projets évaluant des espèces naturelles régionales. Cela permet de valoriser le patrimoine de chaque région et de mettre en avant l'étendue du potentiel de celles-ci.

C'est ainsi que le laboratoire de pharmacologie cardiovasculaire de l'université fédérale de Paraíba (Brésil) se consacre pleinement à l'exploration de nouvelles sources végétales pour identifier et évaluer les effets des molécules, extraites de cette flore, sur des modèles animaux.

Parmi les travaux en cours dans ce laboratoire, les molécules issues du fruit de l'espèce *Spondias mombin* montrent une activité intéressante quant à l'effet vasodilatateur endothélium dépendant observé chez les rats. Cet effet est visible aussi bien *in vivo* qu'*ex vivo*. L'idée développée est d'élargir le nombre d'espèces du genre *Spondias* explorée. Le fruit de l'espèce hybride *Spondias* sp. appelé « umbu-cajá » fait figure de candidat prometteur et inédit.

Ainsi, j'ai débuté un nouveau projet au sein du laboratoire brésilien à João Pessoa et l'ai poursuivi en France à l'Université Claude Bernard Lyon 1.

L'objectif de mon travail a été de décrire et d'analyser les effets provoqués par l'extrait hydro-méthanolique de l'exocarpe d'umbu-cajá. Ceci a été réalisé sur des modèles animaux, en utilisant des méthodes in vivo et ex vivo chez le rat. Dans une première partie, plusieurs définitions ainsi qu'une revue de la littérature sur le genre *Spondias* et le système cardiovasculaire seront abordées. Puis les matériels et les méthodes utilisés lors des expériences seront détaillés, suivis de la description des résultats obtenus. Enfin, dans une dernière partie, une discussion sera établie au vu des précédentes considérations et des perspectives termineront ce travail.

Partie I : Rappel Historique et Bibliographique

1. Le genre *Spondias* L.

1.1 Définition

Le genre *Spondias* L. désigne un ensemble d'espèces botaniques qui sont regroupées selon leurs origines géographiques et données morphologiques. Selon la classification botanique utilisée actuellement, Angiosperm Phylogeny Group (APG) qui est basée sur des critères génétiques, le genre *Spondias* appartient à la famille des Anacardiaceae et compte plus ou moins 23 espèces distinctes dont 13 confirmées (4). Parmi ces 13 espèces, nous pouvons citer *Spondias dulcis*, *S. mombin*, *S. purpurea*, *S. radlkoferi*, *S. tuberosa*, *S. xerophila*. La taxonomie de ces espèces est complexe, en effet plusieurs synonymes désignent un même nom scientifique, par exemple : *S. purpurea* présente de nombreux synonymes comme : *S. cirouella* T, *S. jocote-amarillo* K et *S. mexicana* W entre autres (Tableau 1).

Tableau 1. Classification du genre *Spondias* L.(5)

Taxon	Distribution	Principal synonyms
<i>S. acida</i> Blume	W. Malesia	<i>S. dulcis</i> Parkinson var. <i>acida</i> (Blume) Marchand, <i>Evia acida</i> (Blume) Blume
<i>S. acuminata</i> Roxb.	India, Myanmar (Burma), Thailand (not Malesia)	Treated as synonym of <i>S. pinnata</i> in <i>Flora of China</i> (Min & Barfod, 2008)
<i>S. admirabilis</i> J. D. Mitch. & Daly	Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil	
<i>S. dulcis</i> Parkinson	Pacific; widely cultivated in tropics	<i>Evia dulcis</i> (Parkinson) Blume, <i>S. cytherea</i> Sonn.
<i>S. expeditionaria</i> J. D. Mitch. & Daly	Atlantic Forest of Espírito Santo and Minas Gerais, Brazil	
<i>S. globosa</i> J. D. Mitch. & Daly	W Amazonia; outlier in Zulia, Venezuela	
<i>S. macrocarpa</i> Engl.	E Brazil	<i>S. dulcis</i> Parkinson var. <i>macrocarpa</i> (Engl.) Engl.
<i>S. malayana</i> Kosterm.	Malesia	
<i>S. mombin</i> L.	Mexico to Bolivia and E Brazil; widely cultivated in moist tropics	<i>S. lusea</i> L.
<i>S. novoguineensis</i> Kosterm.	Malesia E of Sulawesi	
<i>S. pinnata</i> (Koenig ex L.f.) Kurz	Indian sub-continent, Indochina, S China	<i>Mangifera pinnata</i> Koenig ex L.f., <i>S. mangifera</i> Willd., <i>S. amara</i> Lam., <i>S. bivenomarginalis</i> Feng K. M., P. Y. Mao, & P. Y. Mao
<i>S. purpurea</i> L.	NW Mexico to Panama (possibly N Colombia and SW Ecuador; widely cultivated in tropics)	<i>S. cirouella</i> Tussac, <i>S. jocote-amarillo</i> Kosterm., <i>S. mexicana</i> Watson, <i>S. negrosensis</i> Kosterm.
<i>S. radlkoferi</i> Donn.-Sm.	Mexico to C America to NW Venezuela and Colombia	<i>S. nigrescens</i> Pittier
<i>S. tefyi</i> J. D. Mitch., Daly, & Randrian.	Madagascar	
<i>S. testudinis</i> J. D. Mitch. & Daly	SW Amazonia	
<i>S. tuberosa</i> Arruda	NE Brazil; cultivated elsewhere in Brazil	
<i>S. venulosa</i> (Mart. ex Engl.) Engl.	E Brazil	<i>S. purpurea</i> L. var. <i>venulosa</i> Mart. ex Engl.
<i>S. xerophila</i> Kosterm.	Sri Lanka	[Kostermans (1991): this may be a syn. of <i>S. acuminata</i>]

Cette pluralité de synonyme se retrouve également avec les noms vernaculaires qui diffèrent selon les régions et pays. Par exemple l'espèce *S. mombin* possède les noms vernaculaires suivant : Prunier mombin, Prunier myrobolan, Creole Plum, Plum Bush, Yellow Mombin. Il en est de même pour les noms de fruit de cette même espèce. Les fruits de *S. mombin* se nomment *cájà ou taperebà*.

1.2 Origine et localisation

En 1753 serait décrite la première espèce du genre : *S. mombin* L; puis *S. purpurea* L et *S. cytherea* Sonn sont apparues quelques temps après (6). Aujourd'hui encore de nouvelles espèces sont décrites comme *S. Testudinis*, identifiée en 2008 (5). Nous savons maintenant que le genre *Spondias* est présent sur les continents asiatique, africain, en Océanie et sur le continent américain, plus particulièrement en Amérique centrale et tropicale. Afin de se familiariser avec la relative complexité géographique de ce genre, une carte des différentes espèces présentes dans le Monde est présentée ci-après (Figure 1).

La localisation des différentes espèces varie selon les continents. En effet, *S. mombin*, *S. pupurea* et *S. tuberosa* sont des espèces natives d'Amérique tandis que *S. cytherea* et *S. pinnata* se retrouvent en Asie (7). Il faut savoir également que des espèces natives d'Amérique tropicale ont été introduites artificiellement en Asie, ce qui est le cas de *S. mombin* et d'autres (8).

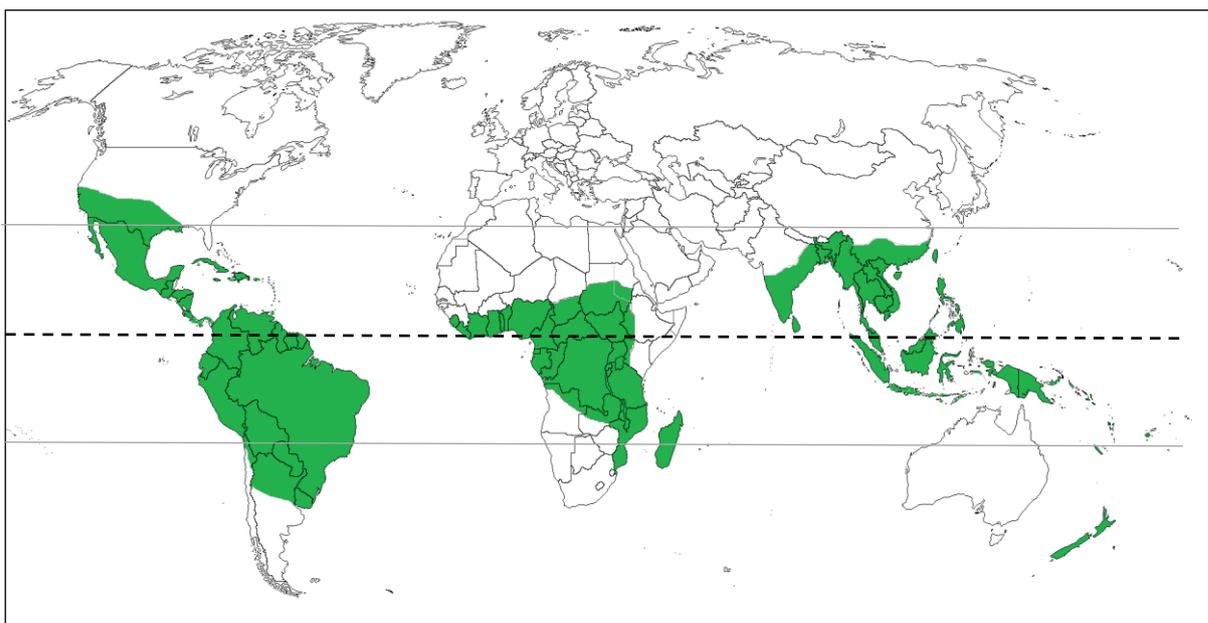


Figure 1. Répartition mondiale du genre *Spondias* (5) (6) (7) (8)

Les conditions propices à la culture des *Spondias* varient d'un climat semi-aride comme au Brésil oriental ou en Amérique centrale (Mexique), à un climat tropical comme en Amazonie, Afrique équatoriale et Asie subtropicale (9). En résumé les différentes espèces se retrouvent délimitées par les deux tropiques avec une présence préférentielle au niveau de l'équateur (Figure 1).

2. *Spondias* sp. ou umbu-cajazeira

Parmi toutes les espèces de *Spondias*, la partie suivante se focalisera sur une en particulier, *Spondias* sp. , que nous nommerons également par son nom vernaculaire « umbu-cajazeira ». Dans la mesure où cette espèce n'a pas été clairement identifiée botaniquement parlant, elle est désignée dans la littérature par : *Spondias* sp ou *Spondias* spp (cf 2.1 Taxonomie). L'acronyme « sp » signifie que les auteurs ignorent encore l'origine botanique et/ou manquent d'éléments pour identifier précisément l'espèce. On désigne aussi « spp » si l'on considère qu'il y a plusieurs espèces ou sous espèces mises en cause pour décrire l'espèce.

2.1 Taxonomie

Nous allons aborder les différents points de vue rencontrés dans la littérature concernant la classification de l'arbre umbu-cajazeira : *Spondias* sp ou spp. Cette espèce est pour la première fois nommée ainsi au début des années 1990 (10). Son fruit est associé à plusieurs noms vernaculaires : « cajá-umbu », « cajárana do sertão » et « umbuguela ». Ceux-ci attestent d'une certaine discordance quant à l'origine botanique de cette espèce.

2.1.1 Description botanique

2.1.1.1 Umbu-cajazeira

Umbu-cajazeira ou Cajá-umbuzeiro (11) est appelé ainsi pour décrire un arbre fruitier à cime globulaire, un peu aplatie ; avec une hauteur pouvant atteindre 8 mètres et une circonférence globale de 20 mètres (Figure 2).

L'écorce externe est grise, fréquemment ondulée avec des fissures, la surface est relativement lisse mais irrégulière et divisée en plaques rectangulaires. Leurs racines sont tubéreuses adaptées aux climats arides grâce à leur tissu aquifère. Les feuilles mesurent de 6 à 17 cm de long, de forme elliptique à ovale ; un pétiole de 1,7 à 5 cm de long. Le pétiole et le

rachis sont glabres. L'inflorescence est terminale avec un pédicelle mesurant de 2,2 à 3,5 mm de long. La période de floraison s'étale du mois d'Août à Février.



Figure 2. *Umbu-cajazeira* et ses fruits(12)

Les fruits, umbu-cajá, sont de forme obovoïde à subglobuleuse avec un apex obtus. Son exocarpe est jaune à maturité, sa surface lisse et terne; son mésocarpe est épais et charnu; l'endocarpe est non sclérifié (5). D'un point de vue botanique, on appelle donc ce fruit une baie, contenant une graine que dans 10% des cas (13). Ainsi leur reproduction est asexuée la plupart du temps, et laisse part à une certaine variété phénotypique et physico-chimique entre les fruits des espèces présentes dans les régions littorales et continentales brésiliennes (12).

2.1.1.2 *Cajárana do Sertão.*

Dans la littérature, nous pouvons également trouver la description botanique de *Cajárana do sertão*. Cette espèce (ou sous espèce) (11) est décrite comme un arbre fruitier xérophile un peu plus petit (6 m de haut) que umbu-cajazeira, en revanche plus large : jusqu'à 25 m ; possédant quasi les mêmes caractéristiques morphologiques que le précédent (Figure 3). Celui-ci possède des caractéristiques réduites de *S. tuberosa*. La différence majeure se situe au niveau du fruit qui est plus rond et de couleur mature orangé-jaune comparé à umbu-cajá qui lui, est plus jaune. L'apex et la base sont arrondis à tronqués avec une surface lisse.



Figure 3. *Cajárana do Sertão* et ses fruits (12)

2.1.2 Analyse chromosomique

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que l'espèce *Spondias* sp. proviendrait de l'hybridation entre *S. tuberosa* (« umbuzeiro ») et *S. mombin* (« cajazeira ») (10,14), d'où son nom vernaculaire : umbu-cajá. Pour cela des analyses génomiques évaluant ces hybrides ont été réalisées dont les conclusions de deux d'entre elles sont mentionnées ci-dessous.

La première des analyses utilise des sondes fluorescentes *in situ* sur différents ARNr. Les caryotypes pour ces 3 espèces ont été réalisés (Figure 4). Ces marqueurs n'ont pas révélé la preuve évidente validant l'hypothèse de l'hybridation. La paire de chromosome 11 et la position préférentielle des bandes sur les bras longs au lieu des bras courts de ses supposés parents, réfutent cette théorie d'une éventuelle hybridation (15).

Une étude génomique plus récente et plus précise (16), utilisant des techniques de PCR-AFLP (polymorphisme de longueur des fragments amplifiés) avec des enzymes de restriction EcoR1/ Mse1 sur le genre *Spondias* compare plusieurs espèces dans 3 régions du nord-est brésilien (dans la ville de Petrolina- Pernambuco (PE), Picos- Piauí (PI) et Senhor do Bonfim - Bahia (BA)). Elle révèle que *Spondias* sp (umbu-cajá) possède une similitude entre *S. mombin* et *S. tuberosa* à hauteur de 50%. Ce résultat laisse penser à une éventuelle hybridation entre ces deux espèces. L'étude montre également une intra-variabilité présente chez les espèces *Spondias* sp et *S. mombin*, ce qui n'est pas le cas pour *S. tuberosa*.

En attendant de plus amples recherches sur ces différents hybrides, on considéra *Spondias* sp ou spp. comme des variants de *S. tuberosa* comme le suggère une révision récente de la littérature sur le genre *Spondias* (5).

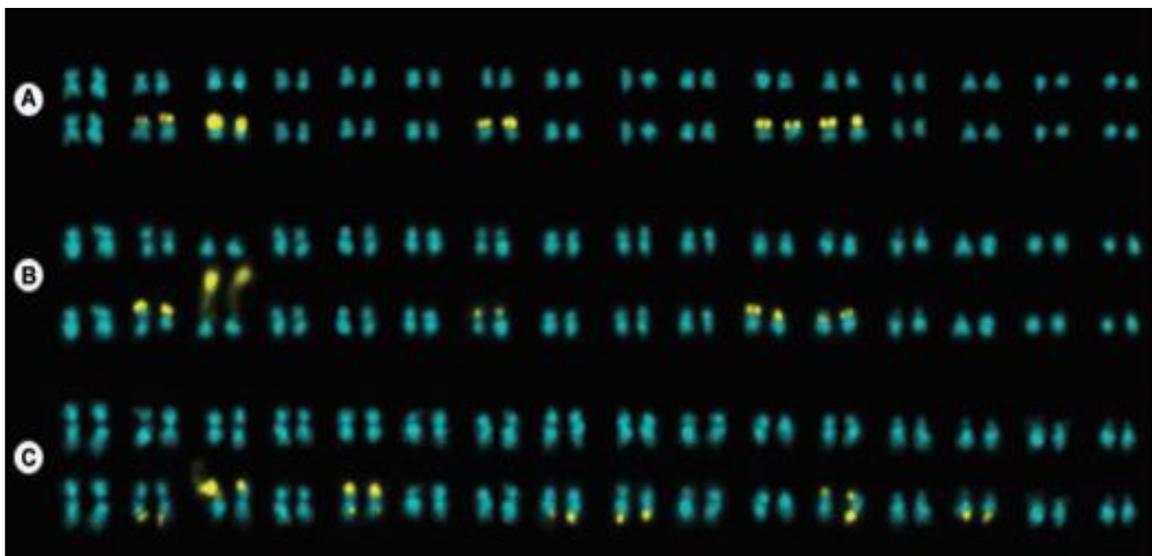


Figure 4. Caryogramme-FISH de *S. tuberosa* (A), *S. mombin* (B), *Spondias* sp. (C) (Umbu-cajá) (15)

2.2 Aspect régional

2.2.1 Origine et localisation

L'arbre *Spondias* sp. se développe dans une écorégion bien particulière du Brésil appelée Caatinga. Située dans le nordeste brésilien, la Caatinga est considérée comme la région possédant un climat semi-aride avec la plus grande biodiversité au monde (Figures 5 et 6) (17). Les conditions météorologiques y sont bien particulières avec une température moyenne de 26°C tout au long de l'année et d'importantes précipitations saisonnières atteignant une moyenne annuelle de 600 millimètre par an. Ce type de biome est présent exclusivement dans cette région au Brésil, avec une surface d'environ 900 000 km², recouvrant près de la moitié de la région du Nordeste. Il est localisé entre les parallèles 2°54'S et 17°21', englobant les états de Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Alagoas (AL), Sergipe (SE), sud-ouest de Piauí (PI), et une partie intérieure de Bahia (BA) et Minas Gérais (18).

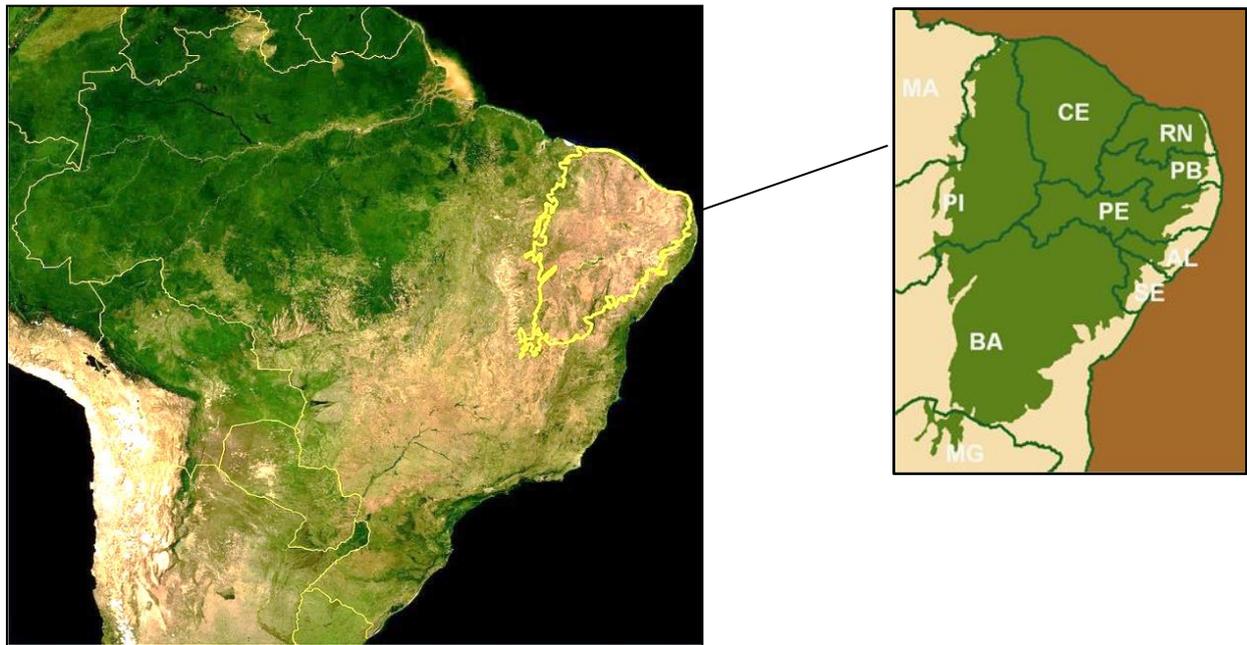


Figure 5. Région géographique de la Caatinga

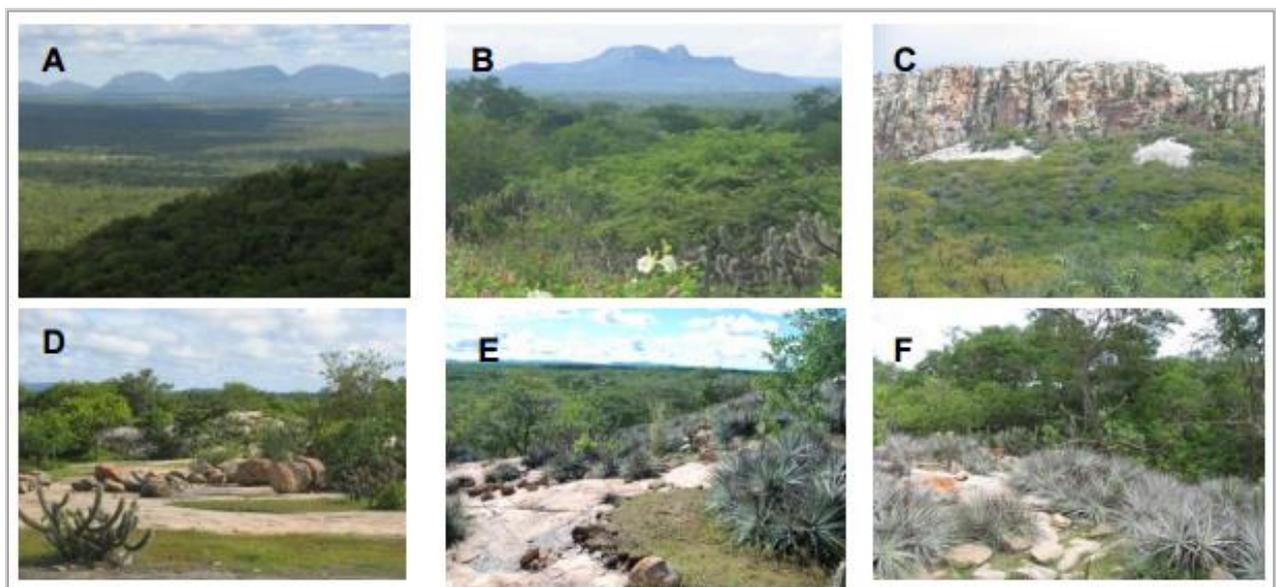


Figure 6. Photographies de la Caatinga. A, B et C font référence aux régions forestières alors que D, E et F montrent une végétation arboricole dominée par les espèces Cactaceae et Bromeliaceae (11)

2.2.2 Exploitation et usages traditionnels

Le nord-est Brésilien est réputé pour son activité agricole intense. Grâce à son climat subéquatorial et ses nombreux fleuves jalonnant la région, une très grande variété de fruits est produite (mangue, ananas, fruit de la passion, goyave, cajou, açaï, graviola, prune mombin, umbu-cajá, papaye, coco et raisin). Cette activité agricole représente un intérêt économique majeur. Pour exemple, l'état de Bahia est l'un des plus gros producteurs de fruit de tout le Brésil avec près de 4 millions de tonnes produit (en 2005) pour une surface d'exploitation de 293 200 hectares, rapportant 92,3 millions de dollars US en recettes d'exportation (14,19)

Historiquement, umbu-cajá est utilisé pour ses propriétés gustatives et nutritives par les populations locales. Son intérêt agro-industriel est grandissant, de par son adaptation à des climats multiples (aride, semi-aride, tropical) et un pourcentage de chair (pulpe) du fruit élevé comparé aux autres fruits. Chaque année un arbre produit 3 à 6 kg de fruit en fonction de son âge (10,20).

Ainsi le fruit peut être destiné pour la consommation directe, ou en jus, ou bien transformé en pâtisseries, glaces et sorbets. (Figures 7 et 8). A savoir que la population brésilienne possède une certaine apétence pour les jus de fruits de par leur grande diversité et leurs propriétés gustatives (21).



Figure 7. Confitures à base d'umbu-cajá



Figure 8. Fruits vendus sur un marché (22)

Les feuilles de ce spondias sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter l'inflammation et des infections courantes. En effet plusieurs études ont recensé des composés actifs dans les feuilles (23,24). Des huiles essentielles des feuilles contiennent notamment des terpènes (β -Caryophyllène) connus pour lutter contre les rhumes grâce à leur action antiseptique (25,26).

2.3 Etude phytochimique du fruit

2.3.1 Caractéristiques physico-chimiques

Notez que la plupart des études réalisées ne prennent pas en compte les deux descripteurs recensés pour *Spondias* sp. et spp. (27). Ainsi nous appelleront, quand cela est clairement défini, les espèces par leurs deux noms vernaculaires : umbu-cajá ou cajarana do Sertão.

2.3.1.1 Morphologie

Commençons par la description du fruit : son poids moyen et son diamètre varient respectivement de 15 à 27 g et de 3,5 à 4,8 cm. Ces deux paramètres sont bien évidemment corrélés entre eux, en prenant en compte les différents âges de chaque collection d'arbre. On peut distinguer une collection de fruit dans la région de Paraíba avec des valeurs moindres : 10,52 à 13,79 g et 2,6 à 3,1 cm (12, 26, 27). La pulpe représente en moyenne 11,5 g du fruit et sa peau 2,1 g ; cela varie en fonction de la maturité du fruit (30). Comme vu précédemment le fruit est de forme variée et cela en fonction des régions de récolte (Figure 9).

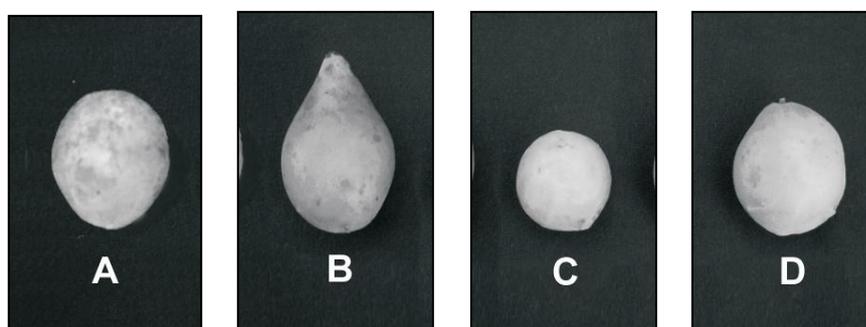


Figure 9. Fruit de umbu-cajá : (A) ovale; (B) piriforme; (C) rond; (D) obovoïde(28)

2.3.1.2 Composants nutritifs

Les études physico-chimiques permettent d'analyser la teneur en sucre et l'acidité de la pulpe du fruit ainsi que ses compositions nutritives. Les résultats des composants nutritifs sont exprimés en pourcentage pour 100 g de pulpe (Tableau 2).

Tableau 2. Composés nutritifs présents dans la pulpe de *Spondias sp.* (29)

Teneur en eau (%)		91,3 ± 0,57	Fibre brute (%)	1,36 ± 0,02
Protéine (%)		0,63 ± 0,005	Calcium mg/100g	12,25 ± 0,05
Lipides totaux (%)		0,11 ± 0,01	Phosphore mg/100g	17,76 ± 1,0
Résidus à 600°C (%)		0,99 ± 0,01	Fer mg/100g	0,59 ± 0,02
Glucides	Totaux (%)	7,49 ± 0,11	Potassium mg/100g	44 ± 0,04
	Glucides non réducteurs (%)	3,20 ± 0,11		
	Glucides réducteurs (%)	4,12 ± 0,23 *7,67 ± 3,34 (12)		
Amidon (%)		0,56 ± 0,035 0,52 ± 0,86 (12)	Sodium mg/100g	40 ± 1,0

*Notons que umbu-cajá aurait un pourcentage plus élevé en sucres réducteurs que cajarana do Sertão (7,67 g.100g⁻¹ en moyenne contre 4,12 g) (12) : umbu-cajá

La concentration totale des solides solubles (en anglais « total soluble solids » -TSS), permet de mesurer, à l'aide d'un réfractomètre, la teneur en sucre dans une solution contenant majoritairement du saccharose. L'unité est le Brix, cela correspond à une échelle (0-100 Brix%) basée sur la valeur de réfraction et la masse totale de solide dissous d'une solution de saccharose pure à 20°C. i.e : 60° Brix est équivalent à une solution contenant 60% de saccharose.

L'acidité totale (en anglais « Total titratable acidity » - TTA) est la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH à 7 par addition d'une solution alcaline titrée (31). Il est important que cette valeur soit supérieure à 1 pour garantir une protection contre le développement des micro-organismes ; ceci constitue un critère important pour les industriels. Le rapport de deux TTS/TTA permet d'évaluer la qualité du fruit. En effet les industries agroalimentaires (brésiliennes) préfèrent un rapport à valeur positive et élevée définissant une meilleure appétance (32).

Ces deux paramètres précédemment décrits ont été mesurés et figurent dans le Tableau 3 pour trois espèces géographiques différentes d'umbu-cajá.

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques de plusieurs échantillons de fruits matures d'umbu-cajá (28–30,32)

Origine	Paramètre (pour 100.g ⁻¹)	TTS % (°Brix)	TTA (% d'acide citrique)	TTS/TTA	pH
BREJO PARAIBANO (PB) 6° 58' 12'' S 35° 42' 15'' W		11,86 ± 2,29	1,05 ± 5,75	11,49 ± 5,87	3,40 ± 2,09
MATA PERNAMBUCANA (PE) 70° 4'50'' S 35°06'30'' W		14,84 ± 4,84	1,66 ± 8,67	9,05 ± 1,92	2,2 ± 3,29
SANTA TERESINHA (BA) 12° 46' 19'' S 39° 31' 22'' W		10,6 ± 3,4	1,75 ± 2,85	7,15 ± 3,45	2,85 ± 1,45

Notons également que le degré de maturité du fruit influe sur les paramètres décrits précédemment, en effet l'acidité diminue (TTA) alors que la teneur en sucre augmente (TTS) avec le temps (33).

2.3.1.3 Composés volatiles

Dans cette sous partie nous étudions les composés volatiles dégagés par le fruit entier (pulpe et peau). Après avoir mixé, filtré et distillé le fruit entier de *Spondias* sp. les composants les plus volatiles s'évaporent pour être ensuite capturés et analysés à l'aide d'une colonne à chromatographie à phase gazeuse. Parmi toutes ces molécules volatiles, les composants majeurs sont des terpènes (88%) et des esters comme l'éthyl-butyrate (34). Une étude complémentaire, incluant le facteur de maturité, référence ces composants (93 pics sur le chromatogramme) à des stades de maturité différents. Au total 67 molécules sont clairement identifiées dans le fruit à maturité moyenne avec 22,2 % de β -Caryophyllène (terpène), 19,3 % de 2-méthylbutanal et 18,6 % de 2-hexanol. Cependant au cours du vieillissement du fruit, le β -caryophyllène et le 2-hexanol diminuent (respectivement 14,1 et 15%) tandis que le 2-méthylbutanal augmente (28,4%). De nouveaux composants tels que l'isométhyl butanoate, 2,5-diméthylfurane, 2-éthylfurane, 2-méthyl-2-pentanol, 3-carène et le 1-hexanol apparaissent seulement au stade mature. Ceux-ci contribuent, avec le butanal, à l'apparition d'un arôme plus fort tout au long du processus de maturation (35).

On observe ainsi un grand nombre de composés chimiques qui appartiennent à plusieurs familles chimiques dont des terpènes et aldéhydes majoritairement. Cette chimiodiversité est due au métabolisme secondaire des végétaux impliqués dans la survie, le développement et la reproduction de ces derniers.

2.3.2 Activité anti-radicalaire

Par définition l'activité anti-radicalaire est la capacité de capter des molécules instables, non appariées électroniquement comme les radicaux libres. Cette activité est principalement due aux vitamines C et E, aux polyphénols, et aux caroténoïdes chez les végétaux. Notons que les polyphénols ont une activité plus importante dans cette fonction comparés aux autres composants précédemment cités. Ceci s'explique par leur faible potentiel redox, capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants, et par leur grande variété et concentration importante dans les fruits (36,37).

Les tests généraux présentés ci-après permettent d'identifier l'activité anti-radicalaire (anti-oxydante) d'un extrait végétal et d'effectuer sa quantification.

2.3.2.1 Tests généraux

Plusieurs méthodes existent pour mesurer le pouvoir anti-radicalaire, ce sont toutes des méthodes associées à des tests colorimétriques (ou d'absorbance UV-Visible) d'oxydo-réduction. Parmi elles, nous pouvons identifier : FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) et DPPH• (Diphényl-picrylhydrazyle). Les deux derniers acronymes sont des méthodes utilisant les radicaux libres énoncés entre parenthèses. FRAP, ABTS et ORAC sont utilisés généralement pour apprécier l'activité des composants hydrophiles, à contrario du test au DPPH qui permet aux deux propriétés (lipophile et hydrophile) d'être évaluées. Les tests sont exprimés généralement en concentration équivalente de Trolox active (TEAC). Ce qui représente en μmol de Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E) l'activité anti-radicalaire équivalente dans une certaine quantité (ici en gramme) d'échantillon (38). Cette quantité équivalente est détectée par spectrophotométrie UV.

Une multitude de composants moléculaires ont une activité séquestrante au même titre que les radicaux libres, c'est la raison pour laquelle il est recommandé de coupler au moins deux

méthodes pour un échantillon afin d'être au mieux représentatif. Par exemple le test au DPPH• est conseillé lorsque l'extrait possède des molécules avec des groupements thiol (-SH), amine (-NH) ou hydroxyle (-OH) (36).

L'activité totale est définie et souvent déterminée grâce aux méthodes ABTS et ORAC (Tableau 4). Dans la littérature on trouve pour des fruits matures, les valeurs suivantes :

Tableau 4. Activité anti radicalaire de plusieurs fruits de l'espèce *Spondias* (pulpe) (12)

Test Espèce	ABTS (mg.g ⁻¹ de VCEAC)	ORAC (mM. g ⁻¹ TEAC)	FRAP (mM. g ⁻¹ TEAC)
<i>Umbu-cajá</i>	0,28 ± 0,05	0,25 ± 0,06	
<i>Cajarana do Sertão</i>	0,46 ± 0,06	0,84 ± 0,04	
Umbu (<i>S. tuberosa</i>)	0,18 ⁽³⁹⁾ et 0,31 ± 0,04	0,78 ± 0,08	0,011 ± 0,005 ⁽⁴⁰⁾
Cajá (<i>S. mombin</i>)			0,012 ± 0,005 ⁽⁴⁰⁾

NB : le Trolox a été remplacé par de la vitamine C pour le dosage ABTS, les résultats sont exprimés en VCEAC (Vitamine C équivalent)

Nous trouvons pour un même test, des valeurs du même ordre de grandeur entre umbu-cajá et cajarana do Sertão; elles oscillent respectivement de 0,28 à 0,46 mg.g⁻¹ VCEAC avec la méthode ABTS et de 0,25 à 0,84 mmol TEAC.g⁻¹ avec la méthode ORAC (12). Dans la mesure où ces résultats ont été obtenus avec des méthodes différentes (ABTS et ORAC) et que l'unité de référence n'est pas la même (TEAC et VCEAC), nous ne pouvons pas comparer les deux méthodes ABTS et ORAC entre elles, pour un fruit donné.

En ce qui concerne la pulpe des espèces *Spondias tuberosa* (« umbu ») et *Spondias mombin* (« cajá ») des résultats sont obtenus par la méthode FRAP en utilisant la même unité de référence : le mol TEAC.g⁻¹. Leur pouvoir antioxydant est respectivement égal à 11,64 et 12,64 ± 0,5 µmol TEAC.g⁻¹ (40). Les valeurs obtenues avec la méthode FRAP pour umbu sont plus basses (facteur 10) que pour celles obtenues avec la méthode ORAC (même unité). Cette

dernière comparaison vient confirmer la différence de sensibilité quant à l'évaluation du pouvoir antioxydant d'un extrait végétal.

2.3.2.2 Identification et quantification des composants antiradicalaires

Vitamine C (12,33)

Cette vitamine est un composé dérivé des itols (oses) aussi appelé acide ascorbique, c'est une molécule hydrophile. Elle est présente dans la pulpe du fruit avec une concentration allant de 3,6 à 16,4 mg (pour 100 g de pulpe de *Spondias* sp.). C'est une moyenne faible comparé aux autres agrumes tels que le Citron ou l'Orange qui atteignent 50 mg. Cependant, il semblerait que Cajárana do Sertão contienne plus de vitamine C : 33,07 à 38,19 mg.100g.⁻¹ (12).

La maturité du fruit est également source de variabilité. En effet, un fruit totalement mûr aura un taux d'acide ascorbique plus bas (12,90 mg.100 g⁻¹) qu'un fruit totalment vert (14,25 mg.100 g⁻¹), et qu'un fruit à maturation moyenne (18,35 mg.100 g⁻¹) (33).

Caroténoïdes (12,19,41)

Formés grâce à des sous unités d'isoprénoïdes, les caroténoïdes sont des molécules plutôt lipophiles. Dans les fruits d'umbu-cajá on retrouve 0,905 à 1,207 mg. 100g⁻¹ de caroténoïdes totaux (TC) ; parmi eux sont présents comme molécules majeures : la zeaxanthine (0,802 mg. 100 g⁻¹) et la β -cryptoxantine (0,137 mg. 100 g⁻¹). Pour Cajarana do Sertão nous obtenons un TC de 0,5147 à 1,73 mg. 100 g⁻¹ ; une étude a retrouvé jusqu'à 2,59 mg. 100 g⁻¹ avec un mélange de la pulpe et la peau du fruit. Tout comme umbu-cajá, la zeaxanthine est le composant majeur : 0,463 mg. 100 g⁻¹, suivi cette fois-ci du β -carotène 0,279 mg. 100 g⁻¹ et de la β -cryptoxantine 0,189 mg. 100 g⁻¹. Le β -carotène et la β -criptoxantine ont une activité pro-vitamine A, cette fonction les classe dans la catégorie des molécules précurseurs antioxydants.

Umbu (*S. tuberosa*) et Cajá (*S. mombin*) ont également des concentrations similaires avec umbu-cajá (40), excepté une valeur de TC retrouvée pour umbu à 4,8 mg. 100 g⁻¹ (4 fois supérieur) (42).

Polyphénols (12,41,43)

Dans cette grande classe, où le terme le terme « phénol » regroupe approximativement 1000 composés naturels identifiés, on distingue les familles des acides phénoliques, coumarines, flavonoïdes, tanins condensés et des lignanes. Ce sont des molécules plutôt hydrophiles, caractérisées par la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester ou hétéroside (Figure 10).

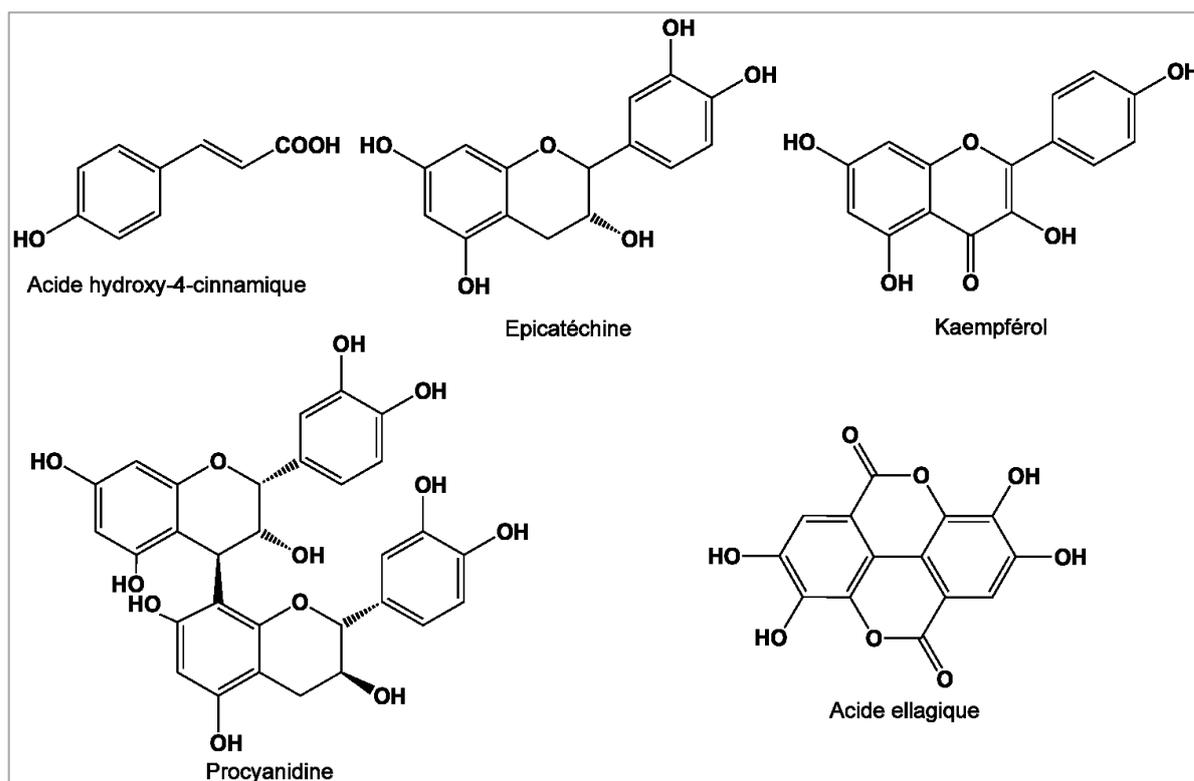


Figure 10. Formules chimiques de quelques polyphénols

Pour déterminer la teneur en polyphénol de la pulpe du fruit l'index du contenu phénolique total (TPC) est utilisé, déterminé grâce au réactif de Folin-Ciocalteu, et exprimé en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de fruit. Les différentes valeurs moyennes retrouvées pour umbu-cajá sont 29,63, 44,68 et 149,7 mg EAG.100g⁻¹. Tandis que pour cajarana do Sertão 26,87 et 36 mg EAG.100g⁻¹. Toutes ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celle de *S. tuberosa* (umbu) : allant de 23,38 à 92,4 mg EAG.100g⁻¹ (Tableau 5).

Les flavonoïdes donnent une coloration jaune au fruit (ici, la pulpe) et leur contenu en flavonoïde total (TFC) atteint 1,98 à 2,69 mg équivalent en quercétine (QE) pour 100 g⁻¹ de

pulpe de fruit pour umbu-cajá et 3,17 mg QE. 100 g⁻¹ pour cajarana do Sertão. Cependant une étude a montré une valeur de 27,76 mg QE. 100g⁻¹ pour umbu-cajá (19). Umbu (*S. tuberosa*) possède des valeurs comprises entre 2,69 et 6,9 mg QE.100g⁻¹ (Tableau 5).

Tableau 5. TPC et TFC de la pulpe sur différentes espèces de *Spondias*

Test Espèce	TPC, Folin Ciocalteu (mg EAG.100 g ⁻¹)	TFC (mg QE.100 g ⁻¹)
<i>Umbu-cajá</i>	29,63 ⁽¹⁹⁾ , 44,68 ⁽¹²⁾ et 149,7 ⁽⁴³⁾	1,98 ⁽¹²⁾ , 2,69 ⁽⁴³⁾ et 27,76 ⁽¹⁹⁾
<i>Cajarana do Sertão</i>	26,87 ⁽¹²⁾ et 36 ⁽¹⁹⁾	3,17 ⁽¹²⁾
Umbu (<i>S. tuberosa</i>)	22,38 ⁽¹²⁾ , 32,7 ⁽⁴⁵⁾ , 44,6 ⁽⁴²⁾ 92,4 ⁽²⁴⁾	2,69 – 6,9 ⁽¹²⁾

La catéchine et l'epicatéchine sont des flavonoïdes retrouvés dans des jus et vins analysés par étude brésilienne réalisée en 2014, comptant parmi eux un extrait d'umbu-cajá (44). Nous pouvons remarquer que la valeur la plus élevée du TPC parmi les différents extraits de jus de fruit est obtenue avec le vin commercial de type Merlot (Figure 11). Notons que umbu-cajá est l'extrait le plus riche en polyphénol parmi les « vins » préparés par l'étude. De plus des analyses chromatographiques de ces jus ont permis de confirmer la présence de ces deux flavonoïdes.

Tous ces composés anti-radicalaires constituent un intérêt majeur dans la consommation de fruit et légumes pour l'Homme. En effet il est connu du grand public la nécessité de maintenir un apport régulier d'au moins « 5 fruits et légumes par jour » pour être en bonne santé (45). Une multitude d'effets qualifiés de bienfaits sont conférés à ce mode d'alimentation, permettant de lutter contre le vieillissement, la fatigue chronique et d'autres maladies notamment vasculaires.

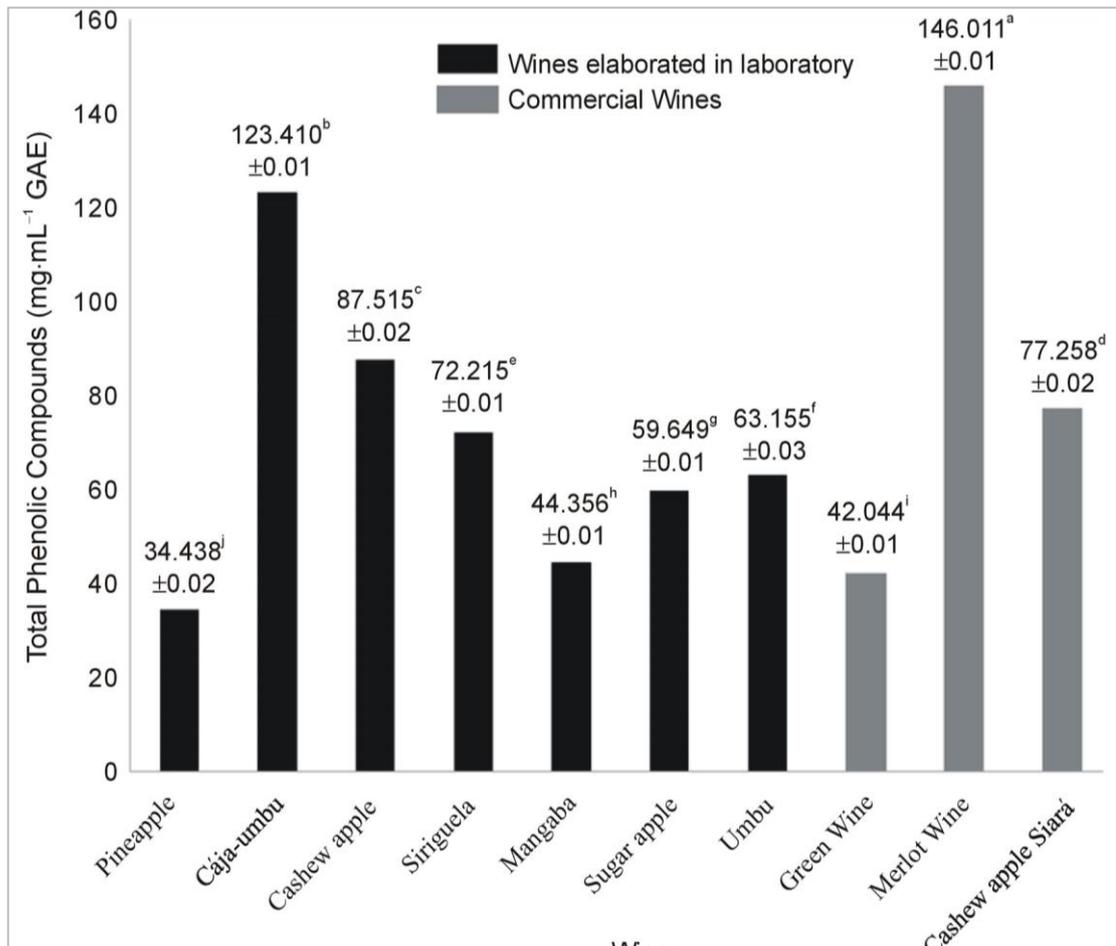


Figure 11. TPC de plusieurs jus de fruits exotiques et de vins commerciaux (44)

3. Le système cardio-vasculaire

3.1 Rappels anatomiques et physiologiques

3.1.1 Vaisseaux sanguins et pression artérielle

Ce système permet de transporter le sang et ses composants partout dans l'organisme alimentant les différents organes. Le corps humain est composé de deux grands types de vaisseaux sanguins : le réseau artériel et le réseau veineux (Figure 12). Le premier est caractérisé par un flux sanguin pulsatile riche en oxygène (excepté pour les artères pulmonaires), expulsé du cœur pour atteindre les ramifications en aval (artères, artérioles puis capillaires). Le second possède un flux continu, pauvre en oxygène (sauf pour les veines pulmonaires), se réunissant pour former des vaisseaux de plus gros calibre (veinules, veines) pour atteindre le cœur et ses veines caves (46). A noter que les veines ont un plus gros diamètre que les artères.

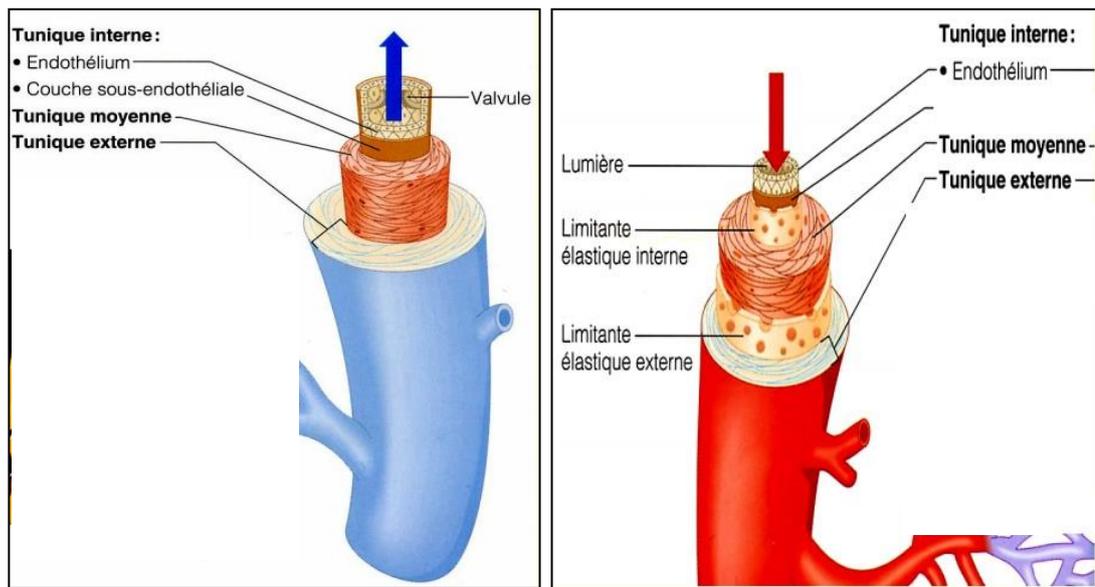


Figure 12. Différentes couches des vaisseaux : veine (à gauche) , artère (à droite) (47)

Les vaisseaux sanguins

- L'adventice est la couche la plus externe, composée d'un tissu conjonctif élastique. Des petits vaisseaux (vasa vasorum) capillaires vascularisent la paroi. Des fibres nerveuses (para et orthosympathiques) sont également présentes ; les veines ne possèdent que l'afférence orthosympathique. Dans les artères de gros calibre, l'adventice et la media sont séparées par la limitante élastique externe, une couche acellulaire élastique.

- La couche moyenne appelée media est composée de collagène et d'élastine, ainsi que des cellules musculaires lisses (CML) permettant la vasoconstriction. On remarque que les artères ont une couche plus épaisse ; permettant une contraction plus forte que les veines.
- L'intima, étant la couche la plus interne, est tapissée par de l'endothélium vasculaire : couche unicellulaire reposant sur une couche de tissu conjonctif. Cette couche est très importante, elle permet la synthèse et la transmission de substances vaso-actives entre autres, stimulant les CML (voir plus bas 3.1.2). Pour les artères cette couche est séparée de la Media par une limitante élastique interne. Les veines présentent la particularité d'avoir des valves à l'intérieur de leur lumière, cela permet un retour sanguin depuis les membres distaux. Ces valves sont mises en cause lors des insuffisances veineuses.

La pression sanguine

Le flux présent à l'intérieur des vaisseaux exerce une pression contre les parois, pression mesurée en millimètre de mercure (mm Hg). Les valeurs normales sont comprises entre 120-140 mm Hg (systole) et 80-89 mm Hg (diastole). Les veines n'ont presque pas de pression au sein de leur lumière. Seul l'action des muscles squelettiques se contractant autour d'elles permettent d'engendrer un retour sanguin jusqu'au cœur. C'est pour cela que pour la suite on admettra que pression sanguine est confondue avec la pression artérielle (PA). D'un point de vue physique, la pression artérielle peut être reliée au débit cardiaque (DC) et à la résistance périphérique des vaisseaux (RP) par la formule simplifiée suivante :

$$PA = DC \times RP$$

Les artérioles sont les principaux déterminants de la RP (résistance offerte par l'ensemble des artérioles systémiques) en fonction de leur diamètre qui peut varier très fortement. Si le diamètre diminue, la RP augmente. Deux autres facteurs rentrent aussi en compte dans la RP : la viscosité du sang, si elle augmente, la RP augmente ; et la longueur totale des vaisseaux sanguins, si elle est grande, la RP croît également. La régulation physiologique de la PA s'effectue grâce à plusieurs systèmes dont les deux principaux sont (46,48) :

- Les Barorécepteurs (aortiques et carotidiens) via les centres bulbaires para et orthosympathiques et les centres orthosympathiques médullaires vont diminuer ou augmenter le tonus vasculaire ainsi que l'activité du cœur. Cette régulation est réalisée en réponse à une pression sanguine « mesurée » par ces barorécepteurs.

o Le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) : C'est le rein qui a le rôle de régulateur de la pression sanguine ici, une baisse de la PA va activer le SRAA. La rénine sécrétée par le rein va catalyser la transformation d'angiotensinogène en angiotensine I qui sera convertie en angiotensine II par une enzyme pulmonaire (l'enzyme de Conversion). Cette angiotensine II agira sur les vaisseaux (via les récepteurs spécifiques AT2) ainsi que sur la stimulation des glandes surrénales qui secrèteront de l'Aldostérone (hormone augmentant la volémie). On le reverra par la suite mais notons que le rein est à l'origine principalement de problème d'hypertension secondaire.

3.1.2 Mécanisme endothélial et facteurs vasculaires circulants

L'endothélium possède plusieurs fonctions physiologiques. Il contrôle le tonus vasculaire, il a un rôle dans l'agrégation plaquettaire, l'adhésion de cellules leucocytaires et dans la fibrinolyse. Il régule la perméabilité des vaisseaux sanguins, et participe à la libération de diverses substances plasmatiques.

3.1.2.1 Principaux facteurs vasoconstricteurs

Physiologiquement la Noradrénaline et l'Adrénaline, via les récepteurs alpha-adrénergiques, vont amorcer une vasoconstriction. L'Angiotensine II via ses récepteurs AT2, l'Endotheline-1 via ses récepteurs ET-A, les facteurs sécrétés par les plaquettes lors de l'hémostase primaire (le PGF2 α , le thromboxane et la sérotonine), ainsi que l'histamine relâchée par les mastocytes contribuent à une contraction des CML.

3.1.2.2 Facteurs secondaires vasoconstricteurs

Ensuite il existe des facteurs secondaires conduisant à la vasoconstriction. Ils agissent par diminution quantitative des facteurs vasodilatateurs. Ce sont majoritairement les espèces réactives oxygénées (appelés ROS - Reactive Oxygen Species) synthétisées de façon endogène par des enzymes dont la NADPH oxydase (voir plus loin 3.2.4.1). Les ROS favorisent notamment l'inactivation du facteur vasodilatateur oxyde nitrique (NO); et ont une double particularité conduisant un phénomène de vasorelaxation (voir chapitre 3.3.2.2) (49,50).

3.1.2.3 Facteurs vasodilatateurs

Le principal composant vasodilatateur physiologique est le NO et qui est un radical libre par définition. Petite molécule, elle diffuse à travers la paroi endothéliale pour aller activer la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dans les CML impliquant un relâchement musculaire. Elle possède également d'autres rôles au sein de l'endothélium (voir partie I. 3.3.2.2). Cet oxyde nitrique est principalement synthétisé dans l'endothélium par la NO synthétase endothéliale (eNOS) à partir de l'acide aminé la L-Arginine (Figure 13).

Le second composant vasodilatateur est le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHf). Il n'est pas encore bien caractérisé sur le plan biochimique mais il est responsable d'une action hyperpolarisante locale via des canaux potassiques calcium dépendant à haute et moyenne conductance (IKca, SKca) ou bien des jonctions gap, induisant une relaxation des CML (Figure 13). Le nombre de jonctions gap est inversement proportionnel à la taille des vaisseaux (51).

Enfin, le troisième facteur vasodilatateur peut se décliner sous plusieurs formes dérivées de l'acide arachidonique (AA) telles que la Prostacycline GI_2 (PGI_2), et des prostaglandines (PGE_2 ...), synthétisées par la cyclooxygénase de type 2 (Cox-2). Ils vont augmenter la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans les CML et provoquer le relâchement musculaire (Figure 13). Dans certaines conditions la PGI_2 peut favoriser la vasoconstriction. D'autres substances comme le peptide natriurétique atrial, la bradykinine, l'acétylcholine exercent leur action vasodilatatrice de façon indirecte via une réponse endothéliale accompagnée d'une sécrétion de NO (52).

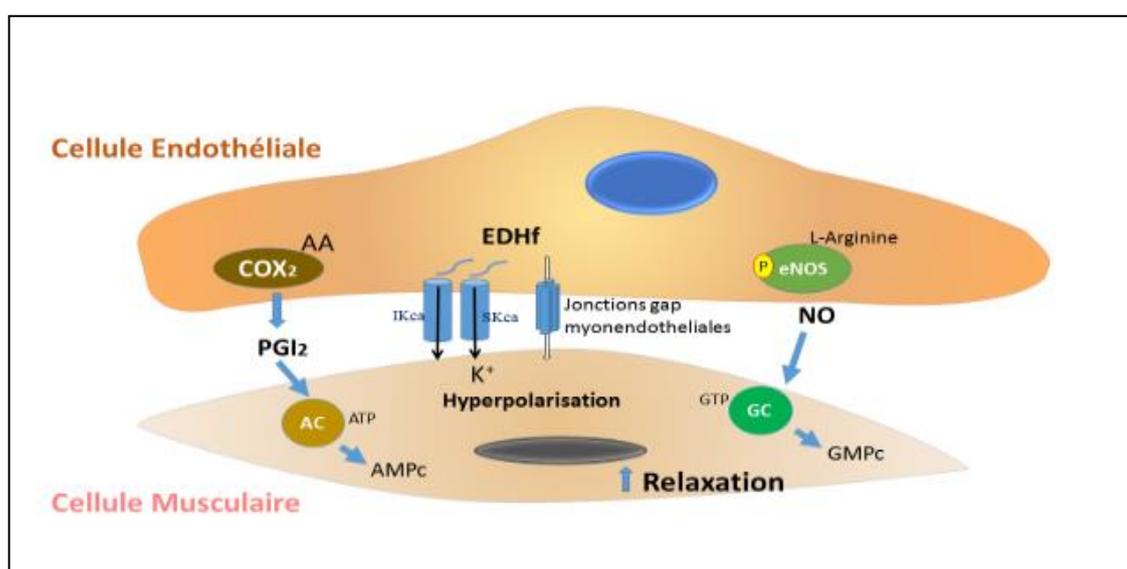


Figure 13. Principaux facteurs vasodilatateurs communiquant entre l'endothélium et les CML

3.2 L'hypertension artérielle

3.2.1 Définition

L'hypertension artérielle (HTA) est définie par une trop forte pression sanguine et ceci de manière permanente contre les parois artérielles. Elle doit être confirmée par au moins 3 consultations médicales consécutives sur une période de 3 à 6 mois. Les valeurs seuils sont de 140 mm Hg pour la pression systolique et 90 mm Hg pour la diastolique selon la fédération française de cardiologie (voir Tableau 6).

Tableau 6. Valeurs et classification de l'hypertension artérielle (53)

Définitions	Systolique	Diastolique	Risque d'accident cardiovasculaire*
Tension optimale	< 120	< 80	
Tension normale	120-129	80-84	
Tension normale élevée	130-139	85-89	< 15 %
Hypertension légère	140-159	90-99	15 à 20 %
Hypertension modérée	160-179	100-109	20 à 30 %
Hypertension sévère	> 180	> 110	> 30 %

*Risque de faire un accident cardiovasculaire dans les 10 ans (hommes de plus de 45 ans et femmes de plus de 55 ans)

3.2.2 Epidémiologie

L'HTA est un facteur de risque (FDR) majeur provoquant l'apparition de maladies cardiovasculaires (MCV) comme l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance cardiaque ou bien coronaires aiguës. L'HTA est d'autant plus grave qu'elle est associée à d'autres facteurs de risque tels que le diabète, l'hypercholestérolémie-LDL, le tabac, l'obésité, et l'absence d'exercice physique. Avec un moindre degré : l'âge, le sexe masculin et les antécédents personnels et familiaux sont également des facteurs de risques des MCV (45, 51, 52).

En 2012, 17,5 millions de personnes mourraient de MCV et selon les projections de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) ce chiffre atteindrait 27 millions en 2030. C'est pourquoi il est important d'agir sur les FDR majeurs tels que l'HTA. C'est ce que des pays comme la France (Fr) ou le Brésil (Br), semblent avoir pris conscience de cet enjeu sanitaire majeur. En effet, la mortalité due aux MCV a diminué entre 2000 et 2012 : respectivement de 131,2 à 85,6 (Fr) et 288,8 à 214,2 (Br) morts pour 100 000 habitants.

Malgré tout, les MCV restent la 2^{ème} cause de décès en France en 2012, et la première au Brésil en 2015, selon les dernières données épidémiologiques disponibles et vérifiées au cours de l'année 2016 (56,57).

3.2.3 Etiologie et facteurs de risque

Comme pour bon nombres d'autres pathologies, aucune cause directe n'est retrouvée quant à l'origine de son développement, dans ce cas l'hypertension artérielle est dite « essentielle ». Cependant de nombreux FDR sont connus pour augmenter cette HTA : le surpoids, l'absence d'activité physique ou l'alimentation et en particulier l'excès de sel, le diabète sucré, le stress. Des maladies du rein et des artères rénales (sténose), des glandes surrénales ou de maladies hormonales peuvent, dans 10% des cas, provoquer une hypertension artérielle dite « secondaire ». Et plus exceptionnellement ($\leq 5\%$ selon les auteurs), l'HTA est dite « familiale » résultant d'une mutation génétique et impliquant les récepteurs à l'angiotensine AT1 et AT2 (45, 51, 52).

3.2.4 Altérations vasculaires

L'HTA est connue pour être à l'origine d'une hausse de la vasoconstriction sous-jacente à une altération de l'endothélium. La compliance des vaisseaux, notamment celle des artères se verra fortement diminuée. Plusieurs mécanismes sont en mis en jeu tout particulièrement ceux associés à la création d'un stress oxydant qui augmente les ROS dans l'organisme. Ces ROS ont un rôle primordial dans le développement des MCV (artériosclérose, insuffisance cardiaque, HTA, AVC) en abaissant la biodisponibilité du NO dans les vaisseaux et les reins (58–60). Ils provoquent également un effet sur la croissance des CML et leur différenciation, un remaniement de la matrice-extra cellulaire, ainsi qu'une stimulation de molécules telles que les kinases et des gènes pro-inflammatoires (Figure 15). Tous ces changements physiologiques et

biochimiques participent et alimentent ce « stress oxydatif », impliquant une augmentation de la concentration en ROS dans les cellules (61).

On retrouve ce phénomène oxydatif dans plusieurs modèles d'animaux hypertendus. Les concentrations de ROS sont augmentées chez ces animaux, comme les rats SHR (spontanément hypertendus par croisements génétiques) et DOCA-salt (administration de Deoxycorticosterone + uni-néphrectomie), par rapport aux valeurs mesurées chez les animaux normaux-tendus (62).

3.2.4.1 Généralités sur les radicaux libres

Les ROS, sont des espèces chimiques très fugaces, produites par des réactions d'oxydation-réduction, à l'égal du dioxygène (O_2) oxydée en eau (H_2O), par des successions de réactions avec des molécules instables comprenant un électron non appariés (Figure 14) :

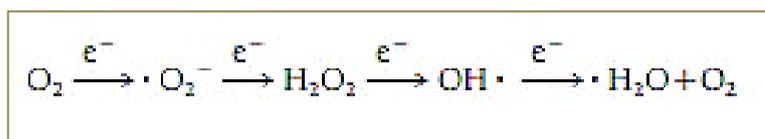


Figure 14. Dérivés réactifs de l'oxygène

Les principaux radicaux sont l'anion superoxyde (O_2^\bullet), le radical hydroxyl (OH^\bullet) et l'oxyde nitrique (NO). Les autres ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxydinitrite ($ONOO^\bullet$), le dioxyde d'azote (NO_2) ne sont pas considérés comme des radicaux libres mais comme des radicaux ayant des pouvoirs oxydants importants. Des systèmes enzymatiques permettent d'éliminer et d'éviter un surplus de ces ROS. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou bien la glutathion peroxydase (52).

3.2.4.2 Origine des espèces radicalaires

La production radicalaire endogène est assurée par des enzymes également : les NADPH-oxydases (Nox), les xanthine-oxydases (XO), les cyclo-oxygénases (Cox), les lipoxygénases, le cytochrome P₄₅₀ (CYP450) et les enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire. D'autres facteurs exogènes sont vecteurs de ROS comme les rayons UV, le tabac, les poussières fines (amiantes, charbon...) et l'effort physique intense, ainsi que l'âge (58, 60, 61).

3.2.4.3 Situation pathologique

Les conséquences majeures de l'action de ces molécules oxydantes (ROS) sur l'endothélium sont très préjudiciables, que ce soit au cours de la genèse, ou lors de l'installation chronique des altérations cellulaires. Toutes les fonctions biologiques normalement responsables d'un équilibre entre les différents systèmes seront in extenso perturbées. C'est ce que montrent les effets des ROS sur le NO (Figure 15).

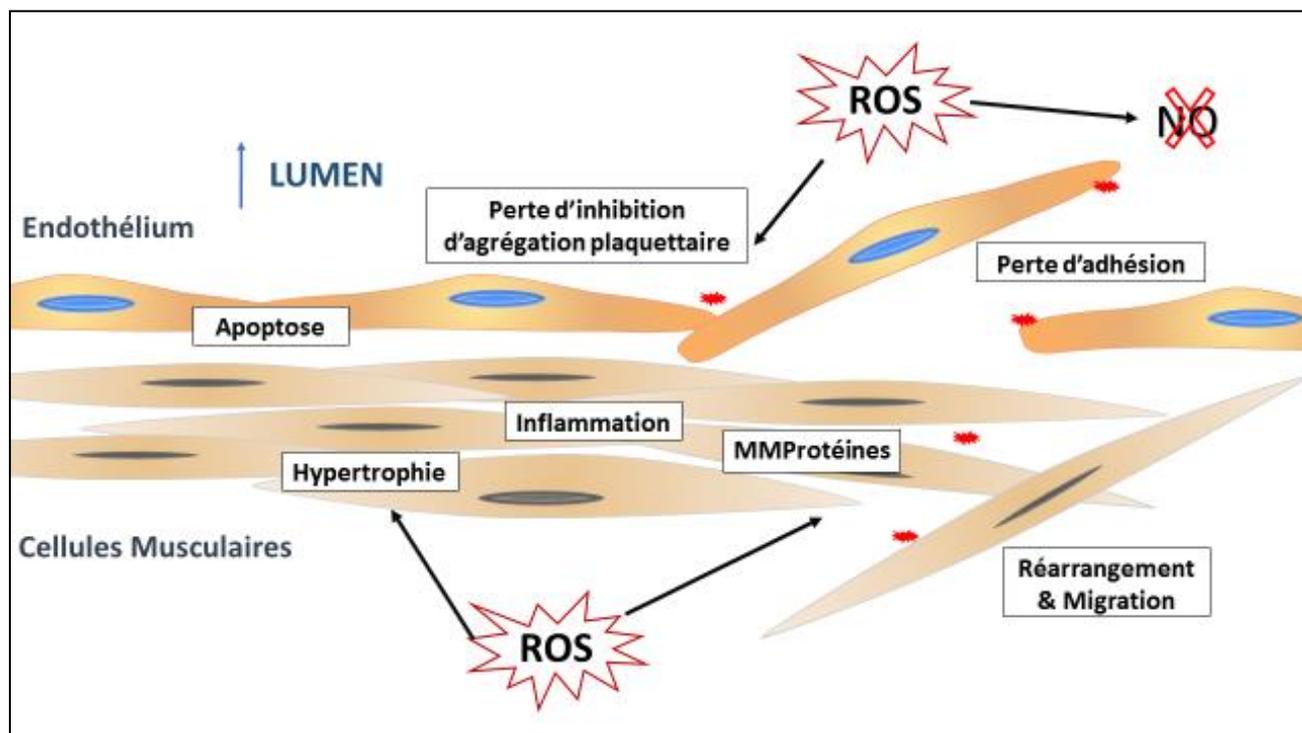


Figure 15. Action des ROS sur les fonctions physiologiques du NO et ses conséquences sur l'endothélium et les cellules musculaires

Le monoxyde d'azote normalement régulateur des fonctions d'adhésion cellulaire, d'agrégation plaquettaire, sera dégradé : processus qui va favoriser une augmentation de la perméabilité endothéliale. Par conséquent une brèche pourra se former, propice aux dépôts de LDL-cholestérol et créant un phénomène inflammatoire qui peut mener à une prolifération des CML et aboutissant jusqu'à la formation d'une plaque athérosclérotique. Des migrations cellulaires modifieront l'architecture du vaisseau notamment à cause des métalloprotéases matricielles. Ainsi l'endothélium ne sera plus capable de remplir correctement ses fonctions de régulation de la PA (62, 63). De plus le NO sera oxydé en ONOO qui aura pour action (à haute concentration) de stimuler la formation de ROS via le découplage de (e)NOS (uncoupled-NOS) et d'inhiber la SOD, la Guanylate Cyclase soluble ainsi que la prostacycline synthase (67). Tous

ces mécanismes pourront conduire à un vieillissement prématuré et/ou une HTA essentielle (68). Tout comme le NO, l'EDHF et ses canaux potassiques seront altérés structurellement par les ROS provoquant une baisse d'activité de la voie de signalisation vasodilatatrice des cellules endothéliales médiée par les CML (69).

Notons que ce sont les mêmes enzymes (XO, Nox, Cox, CYP450...) qui synthétisent les ROS aussi bien en situation pathologique qu'en situation normale physiologique. Il se crée dans certaines conditions (faible apport en L-arginine et/ou en cofacteur BH4) un phénomène appelé « uncoupled-NOS » qui paradoxalement, implique eNOS synthétisant ONOO• à la place du NO•. De plus nous pouvons remarquer que les ROS augmentent quantitativement avec l'âge (61, 67). En effet chez les rats SHR et DOCA-salt, l'activité des XO et du phénomène uncoupled-NOS sont exacerbés (71,72). Enfin il semblerait que les Nox activent également la production enzymatique radicalaire par la XO et le phénomène uncoupled-NOS précédemment décrite.

Ainsi, de par la multitude d'isoformes de Nox (Nox1, 2, 3, 4, 5 et Duox 1 et 2) dans le corps humain, le cœur du processus de genèse des ROS, au cours d'un stress oxydatif, implique majoritairement cette enzyme (Figure 16). Parmi elles, les isoformes 1&4 des Nox sont majoritairement présentes dans les vaisseaux sanguins. Elles répondent à plusieurs facteurs comme le PDGF, EGF, TGF ; aux cytokines (TNF, IL-1) ; aux forces mécaniques (étirements, contraintes de cisaillement) ; à des états métaboliques (hyperglycémie, hyper-insulinémie, taux d'acides gras libres) ; et à des agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (sérotonine, bradykinine, endothéline, angiotensine II et thrombine) (67, 70).

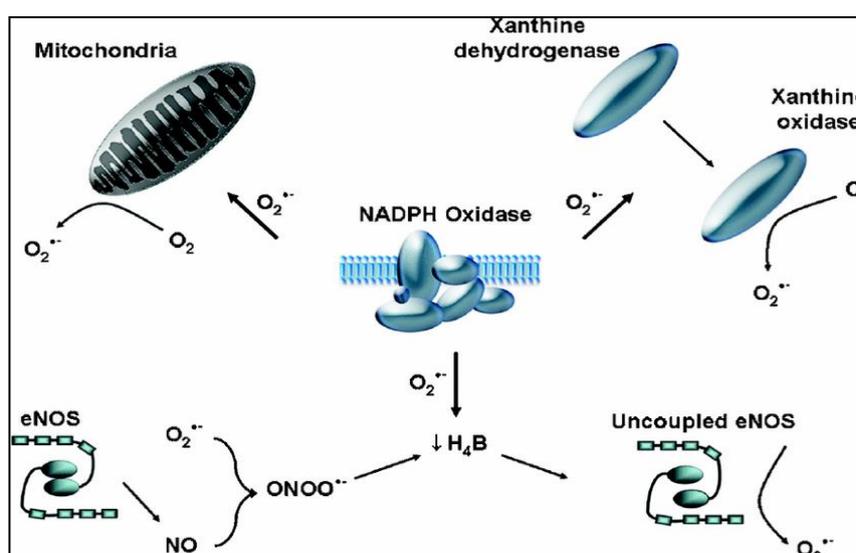


Figure 16. Implication des Nox dans le mécanisme pro-oxydant (74)

3.2.5 Traitements actuels contre l'HTA

L'arsenal thérapeutique contre l'HTA se compose de plusieurs familles médicamenteuses. Sachant que la pression artérielle est égale au produit du débit cardiaque et de la résistance périphérique ($PA = DC \times RP$), ces familles agissent sur un ou deux de ces paramètres (75–77).

◆ Les diurétiques agissent sur le rein. Leurs mécanismes d'action se résument à une augmentation de l'excrétion sodée (diminution de la RP). Parmi eux, on compte les thiazidiques et apparentés, les « épargneurs potassiques », les diurétiques de l'anse de Henlé et les antialdostérones.

◆ Les inhibiteurs adrénergiques bêtabloquants comme le propranolol ou le bisoprolol diminuent le DC. Cette seconde molécule présente une « cardiosélectivité » (elle se lie préférentiellement aux récepteurs Béta 1), et limite ainsi les effets secondaires, notamment bronchiques, dus à la stimulation des récepteurs Béta 2. Avec ces inhibiteurs, la composante débit cardiaque de la PA est diminuée.

◆ Les Inhibiteurs calciques sont, eux, séparés en 2 groupes : les dihydropyridines (DHP) et les non-dihydropyridines (non-DHP). Les DHP ont une plus grande sélectivité vasculaire. Ils inhibent la contraction des CML et du muscle cardiaque en agissant sur le canal calcique de type L voltage-dépendant. Citons parmi eux : amlodipine, nicardipine comme DHP et vérapamil, diltiazem comme non-DHP. Avec ces inhibiteurs, la composante débit cardiaque de la PA est diminuée.

◆ Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) empêchent la formation de l'angiotensine II vue précédemment (chapitre 3.1.2.1). Ce sont des prodrogues liposolubles de la molécule active, qui sont généralement bien absorbées par les tissus. Citons ramipril, captopril comme molécules utilisées.

◆ Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II) encore appelés « Sartans » bloquent de façon compétitive les récepteurs AT1 et complètent l'action des IEC. Nous avons Losartan, Candésartan ou bien Olmésartan.

◆ Les alpha-bloquants périphériques inhibent l'action de la noradrénaline par leur activité antagoniste des récepteurs alpha-1- noradrénergiques postsynaptiques périphériques. Ils ont une efficacité équivalente aux diurétiques, et parmi eux citons prazosine et térazosine.

◆ Les antihypertenseurs centraux agissent au niveau du système nerveux central sympathique. Ils sont de moins en moins utilisés car ils créent une hypotension orthostatique chez le sujet âgé. Clonidine, Méthyl dopa font partie de cette famille.

◆ Les vasodilatateurs artériolaires agissent directement sur les récepteurs alpha adrénergiques en tant qu'antagoniste. Parmi eux, citons prazosine et hydralazine. Mais aujourd'hui, on leur confère d'autres indications que l'HTA, comme pour la prazosine : l'insuffisance ventriculaire gauche congestive ou le traitement symptomatique du syndrome de Raynaud (78).

En dépit de l'efficacité clinique des molécules actuellement utilisées quant au traitement de l'HTA, celles-ci n'agissent que sur les mécanismes symptomatiques de l'HTA comme la rétention hydrosodée, l'activité orthosympathique, les prédispositions génétiques (AT1 et AT2). Soulignons que ces actions thérapeutiques n'opèrent pas sur les effets délétères du stress oxydatif au sein de l'endothélium vasculaire. Ce stress représente le cœur du problème, initiant et/ou perpétuant le phénomène d'HTA. C'est pourquoi il semble intéressant d'étudier l'utilisation des antioxydants qui sont par définition des espèces anti-radicalaires.

3.3 Rôles des antioxydants dans la santé humaine : cas des polyphénols

Dans la partie I. 2.3.2 nous avons défini les différentes molécules anti-radicalaires pouvant être retrouvées dans les fruits et dans ceux de *Spondias* sp. plus particulièrement. Il s'agit de préciser maintenant le lien entre ces molécules et leurs actions sur le système cardiovasculaire.

3.3.1 Généralités

Une multitude d'études ont montré les bienfaits des molécules antioxydantes pour l'homme. Leurs propriétés anti-cancéreuse et anti-apoptotique, leur efficacité contre les MCV, et les maladies neurodégénératives en font des molécules dignes d'intérêt (79,80). Parmi les molécules antioxydantes présentes dans l'alimentation humaine, les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes (Figure 17) sont considérées comme composés majoritaires (81).

Chaque jour un adulte ingère près d'un gramme de composants polyphénoliques, cela est respectivement 100 fois plus que pour la vitamine C, E et les caroténoïdes (82). Cependant la biodisponibilité de ceux-ci est assez faible : environ 5% de la quantité absorbée se retrouve dans le sang (pour la vitamine C, ce chiffre peut atteindre 80 % et plus) (83). Leurs principales sources sont les fruits, les jus de fruits et boissons dérivés tels que le thé, le café et le vin rouge. Les légumes, céréales, fèves et chocolat contribuent également à l'apport général de polyphénols dans l'organisme (84).

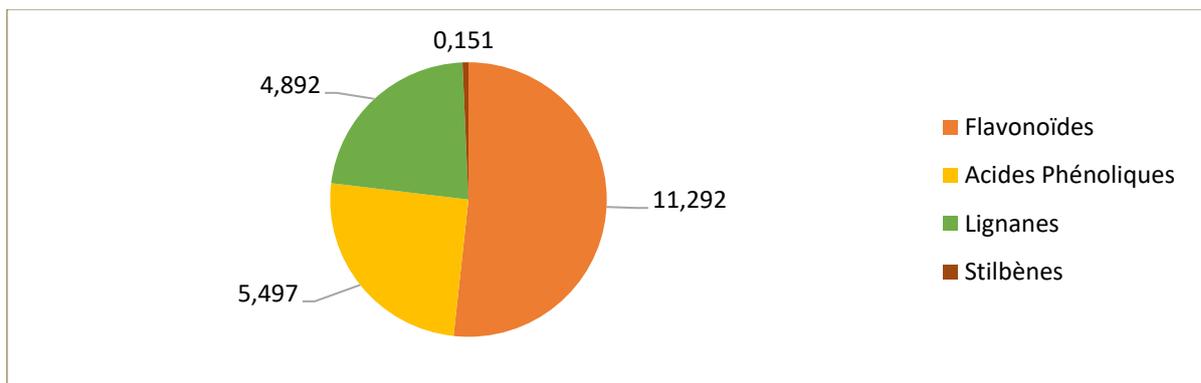


Figure 17. Répartition moyenne des principaux types de polyphénols dans l'alimentation humaine journalière (en mg pour 100g de fruit) (82)

Plus particulièrement, les polyphénols contenus dans le vin seraient à l'origine d'une faible incidence des MCV dans les pays méditerranéens. C'est ce qui a été initialement montré par une grande étude épidémiologique « WHO-MONICA » menée par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais) dans les années 1980. Cette cohorte a permis de définir le « French paradox », en mettant en évidence un faible taux de mortalité concernant les MCV en France comparé aux pays Nordiques. Ce gradient Nord-Sud a même été démontré à l'intérieur de la France (des taux de mortalité différents entre Lille et Toulouse, en faveur du gradient Nord-Sud). Par la suite on a défini le régime méditerranéen et crétois, riches en polyphénols végétaux, avec ou sans consommation de vin ; abaissant les maladies coronariennes et plus généralement les MCV (85–87). Ces modes d'alimentation ont une action bénéfique : ils agissent contre l'oxydation en protégeant les lipoprotéines de faibles densités (LDL-cholestérol) diminuent l'agrégation plaquettaire et inhibent la prolifération des CML vasculaires (88–90).

En dépit de leur grande distribution au sein du règne végétal, les effets cardiovasculaires des polyphénols ne furent guère étudiés avant les années 1990. On peut évoquer leur grande complexité et leur diversité de structures comme facteurs limitants au développement de leurs études. Les premières études de 1995, mettent en évidence leurs « possibles » effets cardiovasculaires ; et ce n'est qu'en novembre 2004 que la première conférence internationale sur les Polyphénols et la Santé eut lieu (Vichy, France). Plus de 30 pays étaient présents et se sont mis d'accord sur les effets *in vitro* et *in vivo* potentiellement retrouvés chez l'animal à des doses très supérieures au régime alimentaire humain. Un des objectifs était d'approfondir les études cliniques et épidémiologiques chez l'homme afin de confirmer les effets retrouvés chez l'animal (91).

3.3.2 Polyphénols et endothélium

Premièrement, il faut garder en tête que cette famille de molécules est très grande et comporte plusieurs sous-familles dont quelques unes sont représentées sur la Figure 18. Leurs mécanismes d'action peuvent être différents selon ces diverses sous-familles ou sous classes (81).

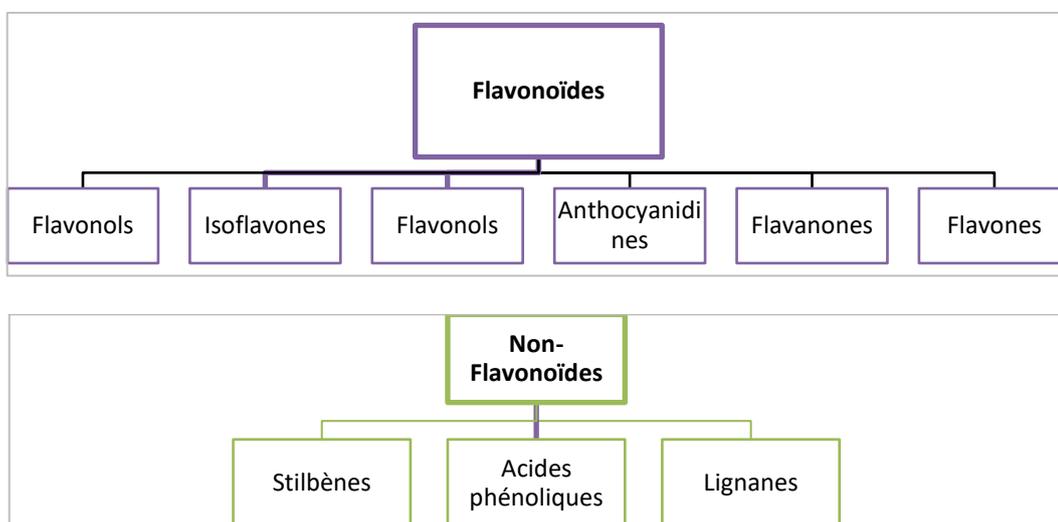


Figure 18. Classification sommaire des polyphénols

La littérature décrit un grand nombre de polyphénols provenant du vin et/ou certains fruits ayant une action chez le rat *in vivo* et *ex-vivo*. En revanche, aucune donnée n'est encore disponible sur le genre *Spondias*.

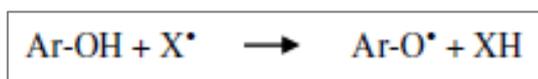
Des résultats provenant d'études sur le vin, ont montré que plus les polymères de procyanidine (tanins condensés) ont un degré de polymérisation élevé, plus leur activité antioxydante est importante (92). Dans ce sens, les dimères possèdent une activité antioxydante plus marquée comparée aux acides phénoliques simples (93). Certains polyphénols ont une activité supérieure à d'autres, c'est le cas dans la famille des flavonoïdes, où la quercétine possède une activité supérieure à celles de la rutine et de la catéchine (94,95). De plus, on note une action synergique entre eux : leur activité antioxydante est d'autant plus importante avec un mélange de plusieurs types de polyphénols qu'avec un type isolé (96).

Notons que les polyphénols du vin et/ou d'autres fruits et jus de fruits entraînent une vasodilatation endothélium-dépendant via le facteur NO et l'EDHF chez le rat (97–100).

3.3.2.1 Mécanisme impliquant les propriétés antioxydantes (chez le rat)

Les polyphénols ont un pouvoir antioxydant leur permettant de contrer l'action néfaste des ROS et in fine le stress oxydant. Leurs modes d'action peuvent se décliner selon quatre mécanismes principaux : le piégeage direct des ROS; l'inhibition des enzymes génératrices de ROS ; la chélation des ions de métaux, responsables de la production des ROS ; l'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes.

Le premier mécanisme d'action, piégeant directement les ROS, peut se résumer par l'équation suivante :



Ar-OH représente un polyphénol sous forme réduite ;

Ar-O[•] : un polyphénol sous forme oxydée ;

X[•] : une ROS ; *XH* une ROS neutralisée sous forme réduite

Les polyphénols interagissent également avec d'autres types de molécules comme les facteurs d'adhésion vasculaires : VCAM-1 et ICAM-1 ; ils diminuent leur activité biologique. Ils inhibent par ailleurs l'activation du facteur nucléaire NF-κB, atténuant l'expression des matrix métalloprotéinase-9 (MMP-9), cyclooxygénases (COX)-2, et le macrophage chemo-attracteur protéine-1 (MCP-1) (Figure 19). Ceci a été observé pour le resvératrol et la quercétine chez les rats hypertensifs et sur des cellules vasculaires humaines (99, 100).

On retrouve la quercétine et la théaflavine comme facteur abaissant significativement le stress oxydatif par activation des enzymes détoxifiantes (SOD, CAT, GPx et HO-1) et une régulation positive de l'eNOS. Elles inhibent la MMP-2 et réduisent également les quantités des ions superoxydes, de la prostaglandine F₂-isoprostane (F₂-iso), et des leucotriènes B₄ extracellulaires (103).

D'autres études montrent que les polyphénols agissent également contre les enzymes NOX et réduisent les facteurs inflammatoires diminuant ainsi le risque d'artériosclérose (70,104–107).

3.3.2.2 Mécanisme impliquant les propriétés pro-oxydantes (chez le rat)

Tandis que les propriétés antioxydantes des polyphénols corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité pro-oxydante de ces composés in vitro (108). La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions ferriques libres, c'est-à-dire non liés aux protéines. Ainsi par leur effet pro-oxydant, les polyphénols peuvent endommager des biomolécules comme l'ADN, les lipides et autres.

Paradoxalement, une légère augmentation locale des ROS, témoignant d'un phénomène pro-oxydant, peut stimuler la libération de NO (98). Les deux principales voies impliquant ce phénomène pro-oxydant incluent le PI₃k/Akt/eNos et PI₃k/Akt/EDHf (Figure 19). Ce sont deux mécanismes reliés par un phénomène de réduction-oxydation activant la voie PI₃k/Akt. Ce couple de kinases stimule ensuite l'EDHf ainsi que la phosphorylation d'eNOS au niveau de la sérine 1177. Cette stimulation implique également la kinase p38 MAPK qui régule positivement ces deux voies (102, 103) (Figure 19).

En parallèle, les polyphénols provoquent une augmentation intracellulaire du calcium (Ca²⁺) dans l'endothélium. En ce sens, deux études reportent l'effet de la delphinidine (une anthocyane) et l'apigénine (une flavone) sur l'augmentation du Ca²⁺ libre dans des cultures de cellules endothéliales. Cela va activer l'eNOS et les canaux potassiques IKca et SKca et provoquer un relâchement des CML (104, 105) (Figure 19).

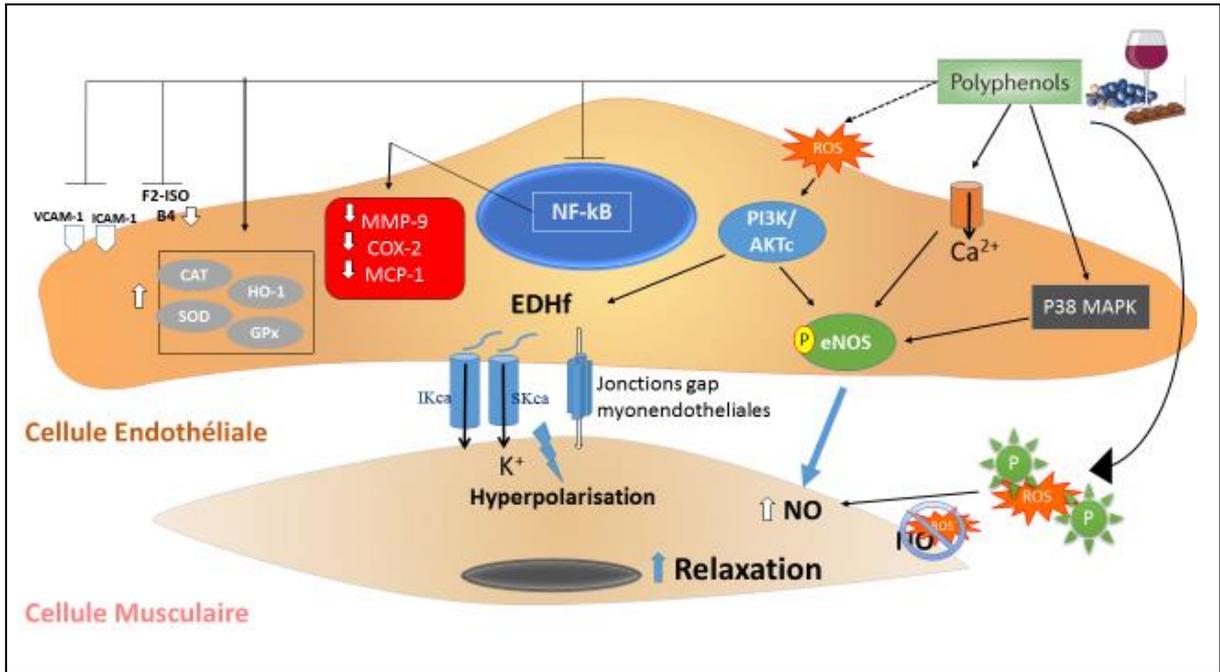


Figure 19. Représentation synthétique de l'action vasodilatatrice médiée par les Polyphénols : Oxyde Nitrique (NO); le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHf); molécule d'adhésion aux cellules vasculaires-1 (VCAM-1); molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1); facteur nucléaire- κ B (NF- κ B); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); cyclooxygénase (COX-2); macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1); oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS); superoxyde dismutase (SOD); catalase (CAT); hème oxygénase 1 (HO-1); glutathion peroxydase (GPx); F2-isoprostane (F2-iso); leucotriène B4 (B4); phosphoinositide-3 kinase (PI₃K)/Akt; p38 protéine kinase activée par les mitogènes (p38 MAPK).

3.3.3 Etudes chez l'Homme

Tous les mécanismes précédemment décrits impliquent des polyphénols provenant de façon majoritaire du vin et confèrent à cette boisson des effets vasoprotecteur et antihypertenseur.

Il s'avère que les polyphénols d'autres sources végétales comme *Crataegus. sp* diminuent la pression artérielle et ceci proportionnellement à leur quantité ingérée (106, 107). Pareillement, le thé abaisse respectivement de 0,46 et 0,98 mm Hg la PA (p-value < 0,05) chez l'homme et la femme (115). Une récente étude démontre les effets antihypertenseurs de l'açaï (*Euterpe oleracea Mart*) ingérée quotidiennement à une dose élevée (109, 110).

D'autres études cliniques ont essayé de confirmer ces actions, nonobstant certaines d'entre elles n'ont pas réussi à démontrer une amélioration des fonctions cardiovasculaires et en particulier une baisse de la PA (118–123). Les raisons de ces résultats discordants sont encore en cours de discussion mais elles sont probablement dues à l'hétérogénéité des études cliniques de par leur construction et leur réalisation. On peut évoquer aussi l'immense diversité des polyphénols présents dans les végétaux (ou boissons testés) sur le plan aussi bien quantitatif que qualitatif.

Evoquons aussi le fait que certains polyphénols agissent préférentiellement en activant une voie plus qu'une autre, pour permettre une vasodilatation. Comme le montre une étude sur un vin brésilien impliquant des cellules endothéliales *in vitro* (98).

Ainsi, dans le but d'évaluer au mieux les effets potentiels des polyphénols sur l'endothélium de plus amples études sur une plus longue durée sont nécessaires (124). D'autant plus que les polyphénols ne sont pas les seuls responsables d'une action vasoactive, c'est ce que l'on remarque lors d'un régime alimentaire dit de type « méditerranéen ». En effet les caroténoïdes, la vitamine C et autres antioxydants apportés par ce type de régime interagissent avec le système cardio-vasculaire lors d'un stress oxydant, diminuant les ROS. Cependant les mécanismes de ces derniers ne sont pas très bien connus (125). On peut mentionner l'action de certains caroténoïdes identifiés, comme le lycopène, qui ont pour effet de diminuer l'activité de l'HMG-coA réductase productrice de LDL-cholestérol dans des cellules macrophages, pouvant ainsi prévenir le phénomène d'athérosclérose (126).

C'est en tenant compte des études déjà réalisées et des résultats obtenus sur l'évaluation de certains polyphénols que ce soit sur le modèle animal ou directement chez l'Homme, que les expériences menées sur l'exocarpe du fruit de *Spondias* sp vont être définies dans la partie suivante.

Partie II : Matériels et Méthodes

1. Obtention de l'extrait méthanolique à partir d'exocarpe d'umbu-cajá

1.1 Matière première

Les fruits utilisés ont été achetées au marché central de João Pessoa – Paraíba (Brésil). Ils proviennent de la région de Baía da Traição à Mamanguape – Paraíba à 50 km au nord de João Pessoa mais il n'est pas exclu que certains marchands possèdent des fruits venant de régions plus éloignées. Ainsi l'origine géographique des fruits peut varier selon les fournisseurs, allant de l'état de Bahia (12°00'S 42°00'W) jusqu'au Ceara (05°00'S 40°00'W). Il a été nécessaire d'être attentif à la provenance et à l'uniformité des fruits achetés. Des fruits à maturation moyenne ont été choisis pour cette étude.

1.2 Etapes d'obtention de l'extrait d'exocarpe

Pour cette étape d'extraction, nous utiliserons un lyophilisateur : LABCONCO Freezone (Kansas City, MO, USA), un mixeur ménager, des ustensiles de cuisine (éplucheur à légumes, couteau d'office), un mortier et son pilon, un tamiseur industriel, un bain à ultrasons, un évaporateur rotatif (Rotavap[®]) et enfin un système de filtration sous vide avec un entonnoir Büchner[®]. Toutes les étapes ont été réalisées à l'abri de la lumière du soleil pour ne pas dégrader les composants photosensibles.

Premièrement, le fruit est lavé à l'eau puis pelé. La peau obtenue est ensuite lavée une deuxième fois pour se débarrasser des résidus de pulpe. Les pelures sont laissées immergées pendant 15 minutes dans une solution à 9,6 % d'hypochlorite de sodium (10 mL) et d'eau osmosée (1 L), afin de se débarrasser des microorganismes résiduels. Cette opération de nettoyage nécessite 1 L de solution précédemment décrite pour l'équivalent de 1 kg d'exocarpe de fruit. Enfin, les échantillons seront lavés une dernière fois à l'eau osmosée, séchés à l'air 30 minutes, puis congelés à -80°C. Ces pelures subissent un cycle de lyophilisation pendant 24 h afin de retirer l'eau résiduelle. A la fin de ce cycle on obtient des peaux déshydratées et totalement rigides. Celles-ci sont ensuite mixées et broyées et réduites en poudre grossière. Ainsi, la poudre va être homogénéisée grâce à un tamiseur industriel en utilisant un tamis avec un criblage de 0,35 mm pendant 5 minutes pour chaque échantillon (Figure 20). On élimine alors les résidus mucilagineux restant sur le tamis. Il est possible de re-triturer la poudre qui n'est pas passée à travers le tamis, afin de s'assurer de ne pas perdre quelques milligrammes d'échantillon.



Figure 20. Mise en forme de l'extrait : trituration (à gauche), tamisage (à droite)

Dans un second temps, cette poudre de couleur jaune/orangé va être dissoute dans une solution hydro-méthanolique (50/50 en volume) à une concentration de 100 g.L^{-1} . L'eau utilisée est de l'eau ultra-pure obtenue par osmose inverse (Milli-Q, Millipore, São Paulo, SP, Brésil). Grâce à un bain à ultrasons, on obtient une solution limpide légèrement orangée qui, ensuite est filtrée et évaporée sous vide à 40°C pour ne pas dégrader les composants chimiques, phénoliques notamment. Une fois l'alcool évaporé, il reste un extrait aqueux deux fois plus concentré. Enfin, cet extrait est lyophilisé durant un autre cycle de 24 h et il en résulte une poudre composée de gros cristaux jaunes vifs à ocres qui sont conservés au sec et à -20°C jusqu'à utilisation.

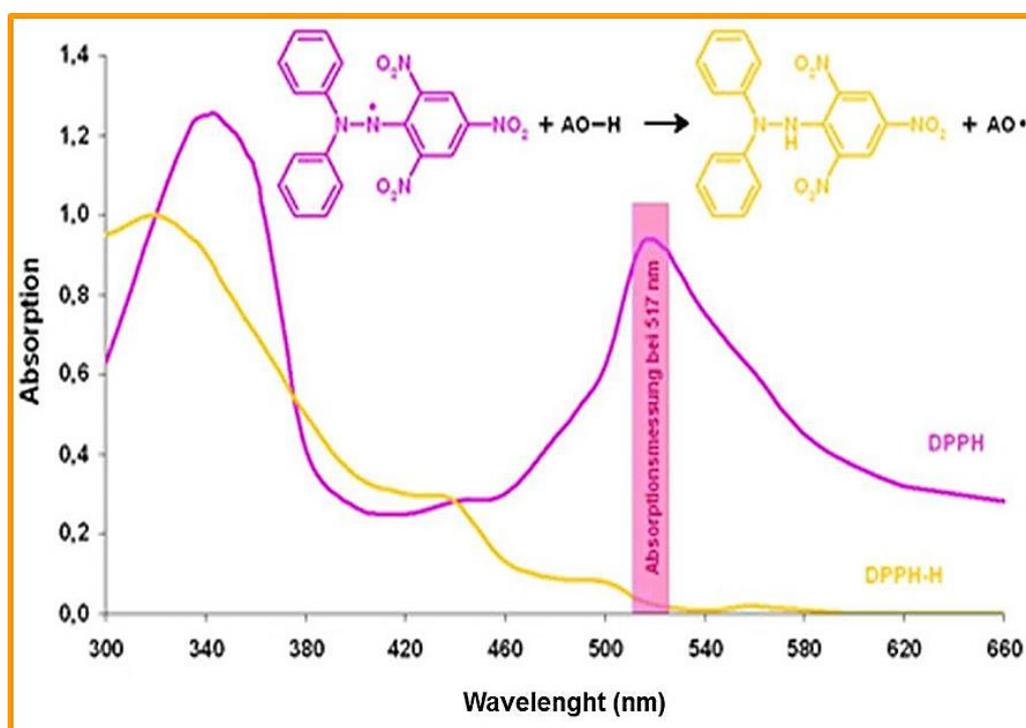
2. Analyse phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique

Nous nous attacherons ici à décrire les méthodes mises en place afin d'identifier quelques familles d'espèces chimiques leurs propriétés physicochimiques associées.

2.1 Tests généraux

2.1.1 Pouvoir antioxydant: DPPH

L'activité du radical libre DPPH est exploitée dans une des méthodes les plus utilisées dans le laboratoire pour évaluer la capacité antioxydant d'un composant chimique. Ce test au DPPH est réalisé en suivant la méthodologie décrite par Brand-Williams et al. (1995). Le radical DPPH possède des cycles aromatiques et absorbe de façon maximale des longueurs d'onde comprises entre 515 et 520 nm. Nous mesurons l'absorbance grâce à un spectrophotomètre UV-vis (Shimadzu 2550). La diminution de l'absorbance traduit la dégradation des radicaux DPPH par une molécule antioxydante telle que les polyphénols, identifiables à la molécule AO-H dans la Figure 21. Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent rapportés à un antioxydant de référence comme le Trolox.



Les quantités suivantes sont préparées afin de réaliser l'essai au DPPH : 12,5 mg de Trolox pour 50 mL de méthanol, 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol et 40 µg d'extrait d'umbu-cajá pour 200 µL de DPPH. Ensuite, des quantités de méthanol appropriées sont ajoutées pour obtenir une gamme de concentration allant de 200 µg/L à 30 µg/L d'extrait d'umbu-cajá.

L'essai est réalisé en triplica, la lecture de l'absorbance se fait 30 minutes après l'ajout de l'extrait à une longueur d'onde de 517 nm. Au final nous obtenons la quantité nécessaire pour neutraliser les radicaux libres (DPPH) présents dans une certaine quantité (en gramme) d'extrait lyophilisé. Le résultat est exprimé en mmol TEAC.g⁻¹.

2.1.2 Contenu phénolique total (TPC)

La mesure du TPC, en accord avec la méthode de Slinkard déterminée grâce au réactif de Folin-Ciocalteu. Dans un aliquot, 60 µL de ce réactif et 2,61 µL d'eau distillée sont mélangés à l'extrait d'umbu-cajá préalablement pesé afin d'obtenir une concentration finale de 5 µg/mL. Une fois le mélange homogénéisé, 180 µL de solution saturée de carbonate de sodium à 15% (Na₂CO₃) est ajoutée. Le contenu est agité de nouveau et est maintenu dans l'obscurité durant 30 min à une température de 45°C. Le contenu est agité de nouveau et est maintenu dans l'obscurité durant 30 min à une température de 45°C.

L'absorbance est mesurée avec une longueur d'onde incidente de 760 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu UV-2550). La concentration en TPC est déterminée par l'interpolation de l'absorbance obtenue, comparée à la courbe étalon de l'absorbance de l'acide gallique dont sa concentration est comprise entre 1 et 20 mg. L⁻¹. Les résultats sont exprimés en mg EAG. g⁻¹ d'extrait lyophilisé.

2.2 Analyses UHPLC DAD-ESI/QTOF

Afin de réaliser une identification précise des composés chimiques contenus dans l'extrait hydro-méthanolique de l'exocarpe d'umbu-cajá, une chromatographie liquide à ultra-haute pression est utilisée. Plus précisément, il s'agit d'une UHPLC (Agilent 1290 Infinity) couplée à un spectrophotomètre UV à barrette de diode (DAD) et un spectromètre de masse de type Q-TOF (Quadrupole-Time of Flight ; Agilent 6530) équipé d'une source de type electrospray (ESI). L'extrait sec est remis en solution dans un mélange aqueux contenant 80% de méthanol. La concentration obtenue est de 10 g/L d'extrait de peau de fruit.

C'est ainsi qu'1 μL de l'extrait est injecté dans une précolonne (Poroshell 20 EC-C18 2,7 μm , 5 x 3,0 mm (Agilent)), puis dans une colonne (Poroshell 120 EC-C18 2,7 μm , 150 x 3,0 mm (Agilent)) à un débit de 1 ml/min à 60°C. Il est entraîné par un gradient d'élution composé d'un solvant A (H₂O, 0,4% Acide formique) et d'un solvant B (Acétonitrile) en suivant l'ordre suivant : 0 min : 1% B ; 6 min : 15% B ; 12 min: 35% B ; 13 min: 100% B ; 14 min : 100% B. Un détecteur à barrettes de diodes permet les enregistrements aux longueurs d'onde : 254, 280, 300, 320, 366, 450 nm des molécules chromatographiées. Les paramètres de réglages du spectromètre de masse sont les suivants : fragmenteur 110 V, VCap: 3500 V, Nozzle Voltage: 2000 V, Drying Gas: 12 l/min ; 310°C, nébuliseur 40 psig et une énergie de collision de 20V. Le mode d'acquisition est en Auto-MS/MS en mode d'ionisation positif avec un balayage m/z 50 à 2000.

3. Evaluation in vivo des paramètres cardiovasculaires

Nous utiliserons des rats mâles type Wistar pesant environ 200 grammes, élevés dans un environnement à température stable (21 ± 1 °C) et un cycle d'exposition à la lumière de 6h à 18h. De plus, les rongeurs ont un accès libre à la nourriture et à l'eau (Labina, PURINA, São Paulo, Brazil). Toutes les expérimentations et procédures ont été approuvées par le comité de protection et d'éthique animale de l'Université Fédérale de Paraíba.

Afin de mesurer les paramètres hémodynamiques du rongeur, nous allons suivre le protocole préétabli par Nunes FC, Ribeiro TP et al. (2010) (127). Il s'agira d'enregistrer les variations de pression artérielle et de rythme cardiaque mesurés chez le rat conscient en réponse aux injections de produits d'expérimentation (Figure 22).

Dans un premier temps, deux cathéters en polyéthylène sont posés sur l'animal anesthésié par l'administration de kétamine et de xylazine (respectivement 75 et 10 mg/kg, i.p.). Ils sont insérés dans la partie abdominale inférieure dont un dans la veine cave inférieure gauche et l'autre dans l'artère fémorale gauche pour remonter jusqu'à l'aorte abdominale inférieure. Une fois posés, ils sont pré-remplis de solution saline à 0,9 % NaCl et d'héparine afin d'éviter une coagulation à l'intérieur du cathéter lors de la phase de repos de 24h (voir plus bas). Les cathéters sont ensuite guidés en sous cutané à l'aide d'une canule permettant de transpercer la peau du rongeur. Ils sont premièrement insérés dans la partie glutéale en direction dorsale pour remonter le long du diaphragme et passer par-dessus la cage thoracique (toujours en région dorsale) pour ressortir au-dessus des cervicales de l'animal. Ceci est réalisé afin d'éviter que le

rongeur sectionne le conduit en le mordant. Une fois réveillé, l'animal est soigneusement remis dans sa cage avec une ration d'eau et nourriture.

Dans un second temps, 24h après la chirurgie, les cathéters sont connectés à un transducteur de pression et à un système d'acquisition/enregistrement (PowerLab, AD Instruments, Australia) reliés à un ordinateur équipé du logiciel LabChart 5.0 (AD Instruments). Les doses des produits à expérimenter sont administrées aléatoirement en i.v donc, toutes les 5 minutes ou jusqu'à ce que le rat soit dans une position adaptée c'est-à-dire sur ses quatre pattes ou allongé au sol et restant immobile pendant au moins 5 secondes. Le volume injecté est de 10 μ L, ce qui représente un faible volume (0,01%) par rapport à la volémie totale du rat (environ 100 mL). Cela est important à prendre en considération car il ne faut pas augmenter de manière significative le volume total circulant sanguin au risque de voir la PA augmentée à cause du trop grand volume injecté.

Une attente est observée permettant le retour des paramètres enregistrées à leur valeurs initiales entre chaque dose injectée, ceci permet à l'animal de retrouver son état basal.

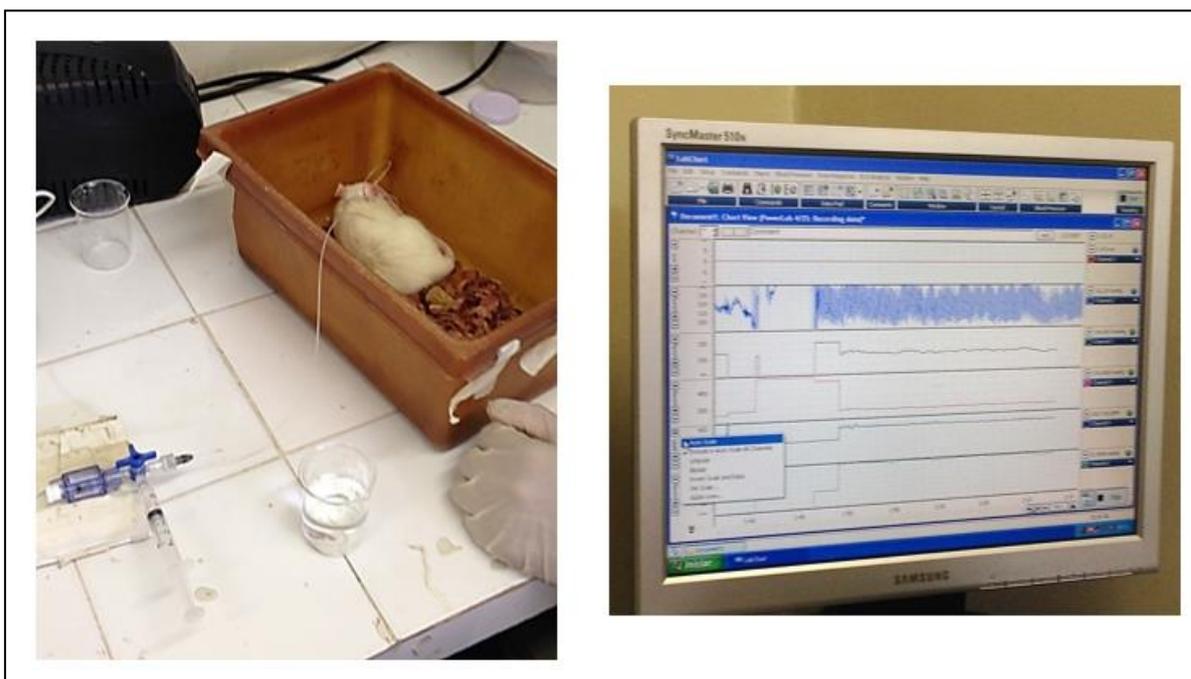


Figure 22. Systèmes d'injection et d'enregistrement

Les données ont été collectées sur 7 rats ($n = 7$). La pression artérielle moyenne (PAM), la PA systolique (PAS), la PA diastolique (PAD) et la fréquence cardiaque (FC) sont enregistrées avant et après l'injection i.v de la dose de l'extrait d'umbu-cajá. La PAM est calculée en faisant

l'addition de 1/3 de la PAS et de la 2/3 PAD. Chacun des paramètres est comparé en fonction des différentes doses administrées. La réponse pharmacologique est mesurée après l'injection et les données recueillies peuvent être traitées et représentées comme suit : les valeurs sont moyennées parmi les 7 rats ; les PA sont exprimées en millimètre de Mercure (mm Hg) et la FC en battements/min (batt/min). Les différences des indicateurs cardiaques mesurés (Δ) sont calculées en retranchant la valeur obtenue après l'injection à la valeur initiale, et ceci pour les 4 doses administrées. Une différence négative signifiera une baisse de ce paramètre après injection et inversement.

Par soucis de conformité, nous avons convertis les doses i.v. injectées exprimées initialement en mg/mL en mg/kg de poids d'animal. Le volume injecté étant de 10 μ L pour un poids d'animal de 100 g et les concentrations des extraits sont respectivement de 5, 10, 50 et 100 mg/mL. Ainsi les doses prennent comme valeur : 0,5, 1, 5 et 10 mg/kg.

4. Evaluation des effets pharmacologiques sur le système artériel

Les rats utilisés pour ces expériences ont les mêmes caractéristiques que ceux précédemment décrits dans le premier paragraphe de la partie II. 3. *Evaluation in vivo des paramètres cardiovasculaires*, à l'exception des rats utilisés pour les expériences de microscopie à fluorescence dans la partie II 4.2.1 *Préparation des tissus* au dernier paragraphe qui seront, pour une partie d'entre eux, rendus hypertendus grâce à un prétraitement au L-NAME.

4.1 Réactivité d'anneaux artériels mésentériques supérieurs ex vivo

La réactivité des anneaux d'artères mésentériques (i.e. leur contractilité) sera analysée dans une cuve à organe isolé après administration de différents produits à tester. L'artère mésentérique est utilisée dans cette méthodologie car ce sont les tissus contractiles les plus sensibles, en effet elles sont très réceptives aux changements de conditions expérimentales et l'amplitude de leur réponse est élevée.

Sous anesthésie et par dislocation, nous sacrifions les animaux et les ouvrons en région péritonéale afin de réaliser la dissection de leur artère mésentérique supérieure ; celle-ci est nettoyée délicatement pour l'isoler des tissus et de la graisse résiduelle. Nous coupons délicatement des morceaux homogènes de vaisseaux de 2 à 3 cm de longueur afin d'obtenir des

anneaux d'artères mésentériques. Certains seront nettoyés de leur endothélium par un délicat frottement mécanique de façon à enlever la quasi-totalité de celui-ci et d'autres seront utilisés avec leur endothélium intact. Puis, les anneaux seront suspendus à une amorce métallique située en position supérieure et une autre amorce la maintiendra en position inférieure, ce qui permet d'exercer et de mesurer une force de contraction (Figure 23).

Chaque rat sacrifié, permet la dissection d'environ 4 anneaux d'artère mésentérique. Nous avons pu constituer 2 groupes (avec et sans endothélium) avec au total 28 anneaux répartis équitablement dans les deux groupes.

Une fois fixés, les anneaux sont immergés dans les bains contenant une solution physiologique de thyrode thermostatés à 37°C et alimentés par un mélange gazeux (95 % O₂ et 5 % CO₂) à un pH de 7,4. Il s'en suit une phase de stabilisation durant laquelle les anneaux sont soumis à une tension d'environ 0,75 g, en changeant de solution physiologique toutes les 15 min pour éviter l'accumulation des métabolites. L'enregistrement de la force tensionnelle commence après cette phase de stabilisation à l'aide d'un transducteur (Miobath-4, WPI, Sarasota, FL, USA) couplé à un amplificateur-enregistreur et à un ordinateur (Figure 23).

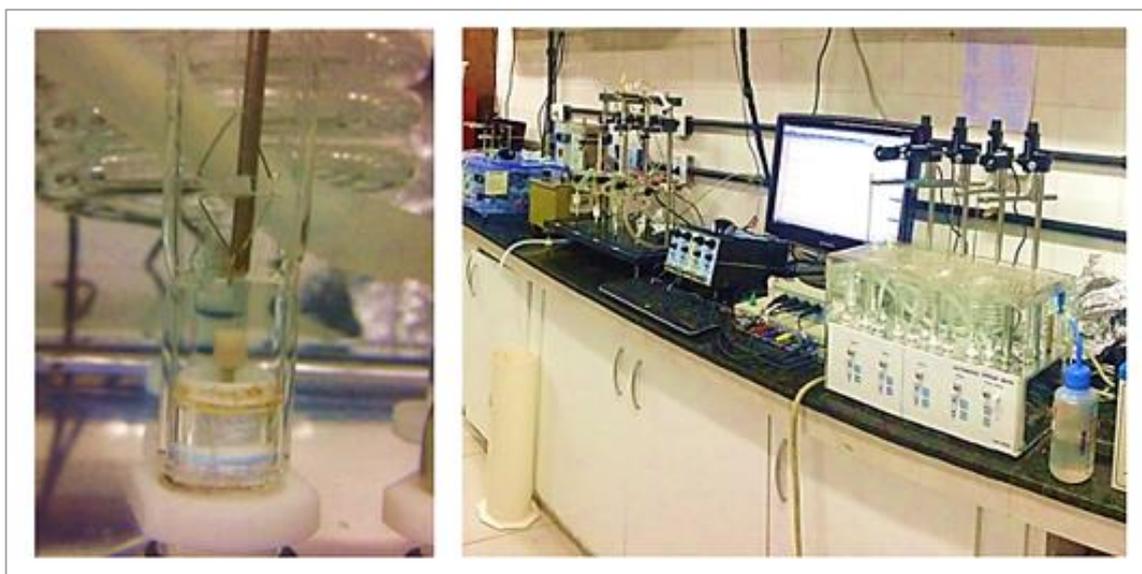


Figure 23. Système d'acquisition et cuves à organe isolé (anneaux artériels mésentériques)

La viabilité des anneaux artériels est testée par administration d'Adrénaline (Ad) (ou Phényléphrine en anglais (Phe)) dans la cuve à organe isolé en concentrations croissantes de 10^{-9} à 10^{-3} M, ceci constituant la première phase de contraction. Puis de l'Acétylcholine (Ach) est introduite aux mêmes concentrations afin de provoquer une vasodilatation. Les anneaux

d'artères mésentériques qui ont une réponse vasodilatatrice atteignant 85 % de la valeur tensionnelle initiale (avant l'ajout d'Ad) seront considérés comme possédant un endothélium fonctionnel et utilisable pour l'expérience. Est considérée comme réponse maximale de 100%, une relaxation mesurée égale à la valeur de la tension (~ 0,75 g) durant la première phase de stabilisation (avant l'addition croissante d'Ad). Nous considérons comme sans endothélium, les anneaux qui ont une réponse ne dépassant pas 10 % (128). Enfin, les anneaux artériels ayant une réponse biologique, que ce soit avec ou sans endothélium, sont considérés comme vivants (répondeurs) et vont être à nouveau soumis à une phase de contraction provoquée par l'ajout d'Ad à la concentration maximale (10^{-3} M) utilisée lors de la première phase de contraction. Ceci est effectué afin de vérifier que la capacité contractile observée à la première phase soit toujours fonctionnelle lors de la deuxième phase et que le vaisseau ne soit pas considéré comme mort (non répondeur).

Les artères sont stabilisées suite à cette deuxième phase de contraction durant 40 minutes au minimum. Notons que la valeur tensionnelle obtenue suite à l'administration de 10^{-3} M d'Ad, doit être identique entre les deux phases de contraction.

Ensuite, des quantités croissantes cumulées d'extrait de *Spondias* sp. aqueux sont ajoutées toutes les 2 minutes pour les solutions d'extrait ayant des concentrations comprises entre 0,1 mg/mL et 10 mg/mL, puis toutes les 5 minutes pour les concentrations supérieures à 10 mg/mL. Chaque dilution d'extrait est préalablement réalisée dans une solution de Thyrode. Les quantités d'extrait ajoutées dans la cuve à organe isolé représentent en réalité des concentrations en extrait de 0,1 µg/ml à 1000 µg/ml lorsque l'on prend en compte l'effet cumulatif.

4.2 Activité antioxydante évaluée au microscope à fluorescence sur des coupes de micro-vaisseaux

4.2.1 Préparation des tissus

Les animaux précédemment euthanasiés pour l'expérience de réactivité des artères mésentériques sont utilisés afin de prélever leurs micro-vaisseaux qui représentent la ramification de l'artère mésentérique supérieure en artérioles. Dans un premier temps, nous allons les nettoyer et les isoler des autres tissus (graisses, vaisseaux...) puis les congeler dans un gel fixateur (OCT : optimum cutting temperature) en les plongeant d'abord dans du Nitrogène liquide -172°C pendant quelques minutes puis ensuite ils seront conservés à -80°C .

Dans un second temps, ces tissus congelés vont être découpés en fines lamelles de 14 μm grâce à un microtome (LEICA CM 1860) sous une température maintenue autour de -25°C . Puis les coupes seront déposées sur des lames de microscope en verre, chargées positivement, ce qui attirera les charges négatives des protéines tissulaires ; puis celles-ci sont gardées jusqu'à utilisation au congélateur à -80°C .

Nous disposons également de rats hypertendus, obtenus suite au traitement de ces derniers avec une solution de N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) diluée dans l'eau de boisson journalière (40 mg/kg/jour) pendant deux semaines (122, 123). La molécule L-NAME (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri - USA) est un inhibiteur de la eNOS, diminuant la formation du facteur vasodilatateur NO et a pour but de recréer une situation pathologique de stress oxydatif, observée lors de l'hypertension vasculaire. Cela a pour conséquence d'augmenter la quantité de ROS dans les tissus et particulièrement dans les vaisseaux sanguins. Ce phénomène oxydatif débute au niveau micro-vasculaire, c'est pourquoi les petits vaisseaux (micro-vasseaux) sont utilisés dans ce protocole. Ils sont plus sensibles aux variations des conditions expérimentales (ajout de L-NAME) et vont développer un stress oxydant plus rapidement que les gros vaisseaux (artères mésentériques et aorte). En effet l'augmentation de ROS dans les couches cellulaires composant l'aorte, apparaîtrait tardivement, une fois que tous les autres vaisseaux soient saturés en ROS (130).

4.2.2 Marquage et visualisation des ROS

Dans un premier temps nous allons valider le modèle visant à recréer une situation pathologique d'hypertension entre les vaisseaux normaux et ceux traités au L-NAME. Les lames sont décongelées et mises au contact d'une solution tampon (PBS : NaCl :137 mM, HPO₄/PO₄H₂O 11,76 mM, KCl 2,7 mM) ainsi que d'une sonde moléculaire fluorescente de Dihydroéthidium (DHE) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) marquant les ROS au sein du noyau des cellules grâce à sa propriété d'agent intercalant. Les lames sont ensuite mises à l'étuve pendant 30 min à $37,5^{\circ}\text{C}$ en respectant une échelle de concentration entre 3 et 7,5 μM de DHE afin de ne pas sous ou sur-marquer les ROS. Puis elles sont montées et ajustées afin d'observer au microscope à fluorescence (Nikon ECLIPSE Ti-S; Laser: Nikon INTENSILIGHT C-HGFI) les coupes des différents vaisseaux, en les protégeant de la lumière extérieure (le DHE est photosensible). Un faisceau incident d'une longueur d'onde de 396 nm vient révéler le DHE fixé aux ROS dans les cellules, en émettant une fluorescence maximale à 590 nm. A l'aide d'une caméra (Nikon DS-Ri1, Nikon DIGITAL Sight DS-U3) et d'un logiciel

de traitement d'image (NIS-Elements AR v. 4.20.00), la quantification de fluorescence traduisant la quantité de ROS présente sur les coupes de vaisseaux est réalisée chez les animaux normaux-tendus et hypertensifs L-NAME. Nous mesurons l'intensité de la fluorescence (rouge) de chacun des clichés réalisés pour les différentes coupes de vaisseaux en utilisant les propriétés du signal numérique des pixels matérialisés par les matrices Rouge-Vert-Bleu (RVB). La différence de fluorescence entre les deux groupes (normaux-tendus et hypertensifs L-NAME) est obtenue en moyennant les valeurs des matrices RVB obtenues et en les comparant statistiquement.

Dans un second temps, seuls les vaisseaux des rats hypertendus L-NAME vont être testés avec différentes concentrations de l'extrait d'umbu-cajá, en respectant les mêmes méthodes précédemment utilisées pour valider le modèle. C'est-à-dire que la préparation et l'observation microscopique se font de manière identique, à la différence des lames qui sont immergées durant 30 min dans l'extrait d'umbu-cajá (concentrations allant de 10 à 100 mg/mL) dilué dans du PBS à 37,5°C ; avant de les mettre en contact avec la sonde de DHE. Comme précédemment, le logiciel permet de mesurer l'intensité de la fluorescence sur les coupes des vaisseaux et de calculer la moyenne de celle-ci.

5. Tests statistiques

Toutes les données sont exprimées selon leur moyenne plus ou moins leur erreur standard à la moyenne, encore appelé en anglais : « standard error of the mean » ($\bar{x} \pm S.E.M$). La normalité de la distribution des variables quantitatives est vérifiée de façon à pouvoir utiliser les tests statistiques paramétriques. Quand les données le permettront, le test de Student ou le test ANOVA à un ou deux facteurs (lorsqu'on dépasse 2 groupes) seront utilisés. Si les conditions du nombre d'animaux (n) ou d'échantillons ne le permettent pas, les tests non paramétriques correspondant seront effectués comme les tests de Wilcoxon Mann-Whitney (U-Test), ou Kruskal-Wallis pour plus de 2 groupes. Lorsque l'on dépasse deux groupes, une comparaison deux à deux pourra être réalisée avec le test de comparaison multiple de Dunn.

Les tests et représentations graphiques sont réalisés par les logiciels R et GraphPad PRISM7. Les résultats obtenus des tests statistiques seront considérés comme significatifs pour des valeurs de p calculées inférieures à 0,05 ou 0,01 dans certains cas.

Pour le test de comparaison multiple de Dunn, sont considérées comme significatives les valeurs de p- obtenues lors de l'expérience in vivo pour les différents paramètres cardiaques :

- $p < 0,05$ (\square) avec la concentration de 1 mg/kg comme référence
- $p < 0,05$ (Δ) avec la concentration de 5 mg/kg comme référence

Pour le test de Wilcoxon Mann-Whitney, sont considérées comme significatives les valeurs de p- obtenues lors de l'expérience ex vivo de réactivité des vaisseaux mésentériques pour :

- $p < 0,05$ (\times) et $p < 0,01$ ($\times\times$) entre les conditions avec et sans endothélium pour une concentration donnée

Pour le test de Student, sont considérées comme significatives les valeurs de p-obtenues lors de l'expérience ex vivo de fluorescence :

- $p < 0,05$ (\star) avec la condition A comme référence
- $p < 0,05$ (\bullet) avec la condition B comme référence
- $p < 0,01$ ($\bullet\bullet$) avec la condition B comme référence

Partie III : Résultats

1. Analyse phytochimique

Nous avons tout d'abord cherché à isoler les molécules présentes dans l'exocarpe du fruit selon le procédé décrit dans la partie matériels & méthodes.

Pour ce faire, 14,46 g de poudre primaire d'exocarpe d'umbu-cajá ont été obtenus à partir de la peau du fruit préalablement lyophilisée et broyée. Après extraction et à nouveau lyophilisation de cette dernière, nous recueillons 1,60 g de poudre cristalline. Ce lyophilisat nous servira à identifier les constituants chimiques présents au sein de l'extrait et à réaliser les tests *in vivo* et *ex vivo*.

1.1 Pouvoir antioxydant

1.1.1 DPPH

Le protocole utilisant la méthode au DPPH a été itéré à trois reprises et pour chacune de ces itérations nous avons travaillé en triplicat ; ainsi nous obtenons 9 valeurs. Leurs moyennes ne sont pas significativement différentes selon le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis (p-value = 0,73).

La valeur moyenne obtenue est égale à $27,6 \pm 0,4 \mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$. Cela signifie que 1 gramme d'extrait de peau possède un pouvoir antioxydant correspondant à environ 28 μmol de Trolox en terme d'activité.

Ainsi nous pouvons comparer ce premier résultat avec les valeurs recueillies dans la littérature concernant umbu-cajá et d'autres espèces de *Spondias* (Tableau 7).

Seule l'activité antioxydante de la pulpe du fruit (excluant l'exocarpe) de *Spondias* sp. a déjà été étudiée. Elle a été mesurée par une méthode différente (ORAC) et est comprise entre 250 et 840 $\mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$ (12). Elle est 10 fois supérieure à l'activité de l'exocarpe mesurée par la méthode DPPH (Tableau 7).

En ce qui concerne le fruit de *Spondias tuberosa*, l'activité antioxydante de la pulpe du fruit a également été évaluée par la méthode ORAC. La valeur moyenne obtenue est égale à $780 \pm 8 \mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$ (12). Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle de la pulpe mesurée chez *Spondias* sp. (Tableau 7).

Si nous comparons les valeurs obtenues entre les deux méthodes ORAC et FRAP pour *Spondias tuberosa*, nous remarquons que la valeur moyenne obtenue avec la méthode ORAC présente

des résultats bien plus élevés (x70) que les résultats obtenus avec la méthode FRAP (Tableau 7).

Enfin, la peau du fruit de *S. mombin* possède une valeur moyenne similaire à celle de *S. tuberosa* selon la méthode FRAP: respectivement $11,64 \pm 0,2$ et $12,64 \pm 0,09$ $\mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$ (40) (Tableau 7).

Tableau 7. Valeurs des pouvoirs antioxydants de trois espèces de *Spondias*

Espèce végétale	Test utilisé	Test DPPH en $\mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$	Test ORAC en $\mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$	Test FRAP en $\mu\text{mol TEAC. g}^{-1}$
<i>Spondias sp.</i>	(e)	$27,6 \pm 0,4$ (*)	-	-
	(p)	-	250 à 840 ⁽¹²⁾	-
<i>Spondias tuberosa</i>	(e)	-	-	-
	(p)	-	780 ± 8 ⁽¹²⁾	$11,64 \pm 0,2$ ⁽⁴⁰⁾
<i>Spondias mombin</i>	(e)	-	-	-
	(p)	-	-	$12,64 \pm 0,09$ ⁽⁴⁰⁾

exocarpe :(e) ; pulpe : (p) ; (*) Obtenu expérimentalement dans cette étude

1.1.2 Contenu Phénolique Total (TPC)

La mesure du TPC est obtenue par la méthode Folin-Ciocalteu de Slinkard et a été réalisée 3 fois. Les valeurs moyennes obtenues ne sont pas significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis (p-value = 0.37)..

La valeur moyenne du TPC expérimental mesurée avec l'exocarpe de *Spondias sp* est égale à $102,63 \pm 4,28$ mg d'équivalent en acide gallique par gramme (EAG. g^{-1}). Ce résultat est supérieur à ceux retrouvés pour la pulpe : la différence atteint un facteur 100. En effet, les valeurs moyennes oscillent entre 0,27 et 1,49 mg EAG. g^{-1} pour la pulpe de *Spondias. sp* (Tableau 8) (12,41,43).

La différence du TPC constatée entre l'exocarpe et la peau de *Spondias sp.* est également retrouvée pour l'espèce *Spondias tuberosa*, cette différence atteint environ un facteur 10. En effet la quantité de composés phénoliques mesurée est de $4,66 \pm 0,2$ mg. g^{-1} pour la peau et de 0,22 à 0,92 mg. g^{-1} pour la pulpe (Tableau 8) (43).

Ainsi nous constatons que l'exocarpe de *Spondias* sp. possède un TPC bien supérieur à celui de *Spondias tuberosa*. En revanche la pulpe de *Spondias* sp. possède un TPC du même ordre de grandeur à celui de *Spondias tuberosa* (Tableau 8).

Tableau 8. Valeurs des TPC obtenues (en mg. EAG. g⁻¹)

<i>Spondias</i> sp.	(e)	102,63 ± 4,28 (*)
	(p)	0,27 à 1,49 ⁽¹²⁾
<i>Spondias tuberosa</i>	(e)	4,66 ± 0,2 ⁽⁴³⁾
	(p)	0,22 à 0,92 ^(41,43)

(e):exocarpe, (p):pulpe, (*):Obtenu expérimentalement dans cette étude

1.2 Chromatographie UHPLC/Q-TOF

Le chromatogramme, lu à 280 nm, représente l'ordre d'éluion des différentes espèces chimiques matérialisées par des pics en fonction de leur temps de rétention (tr). La hauteur des pics est corrélée à la quantité de l'espèce correspondante contenue dans l'extrait d'exocarpe de *Spondias* sp. Le temps d'analyse est d'environ 10 min. Chaque pic principal est intégré et le temps de rétention correspondant en min est indiqué en haut. Leur intensité (hauteur) est déterminée grâce à une échelle en unité arbitraire (AU) allant de 0 à 12,5 mAU (Figure 24).

Soulignons la présence d'un composant majeur à tr = 6,486 min, ainsi que trois autres pics respectivement tr = 0,512 ; 4,618 et 5,868 min. Le pic à tr = 4,618 min est plus large et moins clairement défini que les 3 autres cités.

Chaque composé majoritaire peut être analysé par son spectre UV. Le pic dominant à tr = 6,486 min possède un spectre avec 3 maxima à 225, 256 et 352 nm et un épaulement entre ceux-ci à 302 nm. Le spectre du pic à tr = 5,868 min, comporte deux pics à 226 et 276 nm. Enfin le pic du composant au temps tr = 4,618 min est quasi similaire au précédent avec deux pics à 226 et 278 nm (Figure 24).

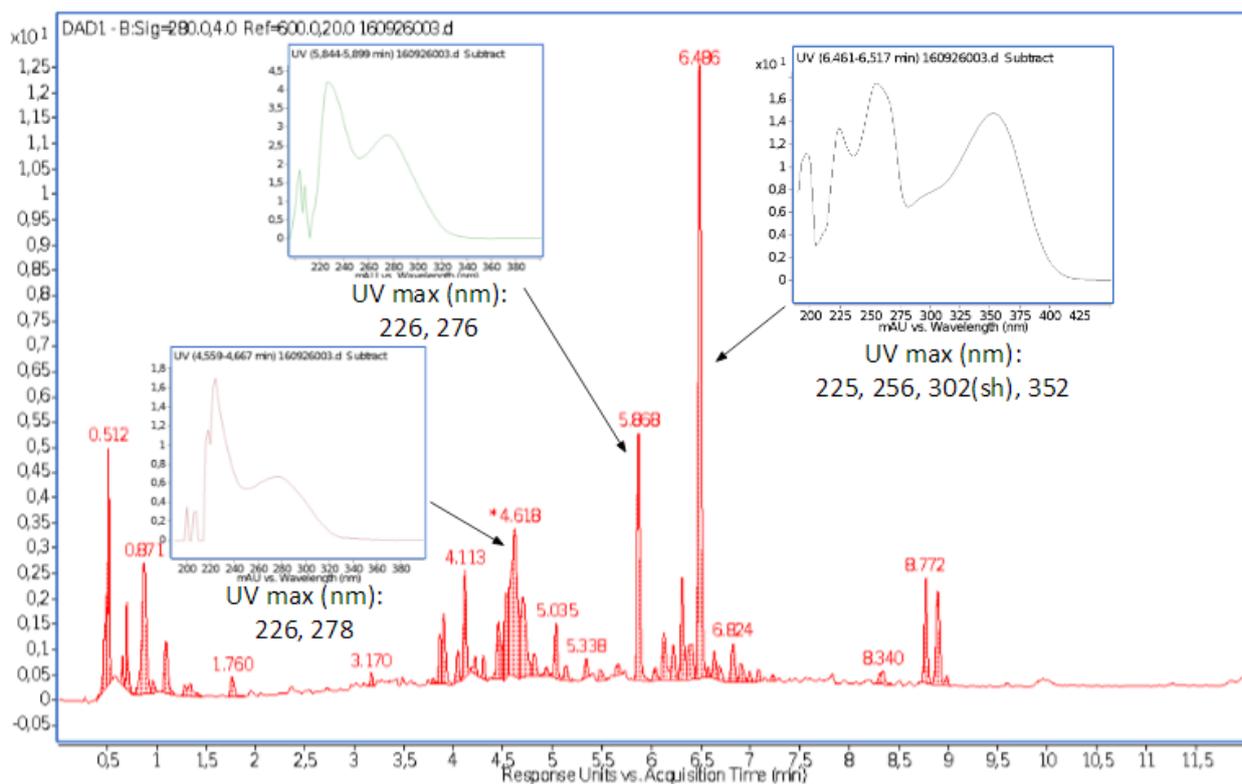


Figure 24. Chromatogramme UV 280 nm – extrait *Spondias sp* (umbu-cajá)

En plus du spectre UV, un spectre de masse haute résolution peut être associé à cette analyse chromatographique. Ce spectre est présenté comme suit : la molécule mère correspond au pic sélectionné sur la fenêtre du haut de la Figure 25, avec sa masse moléculaire indiquée au sommet (611,1585 g/mol). Les autres pics représentés sur la fenêtre du bas représentent les ions fils obtenus par fragmentation dans la cellule de collision située après le quadrupole dans le spectromètre de masse.

Lorsque nous appliquons ce type d'analyse au composé majoritaire au $t_r = 6,486$ min, il révèle un ion pseudomoléculaire $[M+H^+]$ de masse de 611,1585 g/mol équivalent à un composé de formule brute de $C_{27}H_{30}O_{16}$ telle que calculée par le logiciel. Quatre autres pics sont annotés avec une masse respectivement de 303,0483 ; 194,1167 ; 125,9853 et 60,0446 g/mol, correspondant aux ions fils.

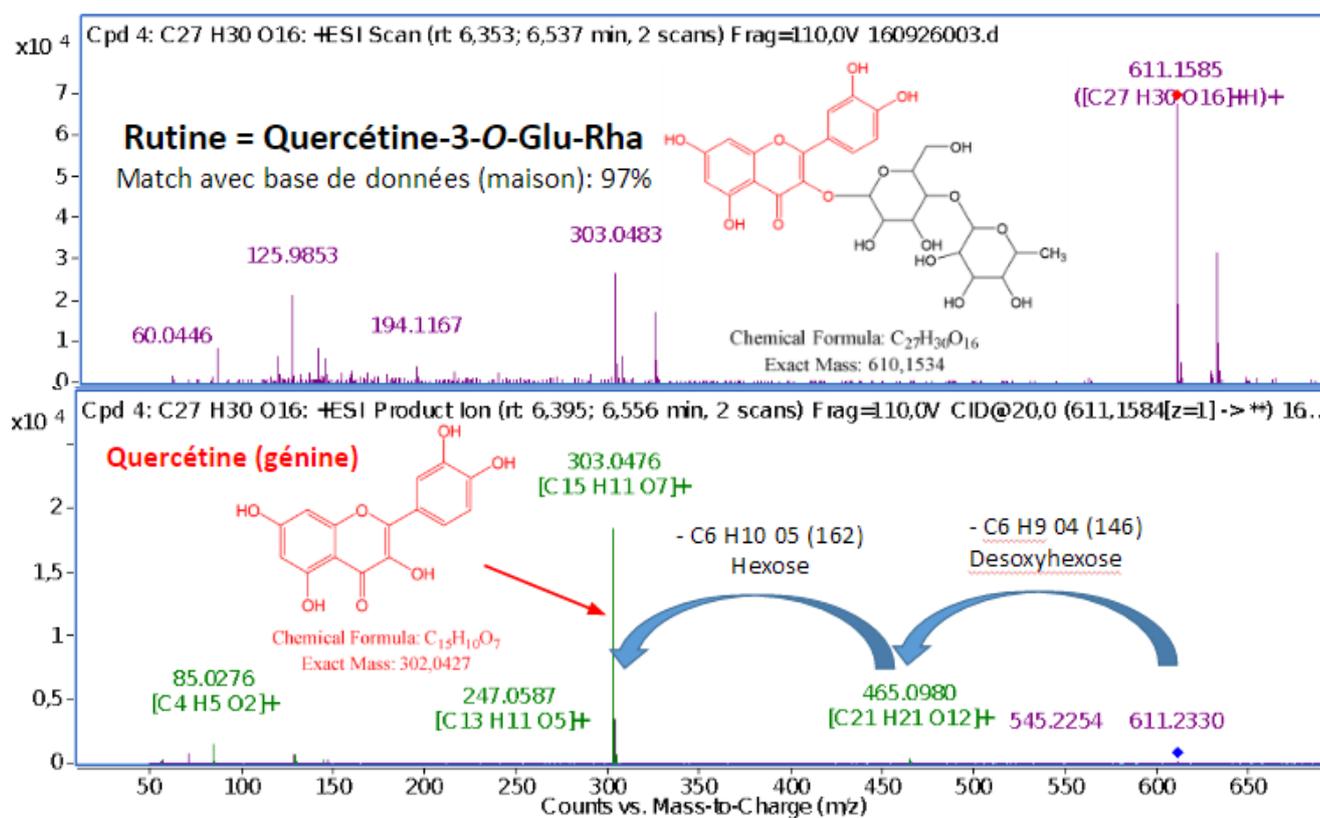


Figure 25. Spectre de Masse et comparaison avec une base de données

D'après la base de données interne réalisée au laboratoire d'analyse (CESN, UMR 5557), le composant majoritaire est un hétéroside de la quercétine : la rutine (score d'identification : 98%). La partie osidique est formée d'un hexose (glucose) et d'un désoxyhexose (rhamnose), comme nous pouvons le voir sur la fenêtre inférieure de la Figure 25. Cela est retrouvé dans les sous fragments fils du spectre de masse : en effet, la fragmentation de la rutine dans la cellule de collision permet de séparer les deux sucres de poids moléculaire ~146 et 162 g/mol de la génine (quercétine) ayant une masse théorique de 303,0476 g/mol. Ceci est de plus corrélé avec son spectre UV caractéristique des flavonols 3-O-substitués pour lesquels la bande d'absorption I est inférieure à 360 nm, comme représenté sur la fenêtre supérieure droite de la Figure 24.

2. Evaluation des effets pharmacologiques de l'extrait

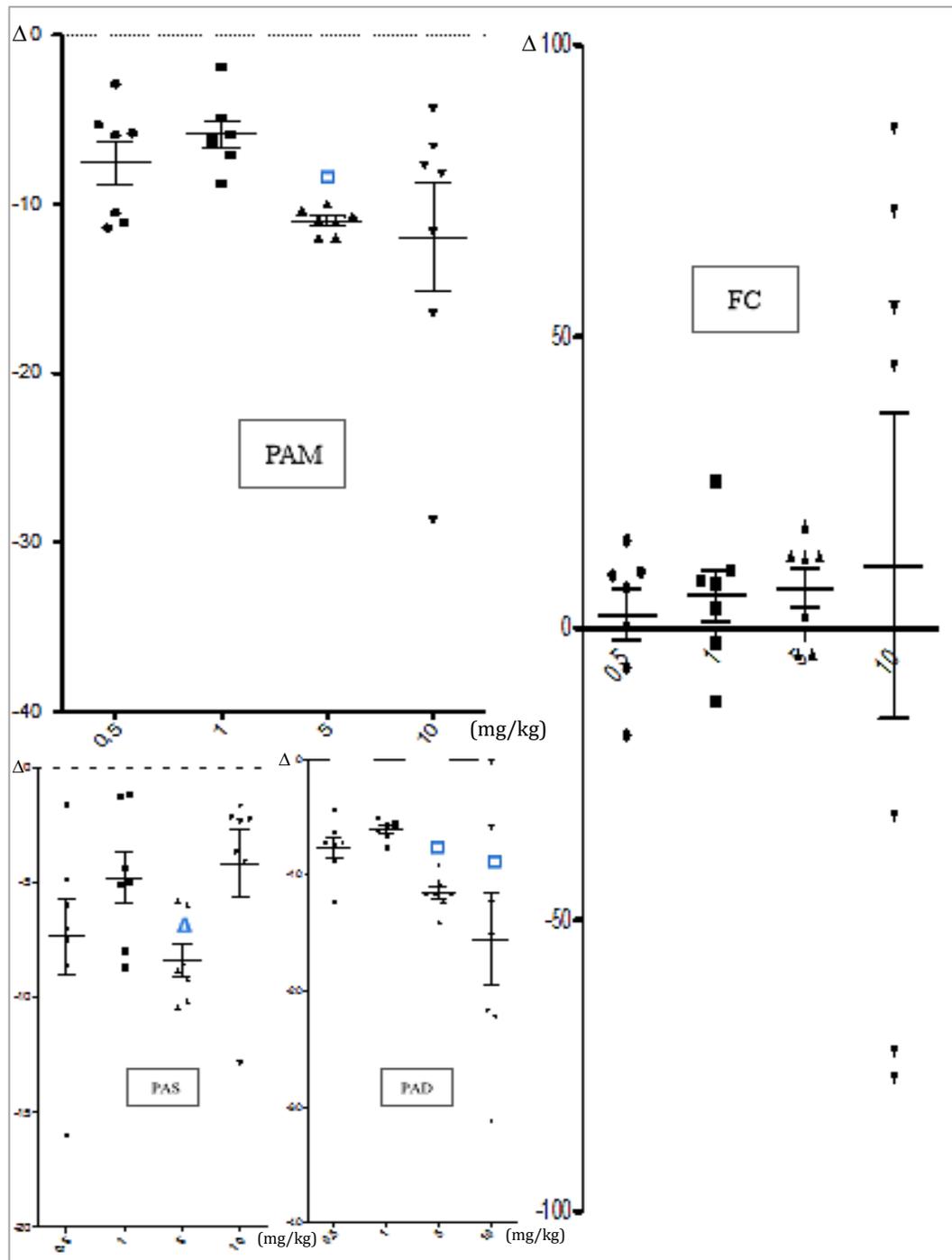
2.1 Evaluation in vivo des paramètres cardiovasculaires après injection i.v.

Les résultats (n=7) obtenus sont représentés sous forme graphique pour chacun des paramètres PA et FC par la dispersion des valeurs mesurées en fonction des doses de l'extrait injectées en i.v. (0,5 ; 1 ; 5 et 10 mg/kg). En ordonnée sont indiquées l'unité de mesure (mm Hg pour la PA et batt/min pour la FC). Chaque point représente la différence d'un paramètre obtenue après la soustraction de la valeur enregistrée après injection à celle d'avant injection. La moyenne des différences, obtenue pour chaque paramètre aux 4 concentrations, est matérialisée par un segment horizontal (le plus large) tandis que les valeurs limites moyennes (\pm SEM) sont matérialisées par les segments horizontaux plus étroits (Figure 26).

Les valeurs moyennes ainsi que les SEM sont également présentées pour tous les paramètres dans un tableau de données (Figure 26 (Tableau)).

Nous allons tout d'abord examiner les deux principaux paramètres que sont la PAM et la FC. Aux faibles doses injectées (0,5 et 1 mg/kg), la différence moyenne mesurée pour la PAM n'est pas significativement modifiée. Elle est en revanche significativement différente à la dose de 5 mg/kg, atteignant une différence de pression de $-11 \pm 0,6$ mm Hg comparée à la PAM mesurée à la dose précédente de 1 mg/kg ($p < 0,05$ (\square)). La PAM enregistrée à la dose maximale de 10 mg/kg présente une différence similaire à celle obtenue à la dose de 5 mg/kg ($-12 \pm 6,1$ mm Hg). Une grande dispersion des valeurs est observée pour cette dose maximale. Nous observons de manière générale une tendance à la diminution de la PAM en fonction des doses croissantes testées. De plus le résultat du test non paramétrique de Kruskal-Wallis montre que parmi les quatre doses étudiées, au moins une n'a pas le même effet sur la PAM ($p < 0,05$). Il s'agit de la valeur moyenne mesurée à la dose de 1 mg/kg (Figure 26 (PAM)).

En ce qui concerne les différences de FC, la moyenne des valeurs mesurées à la dose de 0,5 mg/kg est égale à $2,3 \pm 4,4$ batt/min puis celle-ci augmente légèrement (non significatif) pour atteindre $5,6 \pm 4,4$ batt/min à la dose de 1 mg/kg et $6,8 \pm 7,7$ batt/min à celle de 5 mg/kg. La différence moyenne atteint $10,7 \pm 26$ batt/min à la dose maximale de 10 mg/kg. Si nous comparons ces résultats entre eux, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis montre que les moyennes des variations de FC sont similaires. Nous notons cependant pour ce paramètre également, une très grande variabilité (± 26 batt/min) de la FC suite à l'injection de la plus forte dose (Figure 26 (FC)).



Δ Paramètre	0,5		1		5		10	
	moyenne	+/- SEM						
PAM (mm Hg)	-7,56	1,28	-5,86	0,80	-11,00	0,29	-11,96	3,16
PAS (mm Hg)	-7,37	1,67	-4,81	1,10	-8,41	0,70	-4,19	1,49
PAD (mm Hg)	-7,64	0,93	-6,04	0,30	-11,51	0,56	-15,54	3,98
FC (batt/min)	2,29	4,36	5,57	4,40	6,84	3,37	10,71	26,24

Figure 26. Evolution des paramètres cardiovasculaires enregistrés chez le rat suite aux injections i.v. de l'extrait d'umbu-cajá avec la table des données associées

Examinons maintenant les variations de PAS et PAD mesurées après l'injection de l'extrait à des concentrations croissantes. Les valeurs moyennes de la PAS montrent une tendance à l'augmentation. Cela est d'autant plus vrai la moyenne obtenue à la dose de 5 mg/mL n'est pas considérée. En effet, le test de Kruskal-Wallis montre que les différentes doses ont le même effet sur la PAS excepté pour la dose de 5 mg/kg ($p < 0,05$) (Figure 26 (PAS)).

La PAD se comporte de façon similaire à la PAM, telle que le montre les enregistrements. Ici aussi, le test de Kruskal-Wallis montre que les différentes doses ont même effet sur le paramètre enregistré à l'exception de la dose à 1 mg/kg ($p < 0,05$) (Figure 26 (PAD)).

De manière générale, nous observons que pour n'importe quelle dose administrée, la PA (moyenne, systolique et diastolique) est abaissée, c'est-à-dire que les valeurs des différences enregistrées sont négatives. Ce n'est pas le cas pour les moyennes de la FC, qui sont positives et ont tendance à augmenter en fonction des doses injectées (Figure 26).

Notons que pour tous les paramètres enregistrés, excepté pour la PAS, la dose de 10 mg/kg provoque des effets ayant la plus grande variabilité parmi les quatre doses injectées. Cela se traduit par une SEM plus élevées à la dose de 10 mg/kg comparée aux SEM calculées aux autres doses (Figure 26 (Tableau)).

Notons également que ces effets observés in vivo sont temporaires. La PA et la FC reviennent à leur état basal au bout de 2 à 3 secondes après l'arrêt de l'enregistrement pour les doses de 0,5 mg/kg à 5 mg/kg. En effet les valeurs notées avant l'injection de l'extrait sont retrouvées après 2 à 3 secondes. Pour les doses de 10 mg/kg le retour à l'état basal est observé après une dizaine de secondes.

2.2 Mesure la réactivité vasodilatatrice d'anneaux artériels mésentériques supérieurs

Les valeurs enregistrées traduisent la force exercée (en newton) par les anneaux artériels sur les anses métalliques auxquelles elles sont suspendues. Nous avons transformé les résultats en pourcentage, en prenant 0% la valeur de la force initiale obtenue suite à l'administration d'Ad à la concentration maximale de 10^{-3} M. Les valeurs évoluent en fonction des concentrations de l'extrait d'umbu-cajá présentes dans la cuve, comprises entre 10^{-7} et 10^{-3} g/mL.

Nous obtenons une courbe effet-dose pour chacune des conditions expérimentales : avec et sans endothélium. Cette courbe est représentée sur la Figure 27 avec en abscisse le logarithme de la concentration de cet extrait et en ordonnée inverse le pourcentage de l'effet.

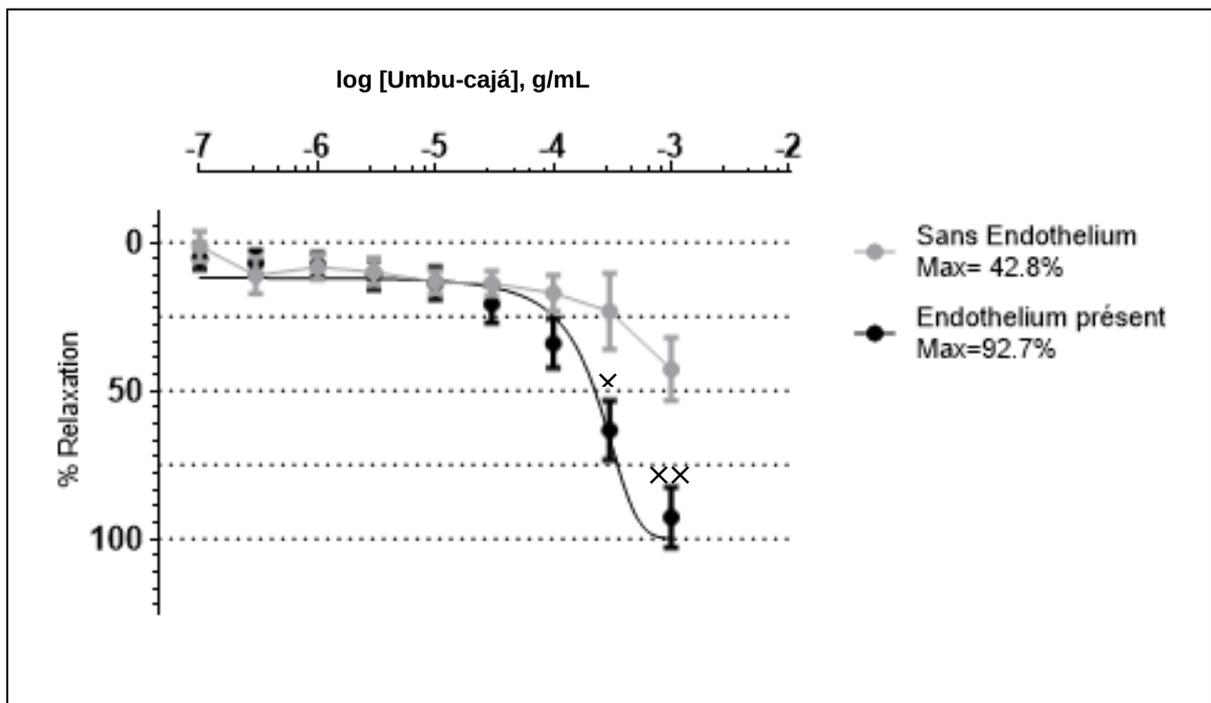


Figure 27. Courbe effet-dose inversée de la réactivité d'anneaux d'artères mésentériques supérieures chez les rats WKY normaux-tendus en présence de différentes concentrations d'extrait d'umbu-cajá

Pour les anneaux dénués d'endothélium, une légère relaxation ($10\% \pm 2$) est observée pour la deuxième concentration ($2 \cdot 10^{-7}$ g/mL). Ensuite, pour les concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-4} g/mL, le pourcentage de relaxation se stabilise à environ 10%. Au-delà de 10^{-4} g/mL l'effet vasorelaxant augmente progressivement et atteint un maximum de $43\% \pm 8$ à la concentration de 10^{-3} g/mL.

L'effet vasodilatateur observé pour les anneaux possédant encore de l'endothélium fonctionnel, est identique à celui des anneaux dénués d'endothélium aux premières concentrations comprises entre 10^{-7} et 10^{-4} g/mL. Pour une concentration supérieure à 10^{-4} g/mL nous observons une importante relaxation. L'effet augmente très fortement, passant respectivement de $30\% \pm 5$ à $93\% \pm 7$ pour les concentrations de 10^{-4} et de 10^{-3} mg/mL.

Si nous comparons les effets observés entre une préparation avec endothélium à ceux obtenus sans endothélium à la concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ g/mL, l'effet vasorelaxant est significativement différent entre ces deux conditions ($p < 0,05$ (×)). A la concentration maximale testée de $1 \cdot 10^{-3}$ g/mL, cette différence est encore plus importante ($p < 0,01$ (××)).

Ainsi, nous pouvons conclure que la relaxation des anneaux artériels mésentériques est plus importante, à partir des concentrations testées supérieures à 10^{-4} g/mL en présence d'endothélium qu'en absence de ce dernier.

2.3 Activité antioxydante évaluée au microscope à fluorescence.

Nous mesurons dans cette partie l'activité antioxydante de l'extrait grâce à un marqueur fluorescent reflétant la quantité de ROS présente sur les coupes de tissus artériel.

L'intensité relative moyenne de la fluorescence est représentée par un histogramme pour chacune des conditions expérimentales : (A : contrôle) situation normo-tensive ; (B : L-NAME) situation de stress oxydant ; (C : L-NAME + Umbu-caja 10 mg/mL), (D : L-NAME + Umbu-caja 50 mg/mL) et (E : L-NAME + Umbu-caja 100 mg/mL) addition d'umbu-cajá à la situation de stress oxydant (Figure 28). Le paramètre d'intensité relative moyenne de la fluorescence représente la quantité de ROS existant dans les coupes de micro-vaisseaux.

L'intensité moyenne du groupe contrôle (A) est considérée comme 100% de la fluorescence. Ainsi la fluorescence des autres conditions expérimentales (B) (C) (D) (E) est représentée en pourcentage de celle mesurée pour le groupe (A) (Figure 28).

Dans un premier temps, il s'agit de vérifier l'hypothèse de l'augmentation de la quantité des ROS au sein du groupe traité au L-NAME comparée à la quantité mesurée dans le groupe contrôle. Cette hypothèse est validée, en effet les micro-vaisseaux du groupe L-NAME voient

leur intensité de fluorescence moyenne augmenter de façon significative comparée à celle du groupe contrôle : $26\% \pm 5$ ($p < 0,05$ (★)) (Figure 28).

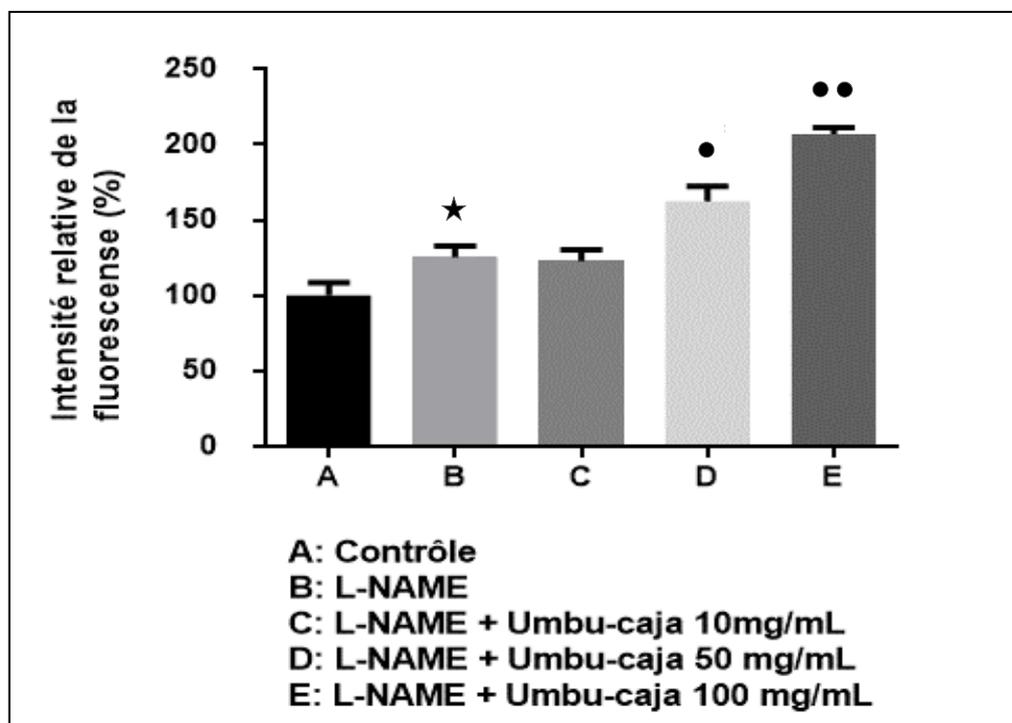


Figure 28. Activité fluorescente des micro-vaisseaux reflétant la quantité de ROS dans les différentes conditions expérimentales

Dans un second temps, nous évaluons l'effet de l'addition de l'extrait d'umbu-cajà sur l'intensité de la fluorescence comparée au groupe B (L-NAME).

A la première concentration de 10 mg/mL (groupe (C)), la fluorescence émise par les micro-vaisseaux possède une intensité moyenne équivalente au groupe L-NAME seul (groupe (B)) : $123\% \pm 5$.

A la concentration de 50 mg/mL (groupe(D)) l'intensité de fluorescence augmente et elle est significativement différente ($163\% \pm 15$) par rapport à celle mesurée sous la condition L-NAME seul (B) ($p < 0,05$ (●)).

L'intensité de la fluorescence atteint une valeur de $207\% \pm 3$ après addition d'umbu-cajà à 100 mg/mL. Cette valeur est significativement différente comparée à celle obtenue à la condition L-NAME seul ($p < 0,01$ (●●)).

Ainsi nous constatons une augmentation significative de l'intensité fluorescente suite à l'ajout de l'extrait d'umbu-cajá aux concentrations de 50 et 100 mg/mL comparé à la fluorescence émise par le groupe B.

L'ensemble de ces résultats peuvent être illustrés par les photographies des micro-vaisseaux obtenues aux différentes conditions expérimentales : (A : contrôle) correspond à la photographie (CTL) ; (B : L-NAME) à la photographie (L-NAME) ; (C : L-NAME + Umbu-caja 10 mg/mL) à la photographie (10) ; (D : L-NAME + Umbu-caja 50 mg/mL) à la photographie (50) et (E : L-NAME + Umbu-caja 100 mg/mL) à la photographie (100) (Figure 29). La fluorescence de couleur rouge vif sur les photographies, traduit la présence des ROS dans les micro-vaisseaux.

Les vaisseaux sont faiblement marqués sous la condition du groupe CTL ce qui traduit une faible présence des ROS intracellulaires (Figure 29 (CTL)). L'ajout de l'inhibiteur L-NAME augmente la fluorescence sur toute l'épaisseur de la paroi du vaisseau et plus particulièrement celle de la couche cellulaire regardant la lumière de celui-ci (Figure 29 (L-NAME)). Cette couche, la plus interne, est totalement illuminée et peut s'apparenter à l'endothélium. Nous pouvons supposer qu'après l'addition de L-NAME seul, les enzymes synthétisant l'oxyde nitrique ont été particulièrement inhibées dans cette région de la paroi.

L'observation des coupes des micro-vaisseaux après l'ajout de l'extrait d'umbu-cajá aux trois concentrations étudiées, montre une localisation de la fluorescence répartie sur l'ensemble de la paroi du vaisseau. Cette distension de fluorescence peut être interprétée comme étant une augmentation de la quantité de ROS répartie sur l'ensemble des couches cellulaires de la paroi dont les CML (Figure 29 (10, 50, 100)).

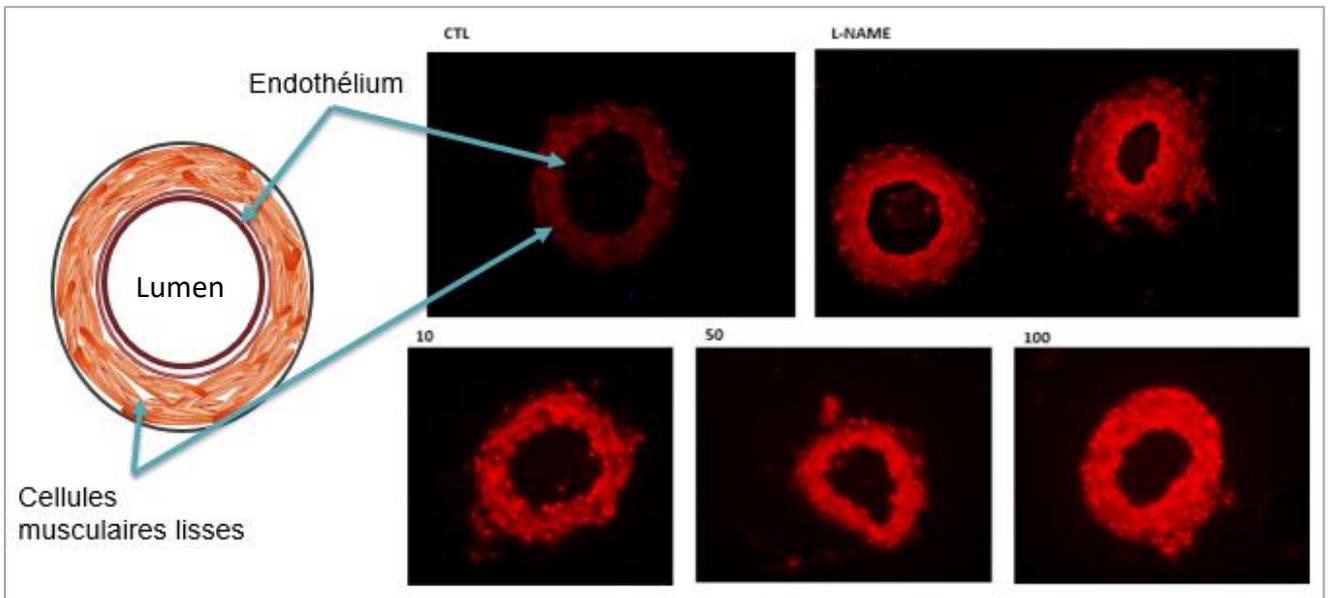


Figure 29. Photographies des coupes de micro-vaisseaux marquées au DHE.
Grossissement x40

Partie IV : Discussion et Perspectives

1. Préambule

Dans l'ensemble de la littérature scientifique, peu de données peuvent être exploitées concernant le pouvoir antioxydant et/ou les effets cardiovasculaires de l'exocarpe des fruits du genre *Spondias* ; surtout si nous souhaitons effectuer la distinction entre les deux descriptions de *Spondias* sp. existantes : « umbu-cajá » ou « cajarana do Sertão ».

Nous nous attacherons donc dans cette discussion à commenter les méthodes employées pour chaque expérience et comparer les résultats obtenus à ceux de la littérature concernant d'autres espèces végétales similaires ou bien des molécules appartenant à la même famille chimique.

2. Analyse phytochimique

2.1 Pouvoir antioxydant in vitro

La méthode utilisée semble être déterminante quant aux résultats obtenus dans l'expérience de quantification du pouvoir antioxydant. Tous les résultats obtenus sont exprimés avec la même unité de référence ($\mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$) cependant pour un même échantillon analysé (pulpe ou exocarpe) les valeurs diffèrent selon les tests utilisés: ORAC, FRAP, DPPH...

En effet nous retrouvons dans la littérature que la pulpe du fruit de *Spondias tuberosa* possède des valeurs de pouvoir antioxydant ; obtenues avec la méthode ORAC ; plus élevées que celles obtenues avec la méthode FRAP : $780 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ avec ORAC (12) et $11,64 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ avec FRAP (40).

Un autre exemple, *Citrus sinensis*, plus communément appelée Orange est une espèce réputée pour ses propriétés antioxydantes. Elle montre une différence de résultat du pouvoir antioxydant mesuré entre les méthodes DPPH et FRAP. L'exocarpe de *Citrus sinensis* possède 6 à $9 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ lorsque la mesure est réalisée avec la méthode DPPH. Tandis qu'avec la méthode FRAP, le résultat est beaucoup plus élevé : 20 à $45 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ pour le même échantillon (131). Cette dernière comparaison vient confirmer la différence de sensibilité des tests quant à l'évaluation du pouvoir antioxydant d'un extrait végétal.

Ainsi il semblerait que l'évaluation du pouvoir antioxydant soit méthode dépendante. Il sera donc impératif de comparer des résultats obtenus uniquement avec la même méthode.

Dans cette optique, le test au DPPH qui a été réalisé sur l'exocarpe d'umbu-cajá, sera l'unique test à être utilisé dans le but de faire des comparaisons avec d'autres espèces de fruit.

Les résultats obtenus avec le test au DPPH réalisé sur la peau d'orange précédemment citée, (*Citrus sinensis*) ont des valeurs plus faibles comparées aux résultats obtenus avec la peau de *Spondias* sp : $8,25 \pm 0,3 \mu\text{mol TAEC} \cdot \text{g}^{-1}$ pour l'orange (131) et $27,6 \pm 0,4 \mu\text{mol TAEC} \cdot \text{g}^{-1}$ pour umbu-cajá.

Pour une autre espèce comme *Prunus serotina* var. Capulí (cerise Capulí d'équateur) également réputée pour ses propriétés antioxydantes, l'activité antioxydante évaluée au DPPH concernant l'exocarpe est plus élevée ($76 \pm 21 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$) que celle obtenue dans notre étude (132). Ainsi notre extrait d'exocarpe possède une activité antioxydante relativement élevée comparée aux autres espèces de fruit connues pour leur pouvoir antioxydant.

Une autre tendance semble se dégager à la vue des résultats obtenus et de la littérature : l'exocarpe d'une espèce donnée possède une capacité antioxydante plus élevée que celle de sa pulpe. C'est le cas pour *Spondias tuberosa* : l'exocarpe possède une activité supérieure (> 60%) à celle mesurée dans sa pulpe (43). Cette différence se retrouve pour d'autres espèces de fruit précédemment citées, comme *Citrus sinensis* ($8,25 \pm 0,3$ pour sa peau contre $2,6 \pm 0,1 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ pour sa pulpe) ou *Prunus serotina* var. Capulí (76 ± 21 pour sa peau contre $13 \pm 5 \mu\text{mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ pour sa pulpe) (131,132).

Comme précédemment expliqué dans la *PARTIE I. 2.3.2 Activité anti-radicalaire*, certaines espèces chimiques, comme les polyphénols, sont responsables de la majorité de l'activité antioxydante chez les végétaux. De ce fait nous pouvons évaluer le pouvoir antioxydant grâce à la quantification plus précise de ces espèces polyphénoliques. La méthode au réactif de Folin-Ciocalteu est classiquement utilisée pour la quantification du TPC. C'est pourquoi toutes les données recueillies dans la littérature et obtenues expérimentalement, qui vont être discutées, ont suivi la méthode de quantification utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

L'extrait d'exocarpe d'umbu-cajá possède des valeurs de TPC supérieures à celles mesurées dans les extraits d'exocarpe des autres espèces de *Spondias* (12,19,43). Ceci est également vrai lorsque l'on compare ce résultat à d'autres obtenus pour différents genres botaniques : plusieurs jus de fruits exotiques dont umbu-cajá et de vins commerciaux (44).

Un parallèle peut être fait entre les différences des capacités antioxydantes et la quantification des TPC concernant la pulpe et la peau d'un fruit donné. En effet les résultats de la quantification des TPC obtenus pour l'exocarpe sont supérieurs à ceux obtenus avec la pulpe du fruit, tout comme ce qui a été observé pour les résultats de capacité antioxydante. Il s'avère que ces deux paramètres (capacité antioxydante et TPC) sont corrélés de façon positive (12).

Autrement dit, si le résultat du pouvoir antioxydant est supérieur pour une certaine partie du fruit comparée à une autre, la quantification des TPC suivra cette même logique en ayant des valeurs plus élevées pour cette même partie du fruit (12,40,131,132). Ce résultat confirme l'importance des espèces polyphénoliques dans l'activité antioxydante des espèces végétales.

Au final, les tests de quantification du pouvoir antioxydant et du TPC ont permis de confirmer que l'exocarpe de *Spondias* sp. est un candidat intéressant au regard de la littérature, à fort potentiel antioxydant. De plus les valeurs des différentes quantifications (DPPH, FRAP TPC...) réalisées pour les espèces de *Spondias* sont de même ordre de grandeur pour un test donné ; ceci peut attester d'une certaine cohérence phénotypique au sein du genre *Spondias*.

2.2 La rutine et ses dérivés

Cette étape d'identification moléculaire a été réalisée dans le but de préciser le potentiel antioxydant des fruits d'umbu-cajá et plus particulièrement de son exocarpe. L'UHPLC couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier un composé majoritaire dans la peau de *Spondias* sp. Il s'agit de la rutine ou rutoside, une molécule de type flavonol ayant une masse moléculaire d'environ 610,52 g/mol (133). Le nom rutoside fait référence au caractère glycosidique du composé, avec ses deux sucres simples : glucose et rhamnose qui sont liés à la quercétine par une liaison oxygène au niveau de la position 3.

Encore une fois aucune donnée n'est rapportée dans la littérature quant à la composition moléculaire de la peau du fruit de *Spondias* sp. Seuls les composés volatiles de la pulpe ont été précisément étudiés concernant le fruit. Le β -Caryophyllène, le 2-hexanol ainsi que le 2-méthylbutanal sont majoritairement retrouvés avec des proportions évoluant en fonction du stade de maturité. Nous pouvons donc en conclure que ce sont des molécules simples : terpènes, alcools, aldéhydes, de faible poids moléculaire participant à l'odeur dégagée tout au long du processus de maturation (35).

La rutine est également retrouvée comme composant majeur dans les feuilles de *Spondias* sp. (26). La rutine et d'autres molécules dérivées des polyphénols comme les acides chlorogénique et caféique, l'isoquercétine sont retrouvées dans les feuilles de *Spondias tuberosa*. Tous ces composés constituent des marqueurs de contrôle de la qualité des extraits obtenus à partir de cette espèce *Spondias*, comme le suggère da Silva Siqueira et al. en 2016 (134).

La rutine et sa génine : la quercétine, possèdent une puissante activité antiradicalaire in vitro (135). En ce qui concerne les autres espèces du genre *Spondias*, peu de données sont disponibles dans la littérature, ce qui rend difficile la comparaison ou l'analogie avec les résultats expérimentaux.

3. Activité pharmacologique de l'extrait

3.1 Hypotension aigüe provoquée in vivo

Les valeurs enregistrées de la PAM ont tendance à baisser avec l'ajout de l'extrait d'umbuj . Au contraire, les valeurs de FC mesurées semblent augmenter (les deltas sont positifs) dans les mêmes conditions expérimentales. Remarquons également que les valeurs de la FC témoignent d'une grande variabilité. Ceci peut s'expliquer par l'amplitude de la FC physiologique du rat qui s'étend de 300 à 500 batt/min en condition normale (136).

L'augmentation de la FC corrélée positivement aux injections de l'extrait, peut s'expliquer par l'activation du système baroréflexe. En effet les barorécepteurs carotidiens ont pour fonction de réguler la pression artérielle grâce au déclenchement de mécanisme vasodilatateur ou vasoconstricteur selon la pression mesurée par ces mêmes barorécepteurs. Ainsi dans notre cas, il se peut que ce mécanisme soit activé dans le but de contrer un effet vasodilatateur provoqué par l'extrait (PA diminuée) initiant une tachycardie réflexe (FC augmentée).

Au vu des résultats obtenus par l'injection i.v. de l'extrait, il serait intéressant d'évaluer les potentiels effets toxiques déjà recensés pour le genre *Spondias*. En effet les données présentent une variabilité notable pour les doses maximales. Probablement que cette variabilité peut être la conséquence d'effets toxiques, expliquant la perturbation des paramètres cardiaques enregistrée aux doses élevées.

En dépit de référence bibliographique précise concernant l'exocarpe, nous pouvons nous baser sur les essais toxicologiques réalisés chez des rats avec d'autres types d'extraits des espèces de *Spondias* afin de déceler une éventuelle toxicité présente chez le genre *Spondias*.

Un premier essai réalisé avec un extrait méthanolique des feuilles de *Spondias* sp. a montré une absence de toxicité sur une période d'un mois (26). Une dose aigüe par voie orale de 2000 mg/kg a été administrée à un groupe de rats (mâles et femelles) et un autre groupe similaire a reçu une dose journalière par gavage oral de 500 mg/kg. La surveillance des paramètres hématologiques et des relevés d'autopsie se sont avérés normaux, sans anomalie (26).

Un deuxième essai réalisé avec plusieurs extraits (aqueux, méthanolique et éthanolique) de feuille de *Spondias mombin* montre des résultats différents (137). L'administration orale (≤ 5 g/kg) des trois types d'extraits ne produit aucun effet toxique. Une administration intrapéritonéale (i.p.) de l'extrait aqueux (doses ≤ 200 mg/kg) est atoxique alors que pour les deux autres types d'extraits, les effets toxiques apparaissent de manière plus importante (doses > 100 mg/kg). Pour les 3 types d'extraits, l'effet létal est observé pour une dose i.p. de 3,2 g/kg. Les doses létales 50 (LD50) des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique sont respectivement de 0,620 ; 1,08 et 1,42 g/kg administrées par voie i.p. (137).

Au premier abord nous pouvons supposer que les différents extraits testés ne présentent pas d'effets toxiques majeurs. L'extrait des feuilles de *Spondias mombin* est très faiblement toxiques par voie orale : les doses létales sont très élevées (5 g/kg). Les doses toxiques et létales obtenues par voie i.p. sont plus basses (0,6 à 3,2 g/kg) et laissent penser que celles obtenues par la voie i.v. le seraient d'avantage ($< 0,6$ g/kg).

Par conséquent, les doses i.v. utilisées dans notre protocole (0,005 à 0,01 g/kg) seraient probablement dangereuses au vu des doses de l'extrait méthanolique précédemment citées (0,6 à 3,2 g/kg). Cependant aucune conclusion précise ne peut être faite sur la toxicité de *Spondias* sp. puisque ces extraits n'ont pas été testés.

Le métabolisme des molécules présentes dans l'extrait n'a pas été pris en compte. En effet la rutine ingérée per os n'a pas le même devenir que celle i.v. ou i.p. Des données montrent que la rutine est métabolisée en dérivé de la quercétine (quercétine-glucuronide) dans l'intestin grêle et côlon (138). Ainsi un protocole de gavage sur une période de 21 jours minimum pourrait être envisagé, en monitorant les paramètres physiologiques des différents groupes de rats : traités ou non par l'extrait d'umbu-cajá. Ceci se rapprocherait plus de la réalité pharmacodynamique. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, des essais toxicologiques seraient intéressants à associer à ce protocole de gavage.

En conclusion, les expérimentations in vivo sont peu concluantes, néanmoins nous constatons un effet hypotenseur (delta négatif). La baisse de pression artérielle moyenne (PAM) atteint au minimum 5,5 mm Hg pour la deuxième dose (1 mg/kg) et au maximum 12 mm Hg pour la dose la plus élevée (10 mg/kg). Les potentiels effets toxiques que peuvent révéler l'extrait administré en i.v. sont à prendre en compte et nécessitent une étude dédiée à cela.

3.2 Relâchement musculaire des anneaux mésentériques ex vivo

Dans le but de préciser l'origine de la baisse de PA observée, l'expérience de réactivité ex-vivo a été mise en place. La PA est la résultante de 2 paramètres qui sont la résistance périphérique et la fréquence cardiaque comme le rappelle la formule établie dans *Partie I. 3.1.1.* D'après les résultats obtenus lors de l'expérience in vivo, nous pouvons raisonnablement attribuer la baisse de PA à la baisse de la résistance périphérique.

Nous observons donc une relaxation des vaisseaux, (diminution des RP) proportionnelle aux différentes concentrations de l'extrait. Cet effet est d'autant plus important que l'endothélium de ces vaisseaux est intact. Ainsi l'extrait antioxydant participerait à l'activation/amplification d'un mécanisme vasodilatateur à effet immédiat impliquant l'endothélium. Cet effet est observé sur le court terme et il est à mettre en parallèle avec le rôle au long terme de l'endothélium sur l'intégrité des fonctions vasculaires dans les pathologies hypertensives (68,69). En effet les propriétés antioxydantes de l'extrait d'exocarpe peuvent agir directement sur les ROS, en les neutralisant, empêchant la dégradation de la structure de l'endothélium et augmentent également la biodisponibilité des facteurs vasodilatateurs comme le NO et par conséquent participe à la relaxation des vaisseaux.

Afin d'évaluer plus finement les voies de signalisation mises en jeu dans le mécanisme de relaxation des CML, des inhibiteurs peuvent être utilisés. En effet il s'agit d'évaluer l'effet de l'ajout d'un inhibiteur dans les cuves à organes isolés sur l'effet vasorelaxant provoqué par l'extrait d'umbu-cajá (98) :

- L'Apocynine (inhibiteur de NOX) montrerait l'implication des enzymes NOX dans la genèse des ROS et évaluerait l'effet vasodilatateur de l'extrait d'umbu-cajá en présence de cet inhibiteur ;
- Les SOD mimétiques, qui comme leur nom l'indique, miment l'action de la SOD (catalysant la dégradation des ROS) tels que le manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP) ou le 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL) et évalueraient quant à eux l'implication de la voie pro-oxydante PI₃k/Akt/eNOS ;
- Les inhibiteurs des canaux potassiques calcium dépendant à haute et moyenne conductance (IK_{Ca}, SK_{Ca}) pourraient permettre d'évaluer l'implication du facteur EDHf dans la vasorelaxation provoquée par l'extrait d'umbu-cajá.

Au regard des conclusions établies sur les effets *in vivo* de l'extrait, nous pouvons nous recentrer sur les effets déjà recensés dans la littérature concernant la rutine et la quercétine dans la sphère cardiovasculaire. Ces deux composés ont montré des effets intéressants dans le traitement des problèmes vasculaires chez l'Homme.

Le premier : la rutine, ou plus précisément son dérivé O- β Hydroxy-éthyl, est efficace dans le cadre d'un traitement *per os* au long terme (5 ans) de l'insuffisance veineuse chronique qu'elle soit ou non associée à une microangiopathie initiale (3).

Le deuxième : la quercétine, a montré une réduction significative de la PA lors d'une méta-analyse suggérant un apport journalier supérieur à 500 mg *per os*. Ce résultat est d'autant plus important qu'il est associé à une thérapie antihypertensive conventionnelle comme celles utilisant les bêtabloquants ou les diurétiques thiazidiques (139). Ces dernières conclusions viennent conforter l'éventuel effet bénéfique que peut apporter cet extrait, contenant majoritairement de la rutine, dans la sphère cardiovasculaire.

3.3 Caractérisation physico-chimique de l'effet (pro)-oxydant *in vitro*

Nous pouvons rappeler que le modèle visant à induire une surproduction de ROS, créant un stress oxydatif chez les rats traités au L-NAME est validé (130). Ainsi, en inhibant l'enzyme eNOS, le niveau de stress oxydant vasculaire se voit augmenté entre les deux conditions : contrôle versus L-NAME.

Le pouvoir antioxydant confirmé par les expériences *in vitro* (DPPH, TPC) ne se manifeste pas aux concentrations élevées dans cette expérience de fluorescence. Au contraire, nous observons un effet pro-oxydant, où la quantité de ROS augmente dans les tissus au contact des concentrations élevées en extrait d'umbu-cajá. Ces concentrations ont été initialement choisies par analogie avec les concentrations de l'expérience *in vivo*.

Cela peut paraître inattendu, en raison des propriétés antioxydantes des polyphénols et de la rutine en particulier. Cependant, cet effet anti-radicalaire ne s'observe que dans une certaine gamme de concentrations biologiques ; au-delà l'effet est inversé et induit une réaction en chaîne accroissant la quantité des ROS. De cette manière, il est possible d'affirmer que les concentrations utilisées ici dépassent cette gamme seuil de concentrations biologiques (98). Ainsi la différence observée entre les expériences de réactivité méésentérique et de microscopie peut s'expliquer par cet effet seuil dépendant de la concentration polyphénolique et d'autres conditions cellulaires telles que la quantité d'ions métalliques libres intracellulaires (140,141).

Dans notre cas cette frontière, entre l'effet antioxydant bénéfique et celui néfaste créant une réaction en chaîne, se situerait entre 10 et 50 mg/mL d'umbu-cajá (groupes (B) et (C)).

Par conséquent les concentrations de l'extrait d'umbu-cajá utilisées dans l'expérience de fluorescence doivent être abaissées et comprises dans des gammes de concentration au-dessous de 10 mg/mL. De par leur action chélatrice, les espèces chimiques antioxydantes agiront de manière immédiate contre les ROS. Cela diminuerait l'intensité de fluorescence des coupes de micro-vaisseaux jusqu'à leur état initial (groupe (CTL)) ou la stabiliserait pour le moins, comme le montre l'émission de fluorescence enregistrée dans le groupe (B).

Au vu des photographies réalisées sur les coupes microscopiques, nous pouvons supposer que ce phénomène touche essentiellement l'endothélium et les CML. Il serait possible de confirmer cette hypothèse à l'aide d'un double marquage : le DHE pour les ROS et des marqueurs spécifiques (protéiques) de chacune des couches cellulaires : la E-sélectine pour l'endothélium et l' α -Tropomyosine ou la Laminine pour les CML.

Au-delà de cet effet antioxydant ou pro-oxydant, nous ne pouvons pas nier le fait que les polyphénols (quercétine, resvératrol...) soient impliqués dans plusieurs voies de signalisation qui ont déjà été étudiées dans le phénomène de vasodilatation (Partie I. 3.3.2).

Les voies sont multiples et impliquent des molécules d'adhésion vasculaires : VCAM-1 et ICAM-1, le facteur nucléaire NF- κ B, des enzymes détoxifiantes (SOD, CAT, GPx et HO-1) et l'enzyme eNOS.

Notons que les recherches sont encore en cours mais confirment également la participation d'un mécanisme pro-oxydant dans le phénomène de relaxation des CML via les molécules PI₃k/Akt/eNos (Partie I. 3.3.2). De plus il a été montré que la quercétine et ses métabolites inhibent l'activité des NOX membranaires dans les CML chez des rats normo- et hypertensifs (142).

Sur le même principe que l'expérience ex-vivo mise en œuvre avec les anneaux artériels mésentériques, nous pouvons utiliser des inhibiteurs afin d'évaluer plus finement les voies de signalisation au niveau cellulaire : comme par exemple l'Apocynine (inhibiteur de NOX) montrerait l'implication des enzymes NOX dans la genèse des ROS en présence ou non de l'extrait d'umbu-cajá. Nous pouvons également évaluer l'activité de la voie pro-oxydante PI₃k/Akt/eNOS en fonction de la présence des inhibiteurs MnTMPyp ou TEMPOL avec un

marqueur moléculaire de l'enzyme Akt. La quantité de ROS présente pourra être ainsi évaluée en présence de l'extrait d'umbu-cajá et des différents inhibiteurs.

Ainsi le mécanisme d'action de l'extrait contenant majoritairement de la rutine (dérivé diglycosidique de la quercétine) serait complexe et présenterait de multiples propriétés anti- et pro-oxydant en fonction des conditions intracellulaires. In fine il entrainerait, dans une certaine gamme de concentration, une action antioxydante possédant un effet bénéfique sur le long terme pour l'endothélium. De plus ce type de polyphénol (flavonoïde) agit en synergie avec l'endothélium artériel amorçant une vasodilatation de façon concentration dépendante.

4. Perspectives

Afin d'appréhender la variabilité phylogénétique évoquée lors de la revue bibliographique, il serait intéressant de mener à bout une identification botanique précise de l'espèce *Spondias* sp. Ceci consiste à analyser les profils HPLC d'extraits de peau de fruits provenant d'arbres soit géographiquement éloignés, soit portant des noms vernaculaires différents (umbu-cajá et cajarana do Sertão) et inclure également des fruits venant de chaque espèce supposées parents (*S. mombin* et *S. tuberosa*). Idéalement il faudrait aussi mettre en place les tests d'activité et de dosage (DPPH, TPC) de ces différents extraits et observer les éventuelles différences. Ainsi il serait possible de corréliser les profils HPLC avec les tests réalisés et d'infirmer ou confirmer certaines hypothèses selon les espèces étudiées.

Au-delà des résultats obtenus et des comparaisons des activités pharmacologiques décrites, ce fruit régional (umbu-cajá) est consommé au Brésil d'abord pour ses propriétés gustatives. De plus, l'espèce *Spondias* sp. possède une grande capacité d'adaptation environnementale, se développant dans un climat semi-aride à tropical. C'est pourquoi elle représente un intérêt économique non négligeable pour la région du nord-est brésilien, justifiant sa culture extensive.

Ce fruit possède, comme nous l'avons vu, des propriétés pouvant être bénéfiques pour l'homme lorsqu'il est consommé entièrement (peau et pulpe). En termes de santé publique, cette espèce fruitière contribue donc à garantir un apport minimum en molécules antioxydantes dans l'alimentation journalière. Il est important de maintenir un accès à ce type d'aliment, riche en antioxydants, afin de prévenir certaines pathologies comme l'hypertension artérielle. Ceci contribue à baisser le taux de mortalité des MCV. La consommation d'aliments riches en

antioxydants doit être d'autant plus valorisée que les conditions environnementales et économiques sont favorables à l'arboriculture de cette espèce : *Spondias* sp.

Cependant un apport excessif en molécules antioxydantes peut avoir un effet néfaste dans les différentes couches cellulaires. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux définir la frontière entre les effets pro- et antioxydants. En effet les nombreuses vertus attribuées aux composés phénoliques pour la santé humaine, ne mettent pas uniquement en jeu les propriétés antioxydantes mais des propriétés plus spécifiques impliquant l'interaction de ces composés avec divers constituants au sein de la cellule.

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : M. Ludovic BONNARD

L'intérêt croissant des patients envers les produits de sources naturelles pour se soigner ou prévenir certaines pathologies encourage la recherche pour de nouveaux candidats à de futurs médicaments ou à des traitements de phytothérapie. C'est ainsi que l'exocarpe du fruit de l'espèce *Spondias* sp. ("umbu-cajá") a été étudié pour ses propriétés antioxydantes, propriétés se distinguant de celles de sa pulpe.

L'analyse approfondie des composants de cet exocarpe a mis en évidence une molécule majoritairement présente : la rutine, retrouvée dans l'extrait hydro-méthanolique de celui-ci. Cette molécule possède des propriétés antioxydantes clairement identifiées dans des études antérieures réalisées in vitro.

En parallèle, la mesure d'effets pharmacologiques de cet extrait administré chez le rat a été réalisée, les résultats en seraient prometteurs. En effet la pression artérielle moyenne tend à baisser après injection en intraveineux de l'extrait. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans d'autres études réalisées chez le rat en présence de rutine isolée, ou de sa génine : la quercétine. Des expériences ex-vivo ont complété cette étude. Nous avons observé un effet vasorelaxant, concentration dépendant de l'extrait sur des artères mésentériques supérieures. Cette vasorelaxation est d'autant plus importante que l'endothélium est intact. La caractérisation physico-chimique, utilisant un marqueur fluorescent, démontre un effet oxydatif : émergence d'espèces oxygénées réactives ex-vivo consécutive à l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase endothéliale, enzyme synthétisant l'oxyde nitrique.

Cependant, l'addition de l'extrait d'umbu-cajá accroît de façon contradictoire la quantité d'espèces oxygénées réactives mesurée sur les coupes de micro-vaisseaux ex-vivo. Cette propriété physico-chimique "pro-oxydante" est bien connue des polyphénols et se manifeste dans une certaine gamme de concentration et dans des conditions intracellulaires particulières. Des études récentes montrent la mise en jeu de plusieurs processus moléculaires de voies de transductions initiées par un mécanisme pro-oxydatif, comme par exemple la voie de signalisation de l'Inositol triphosphate/protéine kinase B/Oxyde Nitrique synthétase endothéliale. Ainsi les propriétés pro-oxydantes des polyphénols, a priori néfastes, peuvent contribuer à un effet pharmacologique bénéfique, vasorelaxant.

Bien que l'identification botanique de l'espèce *Spondias* sp. ne soit pas clairement établie, son fruit présente donc des propriétés intéressantes dans le domaine cardiovasculaire : des propriétés antioxydantes démontrées in vitro et un potentiel vasodilatateur endothélium dépendant.

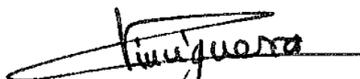
De plus amples explorations moléculaires sont envisageables afin de mieux caractériser cet effet pharmacologique qui pourrait être novateur dans le traitement de l'hypertension artérielle. En effet les composés polyphénoliques de l'extrait agissent directement sur les espèces réactives de l'oxygène et in fine préviennent les effets délétères de celles-ci au niveau des vaisseaux sanguins et plus particulièrement de l'endothélium.

Le Président de la thèse,
Nom : DIJOUX-FRANCA MG

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 14 SEP. 2017
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA

Références Bibliographiques

1. WHO. National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines - Report of a WHO Global Survey [Internet]. Geneva; 2005 [cité 13 oct 2016]. Report No.: WB 925. Disponible sur: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7916e/>
2. Kirienko AI, Bogachev VI, Zolotukhin IA, Golovanova OV. [Semisynthetic Diosmin (Phlebodia 600) for therapy of lower limb chronic venous insufficiency]. *Angiol Sosud Khir.* 2006;12(2):73-5.
3. Stuard S, Cesarone MR, Belcaro G, Dugall M, Ledda A, Cacchio M, et al. Five-year treatment of chronic venous insufficiency with O-(β -hydroxyethyl)-rutosides: Safety aspects. *Int J Angiol.* 2008;17(3):143-8.
4. Spondias — The Plant List [Internet]. [cité 24 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Anacardiaceae/Spondias/>
5. Mitchell JD, Daly DC. A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. *PhytoKeys.* 5 août 2015;(55):1-92.
6. Duarte O, Paull R. *Exotic Fruits and Nuts of the New World.* CABI; 2015. 344 p.
7. Miller A. *Spondias.* In: Kole C, éditeur. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cité 13 juill 2016]. p. 203-12. Disponible sur: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-20447-0_10
8. Duvall CS. On the origin of the tree *Spondias mombin* in Africa. *Journal of Historical Geography.* avr 2006;32(2):249-66.
9. Shaw HKA, Forman LL. The Genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in Tropical Asia. *Kew Bulletin.* 1967;21(1):1-19.
10. Giacometti D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: *Anais do Simposio Nacional de Recursos Genéticos de Fruteiras Nativas.* Cruz das Almas, Brasil: Embrapa-CNPMF; 1993. p. 13-27.
11. da Silva Júnior J., Fernandes Bezerra J., Lederman I. Recursos genéticos e melhoramento de fruteiras nativas e exóticas em Pernambuco. In: *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.* 1^{re} éd. Manoel Abílio de Queiróz, Clara Oliveira Goedert, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos; 1999. (Embrapa Semiárido, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
12. Gondim PJS. Identification of Caroteinoids, Quantification of bioactive compounds, and antioxidant activity of the genus *Spondias* [Internet] [Doctorat]. [Paraíba, Brésil]: UFPB; 2012 [cité 9 juill 2016]. Disponible sur: <http://tede.biblioteca.ufpb.br/handle/tede/8034>
13. Souza F. *Spondias agroindustriais e os seus métodos de propagação.* 1998;Documentos, 27.
14. da Silva Junior JF, Fernandes Bezerra JE, Lederman IE, Alves MA, de Melo Neto ML. Collecting, ex situ conservation and characterization of « cajá-umbu » (*Spondias*

- mombin×*Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution*. juin 2004;51(4):343-9.
15. De Souza Almeida CC, De Lemos Carvalho PC, Guerra M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (*Anacardiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1 déc 2007;155(4):541-7.
 16. Santos CAF, Oliveira VR de. Genetic inter-relationships among species of genus *Spondias* based on AFLP markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*. sept 2008;30(3):731-5.
 17. Lima A, Rezende L, Camara F, Nunes G. Propagação de cajarana (*SPONDIAS SP.*) e cirigüela (*SPONDIAS PURPUREA*) por meio de estacas verdes enfolhadas, nas condições climáticas de Mossoró-RN. *Revista Caatinga, Mossoró*. 2002;15:33–38.
 18. IBGE | Cidades | Infográficos | Paraíba | Pombal | Dados Gerais [Internet]. [cité 16 juill 2016]. Disponible sur: <http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=251210>
 19. Silva L. Qualidade e atividade antioxidante de frutos de genótipos de umbucajazeiras (*Spondias sp.*) oriundos da microrregião de Iguatu, CE [Internet] [Dissertation (Master en Agronomie)]. [Joao Pessoa]: UFPB/ Centro de Ciencias Agrarias; 2008 [cité 20 juill 2016]. Disponible sur: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp082111.pdf>
 20. Ibraf - Instituto Brasileiro de Frutas [Internet]. [cité 21 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.ibraf.org.br/index2.aspx>
 21. Vidigal MCTR, Minim VPR, Carvalho NB, Milagres MP, Gonçalves ACA. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). *Food Research International*. août 2011;44(7):1988-96.
 22. Cozinha da Matilde | Sabe o que é umbu-cajá? #frutinhasdobrasil - Cozinha da Matilde [Internet]. [cité 21 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.cozinhadamatilde.com.br/sabe-o-que-e-umbu-caja-frutinhasdobrasil/>
 23. De Lima, De Oliveira, De Brito. Extraction and characterization of the essential oils from *Spondias mombin* L. (Cajá), *Spondias purpurea* L. (Cirigüela) and *Spondia ssp* (Cajarana do sertão). *African Journal of Agricultural Research*. 2016;11(2):105-16.
 24. da Silva GA, de Brito NJN, dos Santos ECG, Lopes JA, das Graças Almeida M. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management* [Internet]. 2014 [cité 21 juill 2016];10(1). Disponible sur: <http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/2391>
 25. Santos GM. Caracterização de Frutos de Cajá (*Spondias mombim* L.) e Cajá-umbu (*Spondias spp.*) e Teores de NPK em Folhas e Frutos. Areia: UFPB/CCA. 1996;
 26. Silva S Gabriel Araújo. Avaliação da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antinoceptiva, antiinflamatória e toxicidade do extrato metanólico e frações de folhas de *Spondias sp.* (*Anacardiaceae*). *Biblioteca Digital Vêrsila* [Internet]. 2012 [cité 16 juill 2016]; Disponible sur: <http://biblioteca.versila.com/>

27. Freitas WE de S, Almeida MLB, Morais PLD de, Silva JR da. Different 'umbu-cajá' clones fruit quality. *Científica*. 8 juill 2015;43(3):236-40.
28. Ritzinger R, de Carvalho, Soares Filho. Evaluation of umbu-caja germplasm in the state of Bahia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2008;8:181-6.
29. Santos MB dos, Cardoso RL, Fonseca AA de O, Conceição M do N. Characterization and quality of umbu-caja fruits (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) proceeding from the Southern Reconcavo in Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*. déc 2010;32(4):1089-97.
30. Júnior L, De JS, Musser R dos S, Melo E de A, Maciel MIS, Lederman IE, et al. Physical and physico-chemical characterization of « cajá-umbu » fruits. *Food Science and Technology (Campinas)*. déc 2005;25(4):757-61.
31. Pedro AM, Ferreira MM. Simultaneously calibrating solids, sugars and acidity of tomato products using PLS2 and NIR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2007;595(1):221–227.
32. Gondim PJ, Silva S de M, Pereira WE, Dantas AL, Chaves Neto JR, Santos LF. Qualidade de frutos de acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.). *Rev Bras Eng Agríc Amb*. 2013;17:1217–1221.
33. Lima ED, Lima CA. Physical and chemical characterization on the fruits of umbu-cajazeira (*Spondias* spp) in five ripening stages, frozen pulp and nectar. *Rev Bras Fruti*. 2002;24(2):338-43.
34. Franco MRB, Shibamoto T. Volatile composition of some Brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araca-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(4):1263–1265.
35. Narain N, de Sousa Galvao M, Madruga MS. Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation. *Food Chemistry*. 2007;102(3):726–731.
36. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 2008;41(3):274–285.
37. Saura-Calixto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*. 2006;94(3):442–447.
38. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*. 1 sept 1997;30(6):609-15.
39. Almeida MMB, de Sousa PHM, Arriaga ÂMC, do Prado GM, Magalhães CE de C, Maia GA, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*. août 2011;44(7):2155-9.

40. Zielinski AAF, Ávila S, Ito V, Nogueira A, Wosiacki G, Haminiuk CWI. The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics: Characteristics of frozen fruit pulps. *Journal of Food Science*. avr 2014;79(4):C510-6.
41. Moreira ACCG, D& J, apos, Nascimento arc M, Andrade RAM de S, Maciel MIS, et al. Bioactive phytochemicals in fruits from genotypes of caja-umbuzeiras / Fitoquímicos bioativos em frutos de genótipos de caja-umbuzeiras. *Alimentos e Nutricao (Brazilian Journal of Food and Nutrition)*. 1 avr 2012;23(2):235-42.
42. Tiburski JH, Rosenthal A, Deliza R, de Oliveira Godoy RL, Pacheco S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*. août 2011;44(7):2326-31.
43. Silva RCO, Nascimento JDM, Curvêlo AC, Araújo CR, Lima V, Maciel MIS, et al. Atividade antioxidante de extratos das cascas desidratadas de frutos de cajá umbuzeiros. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO/JEPEX. 2010;
44. Ramalho SA, Gualberto NC, Neta MTSL, Batista RA, Araújo SM, da Silveira Moreira J de J, et al. Catechin and Epicatechin contents in wines obtained from Brazilian exotic tropical fruits. *Food and Nutrition Sciences* [Internet]. 2014 [cité 9 juill 2016];2014. Disponible sur: http://file.scirp.org/Html/2-2701142_43249.htm
45. Fruits et Légumes | Manger Bouger [Internet]. [cité 28 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.mangerbouger.fr/Les-9-reperes/Les-9-reperes-a-la-loupe/Fruits-et-Legumes>
46. Colindres RE, Hinderliter AL. 25 - Hypertension artérielle. In: *Médecine interne de Netter (Second edition)* [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2011 [cité 21 juill 2016]. p. 175-88. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294709517000256>
47. Anatomía de los vasos sanguíneos [Internet]. [cité 21 juill 2016]. Disponible sur: <http://es.dreamstime.com/fotos-de-archivo-libres-de-regalas-anatoma-de-los-vasos-sanguneos-image12908408>
48. Touyz RM, Mercure C, He Y, Javeshghani D, Yao G, Callera GE, et al. Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. *Hypertension*. 2005;45(4):530–537.
49. Féléto M, Busse R, Edwards G, Fleming I, Weston AH, Vanhoutte PM. Dialogue entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. *médecine/sciences*. déc 2003;19(12):1242-50.
50. III. FONCTIONS ENDOCRINES DU REIN - Néphrologie [Internet]. [cité 22 juill 2016]. Disponible sur: <http://cuen.fr/umvf/spip.php?rubrique234>
51. Schini-Kerth VB, Auger C, Kim J-H, Etienne-Selloum N, Chataigneau T. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflugers Arch*. mai 2010;459(6):853-62.
52. Dal-Ros S. Dysfonction endothéliale et pathologies cardiovasculaires: Rôle du stress oxydant et Effets protecteurs des Polyphénols végétaux [Internet] [Thèse de science -

- Pharmacologie]. [France]: Université de Strasbourg; 2009 [cité 22 juill 2016]. Disponible sur: http://scd-theses.u-strasbg.fr/1700/01/DAL_ROS_Stephanie_2009r.pdf
53. L'hypertension artérielle | Fédération Française de Cardiologie [Internet]. [cité 22 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.fedecardio.org/votre-coeur/maladies/lhypertension-arterielle>
 54. Colindres RE, Grossman SH. 26 - Hypertension artérielle secondaire à des maladies rénovasculaires. In: Médecine interne de Netter (Second edition) [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2011 [cité 21 juill 2016]. p. 189-94. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294709517000268>
 55. Colindres RE, Grossman SH. 27 - Hypertension artérielle secondaire à des maladies des glandes surrénales. In: Médecine interne de Netter (Second edition) [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2011 [cité 21 juill 2016]. p. 195-204. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978229470951700027X>
 56. GHO | By category | Cardiovascular diseases, deaths per 100 000 - Data by country [Internet]. WHO. [cité 21 juill 2016]. Disponible sur: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A865CARDIOVASCULAR?lang=en>
 57. Institute for Health Metrics and Evaluation. Brazil deaths data [Internet]. [cité 12 août 2017]. Disponible sur: <http://www.healthdata.org/brazil>
 58. Touyz R. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003;1:91-106.
 59. Tain Y, Baylis C. Dissecting the causes of oxidative stress in an in vivo model of hypertension. *Hypertension.* 2006;48:828-9.
 60. Vaziri N, Rodriguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006;2:582-93.
 61. Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège* [Internet]. oct 2007 [cité 26 juill 2016];62(10). Disponible sur: <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/8914>
 62. Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension role of the endothelium. *Hypertension.* 1999;33(6):1353–1358.
 63. Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, et al. Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol.* nov 2008;86(11):761-9.
 64. Bejma J, Ji LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology.* 1 juill 1999;87(1):465-70.
 65. Price DT, Vita JA, Keaney JF. Redox Control of Vascular Nitric Oxide Bioavailability. *Antioxidants & Redox Signaling.* 1 déc 2000;2(4):919-35.
 66. Zou M-H, Cohen RA, Ullrich V. Peroxynitrite and Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Endothelium.* 1 janv 2004;11(2):89-97.

67. Peroxynitrite and Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus - Endothelium - Volume 11, Issue 2 [Internet]. [cité 26 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10623320490482619#.V5bVTriLT4Y>
68. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* oct 2004;122(4):339-52.
69. Liu Y, Bubolz AH, Shi Y, Newman PJ, Newman DK, Gutterman DD. Peroxynitrite reduces the endothelium-derived hyperpolarizing factor component of coronary flow-mediated dilation in PECAM-1-knockout mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 1 janv 2006;290(1):R57-65.
70. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* févr 2008;31 Suppl 2:S170-180.
71. Mervaala E, Cheng Z, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Muller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten, D, Luft FC. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 37:414– 418, 2001. *Hypertension.* 2001;37:414-8.
72. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, Mc-Cann L, Fukai T, Holland SM, Mitch, WE. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111:1201–1209.
73. GRIENGLING KK. NADPH Oxidases: New Regulators of Old Functions. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1443-5.
74. Anilkumar N, Sirker A, Shah AM. Redox sensitive signaling pathways in cardiac remodeling, hypertrophy and failure. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:3168-87.
75. Classification des antihypertenseurs [Internet]. [cité 21 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.repere-medical.com/article-412.html>
76. El Harraqui R, Naima A, Yassamine B, Haddiya I. Stratégie de prise en charge de l'hypertension artérielle en hémodialyse chronique: un modèle appliqué d'éducation thérapeutique des patients (ETP). *Pan Afr Med J [Internet].* 25 sept 2014 [cité 21 juill 2016];19. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335281/>
77. Recommandations de la SFHTA » SFHTA [Internet]. [cité 21 juill 2016]. Disponible sur: http://www.sfhta.eu/?page_id=3404
78. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 1 déc 2003;42(6):1206-52.
79. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr.* 1 janv 2005;81(1):313S-316S.
80. Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr.* 1 janv 2005;81(1):284S-291S.

81. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 1 mai 2004;79(5):727-47.
82. Denardin CC, Hirsch GE, da Rocha RF, Vizzotto M, Henriques AT, Moreira JCF, et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of Food and Drug Analysis.* sept 2015;23(3):387-98.
83. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 1 janv 2005;81(1):230S-242S.
84. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr.* 1 août 2000;130(8):2073S-2085S.
85. St Leger A, Cochrane A. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet.* 1979;1(8124):1017-20.
86. Renaud S, Lorgeril de, Delaye. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(6 suppl):1360-7.
87. Tunstall Pedoe H, Uulasma A, et al. Contribution of trends in survival and coronary event rates to changes in coronary heart disease mortality : 10 year results from 37 WHO Monica Project populations. *Lancet.* 1999;353(154758).
88. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine.* 1996;20(7):933–956.
89. Teissedre P., Frankel E., Waterhouse A, German, Peleg. Inhibition of in Vitro Human LDL Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1996;70(1):55-61.
90. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science.* 1997;2(4):152–159.
91. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition.* 2005;81(1):215S–217S.
92. Spranger I, Sun B, Mateus AM, Freitas V de, Ricardo-da-Silva JM. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.* 15 mai 2008;108(2):519-32.
93. Amico V, Chillemi R, Mangiafico S, Spatafora C, Tringali C. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour Technol.* sept 2008;99(13):5960-6.
94. Monagas M, Hernández-Ledesma B, Garrido I, Martín-Alvarez PJ, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutr Cancer.* 2005;53(2):244-54.
95. Achat S. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques [Internet] [PhD]. Université d'Avignon; 2013 [cité 25 avr 2017]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00978529/document>

96. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem*. 28 janv 2004;52(2):255-60.
97. Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 24 sept 2002;106(13):1614-7.
98. Ribeiro TP, Oliveira AC, Mendes-Junior LG, França KC, Nakao LS, Schini-Kerth VB, et al. Cardiovascular effects induced by northeastern Brazilian red wine: Role of nitric oxide and redox sensitive pathways. *Journal of Functional Foods*. avr 2016;22:82-92.
99. Bernátová I, Pechánová O, Babál P, Kyselá S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;282(3):H942–H948.
100. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*. févr 2009;61(1):67-75.
101. Mukai Y, Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. janv 2011;22(1):16-21.
102. Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, et al. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 nov 2012;527(2):81-9.
103. Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, et al. Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 avr 2010;30(4):749-57.
104. Al-Awwadi NA, Araiz C, Bornet A, Delbosc S, Cristol J-P, Linck N, et al. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(1):151–157.
105. Ihm S-H, Lee J-O, Kim S-J, Seung K-B, Schini-Kerth VB, Chang K, et al. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis*. sept 2009;206(1):47-53.
106. Habauzit V, Morand C. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 1 mars 2012;3(2):87-106.
107. Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak M-H, et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular research*. 2006;71(4):794–802.

108. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem.* 1 août 2000;48(8):3597-604.
109. Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF. Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by the p38 MAPK in Response to Black Tea Polyphenols. *J Biol Chem.* 5 nov 2004;279(45):46637-43.
110. Ndiaye M. Red wine polyphenols-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *The FASEB Journal [Internet].* 13 déc 2004 [cité 9 juill 2016]; Disponible sur: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.04-2146fje>
111. Ma X, He D, Ru X, Chen Y, Cai Y, Bruce IC, et al. Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. *British Journal of Pharmacology.* 1 mai 2012;166(1):349-58.
112. Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology.* 1 mars 2002;135(6):1579-87.
113. Schmidt U, Kuhn U, Ploch M, Hübner WD. Efficacy of the Hawthorn (*Crataegus*) preparation LI 132 in 78 patients with chronic congestive heart failure defined as NYHA functional class II. *Phytomedicine.* juin 1994;1(1):17-24.
114. Matsuo S, Nakamura Y, Takahashi M, Ouchi Y, Hosoda K, Nozawa M, et al. Effect of red wine and ethanol on production of nitric oxide in healthy subjects. *American Journal of Cardiology.* 15 avr 2001;87(8):1029-31.
115. Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP. Tea consumption. relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev Med.* juill 1992;21(4):546-53.
116. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. *Nutrition Journal.* 2011;10:45.
117. Gale AM, Kaur R, Baker WL. Hemodynamic and electrocardiographic effects of açai berry in healthy volunteers: A randomized controlled trial. *International Journal of Cardiology.* 15 juin 2014;174(2):421-3.
118. Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. Tomatoes and Cardiovascular Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* janv 2003;43(1):1-18.
119. Taubert D. Effect of Cocoa and Tea Intake on Blood Pressure: A Meta-analysis. *Archives of Internal Medicine.* 9 avr 2007;167(7):626.
120. Taubert D. Chocolate and Blood Pressure in Elderly Individuals With Isolated Systolic Hypertension. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 27 août 2003;290(8):1029-30.
121. Ried K, Frank OR, Stocks NP, Fakler P, Sullivan T. Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders [Internet].* déc

2008 [cité 26 juill 2016];8(1). Disponible sur: <http://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2261-8-13>

122. T R, P R, TRasa1 c1, Peter L. Zocka1a2, Yvonne E. M. P. Zebregsa1, Neil R. Johnstona3, David J. Webba3 and Richard Draijje. Effect of polyphenol-rich grape seed extract on ambulatory blood pressure in subjects with pre- and stage I hypertension -. *British Journal of Nutrition* [Internet]. [cité 26 juill 2016]; Disponible sur: <http://journals.cambridge.org.docelec.univ-lyon1.fr/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=9089872&fileId=S000711451300161X>
123. Botden IPG, Draijer R, Westerhof BE, Rutten JHW, Langendonk JG, Sijbrands EJG, et al. Red wine polyphenols do not lower peripheral or central blood pressure in high normal blood pressure and hypertension. *Am J Hypertens*. 1 juin 2012;25(6):718-23.
124. Davinelli S, Scapagnini G. Polyphenols: a Promising Nutritional Approach to Prevent or Reduce the Progression of Prehypertension. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 26 avr 2016;
125. Wolak T, Paran E. Can carotenoids attenuate vascular aging? *Vascular Pharmacology*. sept 2013;59(3-4):63-6.
126. Palozza P, Simone R, Catalano A, Parrone N, Monego G, Ranelletti FO. Lycopene regulation of cholesterol synthesis and efflux in human macrophages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. oct 2011;22(10):971-8.
127. Nunes FC, Ribeiro TP, França-Silva MS, Medeiros IA, Braga VA. Superoxide scavenging in the rostral ventrolateral medulla blunts the pressor response to peripheral chemoreflex activation. *Brain Res*. 10 sept 2010;1351:141-9.
128. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 27 nov 1980;288(5789):373-6.
129. Sventek P, Li J-S, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL. Vascular Structure and Expression of Endothelin-1 Gene in L-NAME-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 1 janv 1996;27(1):49-55.
130. Paulis L, Zicha J, Kunes J, Hojna S, Behuliak M, Celec P, et al. Regression of L-NAME-Induced Hypertension: The Role of Nitric Oxide and Endothelium-Derived Constricting Factor. *Hypertens Res*. avr 2008;31(4):793-803.
131. Barros HR de M, Ferreira TAP de C, Genovese MI. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*. 15 oct 2012;134(4):1892-8.
132. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 15 déc 2008;111(4):816-23.
133. Commission on Isotopic Abundances and Atomic Weights [Internet]. [cité 27 déc 2016]. Disponible sur: <http://www.ciaaw.org/>
134. da Silva Siqueira EM, Félix-Silva J, de Araújo LML, Fernandes JM, Cabral B, Gomes JA dos S, et al. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds

- by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. *Biomed Chromatogr.* 1 oct 2016;30(10):1656-65.
135. Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology.* juill 2008;41(6):1060-6.
 136. Lin YC, Horvath SM. Autonomic nervous control of cardiac frequency in the exercise-trained rat. *Journal of Applied Physiology.* 1 déc 1972;33(6):796-9.
 137. Ayoka AO, Akomolafe RO, Iwalewa EO, Akanmu MA, Ukponmwan OE. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 16 janv 2006;103(2):166-75.
 138. Jaganath IB, Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Crozier A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research.* 1 janv 2006;40(10):1035-46.
 139. Serban M-C, Sahebkar A, Zanchetti A, Mikhailidis DP, Howard G, Antal D, et al. Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of the American Heart Association.* 1 juill 2016;5(7):e002713.
 140. Rietjens IMCM, Boersma MG, Haan L de, Spenkelink B, Awad HM, Cnubben NHP, et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* juill 2002;11(3-4):321-33.
 141. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):749-60.
 142. Jimenez R, Lopez-Sepulveda R, Romero M, Toral M, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F, et al. Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 12 févr 2015;6(2):409-14.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

BONNARD Ludovic

Umbu-cajá, un fruit régional brésilien du genre *Spondias* : caractérisation phytochimique et évaluation des effets cardiovasculaires chez le rat.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017

RESUME

La découverte de nouvelles molécules bioactives provenant de sources naturelles comme les végétaux impliquent de nombreux acteurs en recherche préclinique dont ceux de la recherche en pharmacognosie. Le genre *Spondias* comporte des espèces dont les fruits sont notamment étudiés pour leurs propriétés antioxydantes. Le fruit de l'espèce hybride *Spondias* sp. (« umbu-cajá »), et plus particulièrement son exocarpe n'ont jamais fait l'objet d'études dans la sphère cardiovasculaire. Au regard des études menées sur les autres fruits des espèces du genre *Spondias*, ce fruit pourrait présenter des effets biologiques prometteurs. Ainsi, ce projet mené au sein du laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire et Produits Naturels à João Pessoa de l'Université Fédérale de Paraíba (PB, Brésil) et poursuivi à l'Université Claude Bernard Lyon 1 (France) a pour but d'identifier les effets in vitro et in vivo provoqués par l'extrait hydro-méthanolique de l'exocarpe du fruit de *Spondias* sp.

Nous avons montré que la famille des molécules contenues dans la peau du fruit appartient aux composés polyphénoliques. Cette famille est caractérisée par un pouvoir antioxydant certain. Les expériences menées in vivo chez des rats ne montrent pas d'effet dose dépendant sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque. En revanche, nous avons observé sur des anneaux artériels ex vivo, un effet vasodilatateur concentration dépendant de l'extrait. Un autre modèle ex-vivo, obtenu à partir de coupes de micro-vaisseaux artériels, vient confirmer le rôle protecteur de l'Oxyde Nitrique vis à vis d'une situation de stress oxydant provoquée. Nous savons que cette situation est retrouvée dans l'hypertension artérielle, mécanisme dans lequel le nombre d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) croît significativement. Les effets antioxydants de l'extrait observé lors de l'analyse phytochimique se sont révélés contraires aux résultats obtenus ex vivo, mettant en évidence une augmentation des ROS et se manifestant de façon concentration dépendante. Ces résultats suggèrent que les composés polyphénoliques (flavonoïdes) de l'extrait impliquent plusieurs mécanismes physiologiques complexes qui pourraient être mis en évidence par des études pharmacologiques plus précises.

Outre ses propriétés pharmacologiques, cette espèce possède un intérêt économique non négligeable au niveau régional, favorisant notamment sa culture de façon extensive.

MOTS CLES

Spondias - Antioxydant - ROS - Oxyde Nitrique - Vasorelaxation

JURY

Mme DIJOUX-FRANCA Marie-Geneviève, Professeur

Mme MARCEL CHATELAIN Dominique, Maître de Conférences des Universités - HDR

M. MICHALET Serge, Maître de Conférences des Universités

Mme BERTRAM Delphine, Docteur en Pharmacie

M. TIXIER Julien, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE

Lundi 02 octobre 2017

ADRESSE DE L'AUTEUR

6, chemin des renavelles – 69850 Saint Martin en Haut