

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET  
DE FORMATION DOCTORALE,  
SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET  
ENVIRONNEMENT  
LABORATOIRE DE  
PHYTOPROTECTION ET DE  
VALORISATION DES RESSOURCES  
VEGETALES



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE,  
STUDIES IN LIFE HEALTH AND  
ENVIRONMENT SCIENCES  
LABORATORY OF  
PHYTOPROTECTION AND  
PLANT RESSOURCES  
VALORISATION

**Effets anti-inflammatoires des extraits et  
fractions polysaccharidiques des écorces de  
Khaya grandifoliola (Welw) C.D.C et des feuilles  
de Cryptolepis sanguinolenta (Lindl.) Schlechter**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Diplôme de  
Doctorat/Ph.D en Biochimie

Par : **MEDIESSE KENGNE Francine**  
Maître-es Sciences

Sous la direction de  
**MBACHAM FON Wilfred**  
Professeur, Université de Yaoundé I  
**BOUDJEKO Thaddée**  
Maître de conférences, Université de Yaoundé I

Année Académique : 2019



UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCE



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

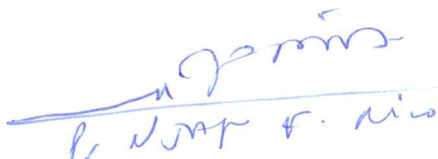
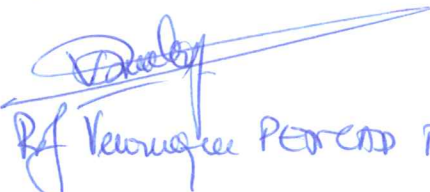
## ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE DE DOCTORAT/Ph.D

Nous soussignés : Professeur **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Professeur **PENLAP BENG Véronique** et Professeur **NJAYOU Frédéric Nico**, respectivement Président du jury et Examineurs de la Thèse de Doctorat/Ph.D de Madame **MEDIESSE KENGNE Francine**, Matricule **07R517**, préparée sous la direction du Professeur **BOUDJEKO Thaddée** et la supervision du professeur **MBACHAM FON Wilfred**, intitulée : « **Effets anti-inflammatoires des extraits et fractions polysaccharidiques des écorces de *Khaya grandifoliola (Welw) C.D.C* et des feuilles de *Cryptolepis sanguinolenta (Lindl.) Schlechter*** », soutenue le Mardi, 17 Décembre 2019 dans la salle de Conférences de l'annexe de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, en vue de l'obtention du diplôme de **Docteur/Ph.D en Biochimie, Option Biotechnologie et Développement**, attestons que toutes les corrections demandées par le Jury de soutenance ont été effectuées.

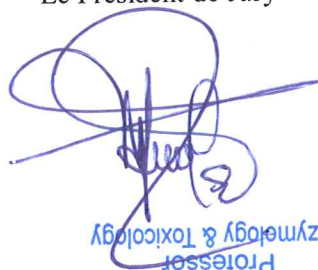
En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé le ..... **27 MAI 2020** .....

Examineurs


  
  
P. Penlap Beng Veronique  
P. Moundipa Fewou Paul

Le Président de Jury

  
Professor  
Enzymology & Toxicology  
**Paul F. MOUNDIPA**

Le Chef de Département

  
  
Professor  
Enzymology-Toxicology  
**Moundipa Fewou Paul D3C.D. Etat**

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b>  <b>Faculté des Sciences</b>  Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b>  <b>Faculty of Science</b>  Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>	<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>	

### LISTE PROTOCOLAIRE

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION : 15 Janvier 2020**

#### ADMINISTRATION

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : DONGO Etienne, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

<b>1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)</b>			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste

11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOU Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste
<b>2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)</b>			
1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/Uyi</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste

12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste
44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste
<b>3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)</b>			
1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste



7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
26	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
27	KABELONG BANAHO Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ, Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>

11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
<b>5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)</b>			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGFACK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UUI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste

17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
19	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
22	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
23	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
25	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
26	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
32	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste
<b>6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)</b>			
1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3	NDOUNAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
13	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
14	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste



17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
24	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
25	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
26	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
27	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
<b>7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)</b>			
1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste

30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste
<b>8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)</b>			
1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistante	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste
<b>9- DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (42)</b>			
1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
6	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
7	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
8	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
9	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
10	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
11	WOAFO Paul	Professeur	En poste
12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste

21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	<i>En poste</i>
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
40	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
41	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
42	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
<b>10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)</b>			
1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / Uds</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>

22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	DG/ART
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	Sec. D'Etat/MINMIDT
29	LAMILÉN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	Chef.cell / MINRESI
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

### Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (05)	3 (2)	<b>39 (16)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (13)</b>
BPV	06 (0)	10 (02)	9 (04)	07 (01)	<b>31 (9)</b>
CI	10 (1)	09 (02)	13 (02)	02 (0)	<b>34 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	03 (0)	<b>37(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	10 (02)	<b>27 (3)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (01)	<b>30 (2)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>17 (5)</b>
PHY	11 (0)	16 (01)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (4)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (04)	02 (0)	<b>43(6)</b>
<b>Total</b>	<b>68 (4)</b>	<b>99 (27)</b>	<b>132 (29)</b>	<b>46 (10)</b>	<b>344 (70)</b>

Soit un total de **344 (70)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (27)**
- Chargés de Cours **132 (29)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes



# Dédicace

*A mon fils **KENGNE FOKAM Tyrone Parfait***



## REMERCIEMENTS

Cette thèse est le résultat de plusieurs années de labeur, au cours desquelles j'ai toujours bénéficié des grâces et de la protection de Dieu Tout Puissant. Parvenu au terme de ce travail, j'exprime ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à sa réalisation, notamment :

Au Pr BOUDJEKO Thaddée, responsable du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales (LPVRV) du Centre de Biotechnologie (CBT) pour avoir initié ce travail de recherche. Professeur, je tiens à vous remercier pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'encadrement et le soutien dont j'ai bénéficié tout au long de ces années.

Au Pr MBACHAM FON Wilfred, Co-superviseur de cette thèse et responsable du Laboratoire de Biotechnologies de la Santé Publique du CBT que je remercie pour ses judicieux conseils scientifiques et sa contribution dans la réalisation de ce travail malgré ses multiples responsabilités. Je vous suis très reconnaissante et je vous réitère ici ma profonde gratitude.

Au Pr MBANYA Jean Claude, Directeur du CBT et les Doyens de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) et de l'Institut BITS (Birla Institute of Technology and Science)-Pilani (Campus d'Hyderabad, Inde), que je remercie pour m'avoir accueilli et offert un cadre adéquat dans leurs instituts respectifs pour la réalisation de ce travail.

Au Département de BIOCHIMIE pour les enseignements reçus tout au long de mon cursus universitaire, lesquels m'ont été d'une grande utilité lors de la réalisation de ce travail.

Au Pr YOGESHWARI PERUMAL, responsable du Laboratoire DDRL (Drug Discovery and Research Laboratory) du Département de Pharmacie de l'Institut BITS. Mes sincères gratitudes pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une partie de ces travaux au sein de son équipe, pour ses précieux conseils, son assistance méthodologique et sa confiance.

Au Pr ROSE LEKE, responsable du Laboratoire d'Immunologie du CBT, et son équipe ; particulièrement Dr KENJI OBADJA et Dr TASSI Samuel pour l'assistance méthodologique et le plateau technique mis à disposition lors des essais immunologiques au LUMINEX.

Au Pr ATOGHO Barbara et tout le personnel du Laboratoire de Métabolisme et Médecine Moléculaire du CBT pour nous avoir permis d'exploiter leurs installations durant l'extraction des polysaccharides des plantes d'intérêts.

Aux équipes des laboratoires LPVRV du CBT, Glyco-MEV (Glycobiologie et de la Matrice Extracellulaire Végétale) de l'Université de Rouen (France) et DDRL de BITS-Pilani,

respectivement pour la détermination de la composition monosaccharidique des extraits polysaccharides, la convivialité au Laboratoire et le travail accompli ensemble.

A mes camarades de promotion, Dr KEMEGNE Gislaine, Mme Liliane MEKUE Epse METEUMBA, M. GUEGUIM Cédric et Mme MALIEDJE Arielle pour leurs précieux conseils.

A mes parents M. KENGNE Michel et Mme TUETE Elisabeth pour leur amour, leur confiance, leur présence à mes côtés, leurs encouragements, et leurs soutiens multiformes.

A M. KENGNE FOKAM Steve Blondel, pour sa confiance, sa grande patience, ses encouragements, son amour et pour m'avoir soutenue tout au long de mes études universitaires. Trouve ici le couronnement de nos efforts.

A Maître FOTSO KAMGA Médard Parfait et son épouse BOUDJOM Christelle, M. FOTSO Flavien et M. FOKAM Flobert pour les efforts et sacrifices consentis à mon égard et avoir cru en moi. Trouvez ici la fierté des parents qui voient les efforts de leur enfant porter leurs fruits.

A Mes frères et sœurs, M. KENGNE Gaudry, Mme KENGNE Nadine épouse MPESSA, Mme PEWOUBE Madeleine épouse MADI, Mme KENGNE Nesmine et Mme KENGNE Hermance épouse EBOA pour leur soutien et leurs encouragements en toutes circonstances.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail et n'y sont pas nommément cités, recevez toute ma gratitude.

## FINANCEMENT

Le présent travail a bénéficié du financement :

- ◆ La bourse RTF-DCS (Research Training Fellowship for Developing Country Scientist) octroyée par le Centre NAM S&T (Centre for Science and Technology of the Non-Aligned and Other Developing Countries);
- ◆ La bourse *Research Grants programme in Basic science* octroyée par la TWAS (The World Academy of Sciences for advancement of science in developing countries);
- ◆ Le programme d'Assistance aux Doctorants (PAD) octroyé par l'honorable KOUINCHE Albert, député du Département du Koung-khi.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE PROTOCOLAIRE</b> .....	<b>i</b>
<b>DEDICACE</b> .....	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xii</b>
<b>FINANCEMENT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>xv</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>xx</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xxi</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>xxii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xxiv</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xxv</b>
<b>LISTE DES PHOTOS</b> .....	<b>xxviii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>xxviii</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>4</b>
I.1. L'INFLAMMATION .....	4
I.1.1. Généralités .....	4
I.1.1.1. Définition, étiologie et manifestations cliniques.....	4
I.1.1.2. Déroulement général de l'inflammation .....	4
I.1.2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation.....	7
I.1.2.1. Les cytokines.....	7
I.1.2.2. L'oxyde nitrique (NO) .....	9
I.1.2.3. Les radicaux libres .....	10
I.1.2.4. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.....	11
I.1.2.5. Régulateurs de l'inflammation .....	13
I.1.3. Notion de neuro-inflammation .....	13
I.1.4. Les lipopolysaccharides bactériens (LPS): Modèle d'étude de la(l') (neuro)inflammation .....	15
I.1.5. Implications pathologiques de l'inflammation .....	17

I.1.6. Thérapeutiques de l'inflammation .....	18
I.2. LES POLYSACCHARIDES VEGETAUX .....	19
I.2.1. Définition, classification et fonctions .....	19
I.2.2. Les hémicelluloses .....	20
I.2.3. Les pectines .....	21
I.2.4. Les arabinogalactanes .....	22
I.2.5. Activités biologiques des polysaccharides végétaux .....	22
I.2.6. Applications dans le domaine pharmaceutique .....	25
I.3. MONOGRAPHIE DES ESPECES VEGETALES ETUDIEES.....	25
I.3.1. <i>Khaya grandifoliola</i> (Welw) C.D.C.....	25
I.3.2. <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (Lindl.) Schlechter.....	29
I.4. METHODES UTILISEES POUR INDUIRE L'INFLAMMATION .....	33
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>35</b>
II.1. MATERIEL .....	35
II.1.1. Matériel végétal .....	35
II.1.2. Matériel biologique.....	35
II.1.2.1. Sang veineux.....	35
II.1.2.2. Lignées cellulaires.....	36
II.1.3. Matériel Animal.....	36
II.1.4. Matériel de laboratoire .....	37
II.2. METHODES.....	38
II.2.1. Préparation des extraits polysaccharidiques.....	38
II.2.1.1. Extraction des polysaccharides solubles totaux (PoS) .....	38
II.2.1.2. Extraction des polysaccharides pariétaux .....	38
II.2.2. Préparation des fractions polysaccharidiques solubles .....	40
II.2.2.1. Préparation de la fraction polysaccharidique de faible poids moléculaire .....	40
II.2.2.2. Préparation de la fraction polysaccharidique de haut poids moléculaire .....	41



II.2.3. Mesure de la teneur en protéines, en composés phénoliques et analyses des sucres solubles totaux .....	42
II.2.4. Détermination des propriétés antiradicalaires des extraits polysaccharidiques ....	48
II.2.4.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	48
II.2.4.2. Test de piégeage du radical ABTS.....	49
II.2.5. Mesure de la capacité immunomodulatoire des extraits polysaccharidiques.....	50
II.2.5.1. Isolement et Numération des PBMCs .....	50
II.2.5.2. Mesure de la viabilité cellulaire .....	51
II.2.5.3. Mesure de la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6 par les PBMCs.....	52
II.2.6. Mesure de la capacité antiprolifératives des fractions polysaccharidiques.....	54
II.2.7. Mesure de la capacité anti-inflammatoire des fractions polysaccharidiques .....	56
II.2.7.1. Test d'inhibition de la production de NO par les cellules Raw 264.7 stimulées par le LPS.....	56
II.2.7.2. Test d'inhibition de la production des ERO par les cellules U87 stimulées par le LPS .....	57
II.2.7.3. Test d'inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules U87 stimulées par LPS.....	59
II.2.7.4. Test d'inhibition de la toxicité des cellules U87 induite par le LPS.....	63
II.2.8. Evaluation <i>in vivo</i> des activités antalgiques des fractions polysaccharidiques .....	64
II.2.9. Evaluation <i>in vivo</i> des activités anti-inflammatoires : Modèle de la neuro-inflammation induite chez la souris BALB/c par LPS.....	64
II.2.9.1. Tests de neurotoxicité.....	64
II.2.9.2. Tests de Nociception .....	66
II.2.9.3. Mesure <i>in vivo</i> de la transcription des gènes IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ et NF- $\kappa$ B par qPCR.....	67
II.2.10. Analyses statistiques .....	67
<b>CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>69</b>
<b>III.1. RESULTATS .....</b>	<b>69</b>

III.1.1. Composition chimique, effets anti-radicalaires et immunomodulateurs des extraits polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> .....	69
III.1.1.1. Rendement d'extraction .....	69
III.1.1.2. Composition monosaccharidique des extraits polysaccharidiques .....	69
III.1.1.3. Teneurs en protéines et polyphénols totaux des extraits polysaccharidiques des deux plantes .....	71
III.1.1.4. Effets antiradicalaires DPPH et ABTS des extraits polysaccharidiques des deux plantes d'intérêts .....	72
III.1.1.5. Effet des extraits polysaccharidiques sur les PBMCs .....	75
III.1.5.1. Effet des extraits polysaccharidiques sur la viabilité cellulaire .....	75
III.1.5.2. Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des cytokines pro-inflammatoires .....	76
III.1.2. Effet inhibiteur de l'inflammation et de la cytotoxicité induites par LPS des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> .....	78
III.1.2.1. Analyse quantitative des sucres, protéines et polyphénols .....	78
III.1.2.2. Effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur l'activité des macrophages Raw 264.7 .....	79
III.2.2.1. Test de viabilité cellulaire au MTT .....	79
III.2.2.2. Effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur la production de NO .....	81
III.1.2.3. Effet des fractions polysaccharidiques sur l'activité des cellules U87 .....	83
III.1.2.3.1. Test de viabilité cellulaire au MTT .....	83
III.1.2.3.2. Effets des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur la production des ERO intracellulaires .....	85
III.1.2.3.3. Effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur la toxicité de LPS induite chez les cellules U87 .....	87
III.1.2.3.4. Effet des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> sur la transcription génique du facteur NF- $\kappa$ B, et des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6 .....	89

III.1.3. Effets antalgiques et anti-neuroinflammatoires <i>in vivo</i> des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> .....	91
III.3.1.1. Effets antalgiques <i>in vivo</i> des fractions polysaccharidiques .....	91
III.3.1.1.1. Effet des fractions polysaccharidiques sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique .....	91
III.3.1.1.2. Effet des fractions polysaccharidiques sur le nombre de tressaillements de la patte induits par le formol.....	92
III.3.1.2. Effets des fractions polysaccharidiques sur la neuro-inflammation induite par LPS chez les souris BALB/c .....	93
III.3.1.2.1. Influence des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> sur la performance, la coordination motrice et l'activité locomotrice .....	93
III.3.1.2.2. Activités antinociceptives des fractions polysaccharidiques .....	94
III.3.1.2.3. Effet des fractions polysaccharidiques sur la transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoires cérébraux .....	95
<b>III.2. DISCUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>108</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>110</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>xxix</b>

## RESUME

*Khaya grandifoliola* (Meliaceae) et *Cryptolepis sanguinolenta* (Apocynaceae) sont deux plantes de la pharmacopée camerounaise utilisées dans le traitement de plusieurs problèmes de santé parmi lesquels la fièvre, les céphalées, le paludisme et les désordres hépatiques. Plusieurs études menées sur les extraits bruts de ces plantes ont conduit à l'identification de métabolites secondaires bioactifs (grandifotane A, cryptolépine, etc...). Bien qu'étant extractibles par les procédés traditionnels, très peu d'études ont investigué le rôle des polysaccharides dans l'efficacité thérapeutique de ces plantes. Afin de poursuivre la valorisation de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta*, les activités anti-inflammatoires des extraits et fractions polysaccharidiques des écorces et des feuilles respectivement ont été évaluées *in vitro* en utilisant les cellules mononuclées PBMCs, les macrophages RAW 264.7 et les cellules gliales cancéreuses U87. L'extrait polysaccharidique total de *K. grandifoliola* (PoS<sub>KG</sub>) est riche en Glucose (30,53 %), Galactose (28,89 %) et Arabinose (17,51 %). Tandis que PoS<sub>CS</sub> est riche en Glucose (60,51 %), mais renferme de faibles teneurs d'Arabinose et de Galactose. Les pectines des deux plantes sont majoritairement de nature rhamnogalacturonane de type I et les hémicelluloses solubles des arabinoxylyanes ou xyloglucanes. PoS<sub>KG</sub> et PoS<sub>CS</sub> fortement complexés aux protéines et composés phénoliques respectivement, ont démontré de meilleures activités antiradicalaires ABTS et inhibitrices de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) par les PBMCs. Ils ont été ensuite délipidés, dépigmentés, fractionnés en faible (FKG et FCS) et haut (HKG et HCS) poids moléculaire et déprotéinés. Seules les fractions de *K. grandifoliola* (FKG et HKG) inhibent à partir de 10  $\mu\text{g/mL}$  la production intracellulaire des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) induite par LPS dans les cellules U87. De plus, FKG à 100  $\mu\text{g/mL}$  a démontré une activité plus élevée contre la production de l'Oxyde Nitrique (NO) induit par LPS (63,32 %) comparable à celle de l'aspirine 1  $\mu\text{M}$  (64,85 %) ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs, FKG (10  $\mu\text{g/mL}$ ) et HKG (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ont atténué l'effet toxique de LPS chez U87 tout en inhibant au niveau transcriptionnel l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et NF- $\kappa\text{B}$  ( $p < 0,001$ ). *In vivo*, ces fractions (100 mg/kg, a.o) atténuent la douleur induite par les stimuli chimiques et thermiques chez les souris BALB/c. En outre, FKG et HKG exercent des activités inhibitrices de la transcription des cytokines pro-inflammatoires cérébrales (IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) dépendante de l'inhibition de la voie de signalisation NF- $\kappa\text{B}$  induite par LPS.

**Mots clés :** Activités anti-inflammatoires, extraits et fractions polysaccharidiques, *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *in vitro* et *in vivo*

## ABSTRACT

*Khaya grandifoliola* (Meliaceae) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Apocynaceae) are two plants of the Cameroonian pharmacopoeia used in the treatment of several health problem such as fever, headaches, Malaria and liver disorders. Several studies conducted on the crude extracts of these plants led to the identification of bioactive secondary metabolites (grandifotan A, cryptolepin ...). Although extractable by traditional preparations, very few studies have investigated the role of polysaccharides in the therapeutic efficacy of these plants. In order to pursue the valorization of *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta*, anti-inflammatory activities of polysaccharide extracts and fractions of bark and leaves respectively were evaluated *in vitro* using PBMCs mononuclear cells, RAW 264.7 macrophages and U87 cancerous glial cells. Total polysaccharide extract of *K. grandifoliola* (PoS<sub>KG</sub>) mainly contains Glucose (30.53 %), Galactose (28.89 %) and Arabinose (17.51 %). While PoS<sub>CS</sub> is rich in Glucose (60.51 %) and contains low levels of Arabinose and Galactose. The pectins of both plants are mainly rhamnogalacturonan type I and hemicelluloses are arabinoxylans or xyloglucans. PoS<sub>KG</sub> and PoS<sub>CS</sub> highly complexed with proteins and phenolic compounds, have demonstrated the best ABTS antiradical activities and inhibitory activities of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokines production by PBMCs ( $p < 0.001$ ). They were subsequently délipidated, depigmented, fractionated in low (FKG and FCS) and high (HKG and HCS) molecular weight, and deproteinized. Only *K. grandifoliola* polysaccharide fractions (FKG and HKG) inhibit from 10  $\mu\text{g/mL}$  intracellular production of Reactive Oxygen Species (ROS) induced by LPS in U87 cells. Furthermore, FKG 100  $\mu\text{g/mL}$  showed a higher activity against Nitric Oxide (NO) production induced by LPS (63.32 %) comparable to 1  $\mu\text{M}$  aspirin activity (64.85 %) ( $p < 0.001$ ). Otherwise, FKG (10  $\mu\text{g/mL}$ ) and HKG (100  $\mu\text{g/mL}$ ) attenuated LPS-induced cell death in U87 while inhibiting at the transcriptional level the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa\text{B}$  ( $p < 0.001$ ). *In vivo*, oral administration of FKG and HKG to BALB/c mice at 100 mg/kg attenuate pain induced by chemical and thermal stimuli. In addition, FKG and HKG fractions demonstrated inhibitory activity of transcription of brain pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) genes dependent on inhibition of the NF- $\kappa\text{B}$  signaling pathway, induced by LPS.

**Key words:** Anti-inflammatory activities, polysaccharide extracts and fractions, *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *in vitro* and *in vivo*



## LISTE DES ABREVIATIONS

% Mol	: Pourcentage Molaire
<i>a.o</i>	: Administration orale
ADNc:	: Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire
ADNdb	: ADN double brin
ARN :	: Acide Ribo Nucléique
Asp	: Aspirine
BITS:	: <i>Birla Institute of Technology and Science</i>
BSA	: <i>Bovin Serum Albumin</i>
<i>C. sanguinolenta</i>	: <i>Cryptolepis sanguinolenta</i>
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
DCFH-DA:	: Dichloro-dihydro-fluorescéine diacétate
DDRL	: <i>Drug Discovery and Research Laboratory</i>
DEPC	: Diéthylpyrocarbonate
DK	: Diclofénac de potassium
DMEM	: <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO:	: Dimethyl sulphoxide
dNTP	: Désoxyribonucléotides triphosphate
EAG	: Equivalent acide gallique
EG	: Equivalent de Glucose
eqBSA/mg	: Equivalent BSA/mg de polysaccharide sec
ERO	: Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM	: Erreur Standard sur Moyenne
FBS	: <i>Fœtal Bovin Serum</i>
FCS	: Polysaccharides de faible poids moléculaire de <i>C. sanguinolenta</i>
FKG	: Polysaccharides de faible poids moléculaire de <i>K. grandifoliola</i>
GAPDH	: Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
HCS	: Polysaccharides de haut poids moléculaire de <i>C. sanguinolenta</i>
HemS	: Hémicelluloses solubles
HKG	: Polysaccharides de haut poids moléculaire de <i>K. grandifoliola</i>
HNC	: Herbier National du Cameroun
<i>i.p</i>	: Injection intrapéritonéale

IFR	: Intensité de Fluorescence Relative
IL	: Interleukine
<i>K. grandifoliola</i>	: <i>Khaya grandifoliola</i>
LPS	: Lipopolysaccharide
MEM:	: <i>Minimum Essential Medium</i>
MFI	: <i>Median Fluorescence Intensity</i>
MOR	: Morphine
MPE	: <i>Maximal Possible Effect</i>
MSP1	: <i>Merozoite Surface Protein 1</i>
MTT:	: Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NED	: N-(1-naphthyl)-éthylène diamine
NF-κB	: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PBMCs	: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS:	: <i>Phosphate Buffer saline</i>
Pec	: Pectines
PoS	: Polysaccharides solubles totaux
PoS <sub>KG</sub>	: Polysaccharides soluble totaux de <i>K. grandifoliola</i>
PoS <sub>KG</sub>	: Polysaccharides solubles totaux de <i>C. sanguinolenta</i>
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
Raw 264.7	: Macrophages de sang de souris
RI	: Réaction Inflammatoire
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTE	: <i>Reverse Transcriptase Enhancer</i>
RT-PCR:	: <i>Reverse Transcriptase PCR</i>
<i>s.c</i>	: Sous-cutanée
SFR Cam	: Société Forestière du Cameroun
SNC	: Système Nerveux Central
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TWAS	: <i>The World Academy of Sciences</i>
U87	: <i>Uppsala Malignant glioma 87</i>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Exemples de maladies liées à l'inflammation .....	17
<b>Tableau II :</b> Activités biologiques des extraits polysaccharidiques de quelques plantes médicinales .....	23
<b>Tableau III :</b> Quelques utilisations de <i>Khaya grandifoliola</i> en médecine traditionnelle. ....	27
<b>Tableau IV :</b> Utilisations traditionnelles de <i>C. sanguinolenta</i> .....	31
<b>Tableau V :</b> Méthodes d'évaluation des activités anti-inflammatoire <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	34
<b>Tableau VI :</b> Temps de rétention des glycosides de méthyle correspondants aux oses standards rencontrés dans la paroi des végétaux. ....	47
<b>Tableau VII :</b> Caractéristiques des séquences d'amorces utilisées pour évaluer la transcription des gènes IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B et GAPDH .....	63
<b>Tableau VIII :</b> Rendement d'extraction en pourcentages des extraits polysaccharidiques par rapport à la masse sèche d'écorces ou de feuilles.....	69
<b>Tableau IX :</b> Effet inhibiteur des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> de la production de NO par les macrophages RAW 264.7 induite par LPS.....	83
<b>Tableau X :</b> CI50 des différentes fractions polysaccharidiques. ....	85
<b>Tableau XI :</b> Effet des fractions polysaccharidiques de faible et haut poids moléculaire de <i>K. grandifoliola</i> sur la performance et coordination motrice utilisant le <i>Rota-rod</i> .	93
<b>Tableau XII :</b> Effet des fractions polysaccharidiques de faible et haut poids moléculaire de <i>K. grandifoliola</i> sur l'activité locomotrice utilisant l' <i>Actophotometer</i> . ....	93

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Schéma récapitulatif de la réponse inflammatoire.....	6
<b>Figure 2</b> : Effets locaux et systémiques des cytokines pro inflammatoires produites par les macrophages .....	9
<b>Figure 3</b> : Origine des différentes Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) impliquées en biologie.....	11
<b>Figure 4</b> : Voies canonique et alternative de l'activation de NF- $\kappa$ B (Toby, 2009) .....	12
<b>Figure 5</b> : Thérapies ciblées sur NF- $\kappa$ B dans les maladies inflammatoires. ....	13
<b>Figure 6</b> : Signalisation intracellulaire induite par LPS (Ref) .....	17
<b>Figure 7</b> : Structure d'un arabinoxylane (A) et d'un xylane acide (B) .....	20
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique d'un modèle de la structure de base des pectines ....	21
<b>Figure 9</b> : Etapes d'extraction des polysaccharides solubles totaux (PoS) .....	38
<b>Figure 10</b> : Etapes d'extraction de la paroi cellulaire.....	39
<b>Figure 11</b> : Etapes d'extraction séquentielle des pectines (Pec) et hémicelluloses solubles (HemS) .....	40
<b>Figure 12</b> : Etapes d'extraction des polysaccharides de faible poids moléculaire .....	41
<b>Figure 13</b> : Etapes d'extraction des polysaccharides de haut poids moléculaire.....	42
<b>Figure 14</b> : Chromatogramme standard des oses majoritaires de la paroi végétale.....	47
<b>Figure 15</b> : Isolement des PBMCs par la technique de séparation par gradient de densité utilisant le Ficoll .....	50
<b>Figure 16</b> : Principe de la détection et quantification des cytokines par Luminex.....	53
<b>Figure 17</b> : Principe de la PCR quantitative utilisant le colorant <i>SYBR Green</i> .....	61
<b>Figure 18</b> : Composition en monosaccharide (% molaire) des extraits polysaccharidiques des écorces de <i>K. grandifoliola</i> (A) et des feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> (B) après analyse par CPG.....	70
<b>Figure 19</b> : Teneurs en protéines des polysaccharides hydrosolubles totaux (PoS), pectiques (Pec) et hémicellulosiques solubles (HemS) isolés des écorces de <i>K. grandifoliola</i> et des feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> . ....	71
<b>Figure 20</b> : Teneurs en composés phénoliques des polysaccharides hydrosolubles totaux (PoS), pectiques (Pec) et hémicellulosiques solubles (HemS) isolés des écorces de <i>K. grandifoliola</i> et des feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> .....	72

<b>Figure 21</b> : Activités antiradicalaires DPPH des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques des écorces de <i>K. grandifoliola</i> (A) et des feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> (B). .....	73
<b>Figure 22</b> : Activités antiradicalaires ABTS des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques des écorces de <i>K. grandifoliola</i> (A) et des feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> (B). .....	74
<b>Figure 23</b> : Effet stimulateur de la prolifération des cellules mononuclées PBMCs par les extraits polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> , de MSP1 et de PHA. ....	75
<b>Figure 24</b> : Effet inhibiteur des extraits polysaccharidiques, de PHA et de MSP1 de la production des cytokines pro-inflammatoires par les PBMCs; (A)- Production d'IL-6, (B)- Production de TNF- $\alpha$ , (C)- Production d'IL-1 $\beta$ . ....	77
<b>Figure 25</b> : Effet des extraits polysaccharidiques, des témoins positifs MSP1 et PHA sur la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ par les PBMCs. ....	78
<b>Figure 26</b> : Teneurs en sucres, protéines et composés phénoliques totaux des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> . ....	79
<b>Figure 27</b> : Effet inhibiteur de la viabilité des des macrophages Raw 264.7 par les fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> . ....	80
<b>Figure 28</b> : Effet inhibiteur de la viabilité des macrophages Raw 264.7 par la co-exposition à LPS et aux fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> . ....	81
<b>Figure 29</b> : Inhibition de la production de NO induite par LPS par l'aspirine (Asp) et les fractions polysaccharidiques des écorces de <i>K. grandifoliola</i> et des feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> . (A) & (B) : faible (FKG) et haut (HKG) PM de <i>K. grandifoliola</i> ; (C) & (D) : faible (FCS) et haut (HCS) PM de <i>C. sanguinolenta</i> . ....	82
<b>Figure 30</b> : Cytotoxicité des fractions polysaccharidiques des écorces de <i>K. grandifoliola</i> et feuilles de <i>C. sanguinolenta</i> sur les lignées cellulaires U87 (A), IMR 32 (B), A549 (C) et MDA-MB 231 (D). ....	84
<b>Figure 31</b> : Production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) par les cellules U87 mesurée par le DCFH induit par le LPS ajouté dans le milieu de culture. ....	86
<b>Figure 32</b> : Cytotoxicité de LPS sur les cellules U87 évaluée par le test MTT .....	87



<b>Figure 33</b> : Effet inhibiteur du Diclofénac de potassium et des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> et <i>C. sanguinolenta</i> de la mort cellulaire induite par LPS.....	88
<b>Figure 34</b> : Effet du prétraitement des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> sur la transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoires NF- $\kappa$ B (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$ (C) et TNF- $\alpha$ (D), induite par 100 $\mu$ g/mL de LPS.....	90
<b>Figure 35</b> : Effet inhibiteur des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> du nombre de crampes abdominales induites par injection ( <i>i.p</i> ) d'acide acétique 2 % chez les souris BALB/ <i>c</i> . .....	91
<b>Figure 36</b> : Effet inhibiteur des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> du nombre de lèchements/tressaillements de patte ou sauts induits par le formol chez les souris BALB/ <i>c</i> .....	92
<b>Figure 37</b> : Effet stimulateur des fractions polysaccharidiques du seuil de résistance à la douleur induite par LPS par le test de la plaque chauffante (A) et le test d'immersion de la queue (B). .....	95
<b>Figure 38</b> : Effet des fractions polysaccharidiques de <i>K. grandifoliola</i> sur la transcription génique des médiateurs pro-inflammatoires cérébraux IL-6 (A), IL-1 $\beta$ (B), NF- $\kappa$ B (C) et TNF- $\alpha$ (D) induite par LPS chez les souris BALB/ <i>c</i> . .....	96

## LISTE DES PHOTOS

<b>Photo 1</b> : <i>Khaya grandifoliola</i> . (A) : Aperçu tronc d'arbre , (B):Feuilles et fruits .....	26
<b>Photo 2</b> : Feuilles et Fleurs de <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> .....	30
<b>Photo 3</b> : Ecorces de <i>Khaya grandifoliola</i> (a) et feuilles de <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (b) récoltées et mises à sécher. ....	35
<b>Photo 4</b> : Exemple de lot de souris de l'étude.....	36
<b>Photo 5</b> : Hématimètre de Neubauer .....	52
<b>Photo 6</b> : Représentation de l'essai utilisant l'appareillage <i>Rota Rod</i> .....	65
<b>Photo 7</b> : Représentation de l'essai utilisant l'appareillage <i>Actophotometer</i> .....	66

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1</b> : Préparation des solutions .....	xxix
<b>Annexe 2</b> : Culture cellulaire .....	xxx
<b>Annexe 3</b> : Chromatogramme des sucres présents dans les extraits polysaccharidiques des deux plantes.....	xxxii
<b>Annexe 4</b> : Tableaux récapitulatifs de la composition en ose, teneurs en protéines et composés phénoliques des extraits polysaccharidiques des deux plantes.....	xxxv
<b>Annexe 5</b> : Tableau récapitulatif des activités anti-radicalaires des extraits des deux plantes d'intérêts .....	xxxvi
<b>Annexe 6</b> : Tableau récapitulatif des pourcentages d'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires par les fractions polysaccharidiques des deux plantes .....	xxxvii
<b>Annexe 7</b> : Design de la plaque d'analyse LUMINEX .....	xxxviii
<b>Annexe 8</b> : Clairance éthique obtenue du Comité National d'Ethique du Cameroun.....	xxxix
<b>Annexe 9</b> : Consentement éclairé version française.....	xl
<b>Annexe 10</b> : Consentement éclairé version anglaise .....	xliv
<b>Annexe 11</b> : Origines des lignées cellulaires utilisées.....	xlviii
<b>Annexe 12</b> : Liste des Publications issues de la thèse .....	xlix

# *Introduction*

## INTRODUCTION

L'inflammation est la première réaction de défense de l'organisme en réponse à toute agression d'origine endogène ou exogène (Nathan, 2002 ; Barton, 2008). C'est un processus complexe déclenché par la reconnaissance du signal de danger (molécules antigéniques des microorganismes ou des cellules nécrosées) par les cellules immunitaires à l'instar des macrophages jouant un rôle clé. Ces dernières synthétisent de nombreux médiateurs chimiques qui activent une cascade de réaction aboutissant à l'élimination de l'agent agresseur et la réparation du tissu endommagé (Nathan, 2002 ; Barton, 2008). Parmi les plus importants, figurent les cytokines dites « pro-inflammatoires » tels que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- $\alpha$  et les Interleukines (IL)-1 et IL-6. En effet, cette triade cytokinique par action sur les cellules immunitaires entraîne la production des molécules cytotoxiques (les protéases, les Espèces Réactives de l'Oxygène [ERO], l'Oxyde Nitrique [NO]) qui attaquent et détruisent directement le pathogène. De plus, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 sont responsables des signes cliniques inflammatoires locaux (douleur, chaleur, œdème et rougeur) et généraux (fièvre, somnolence et anorexie), respectivement par action sur les vaisseaux sanguins et sur le Système Nerveux Central (SNC) (Schwartz, 2011).

La réaction inflammatoire (RI) est protectrice et essentielle, lorsqu'elle est contrôlée par par les systèmes de défense antioxydante et anti-inflammatoire de l'organisme afin de permettre la régulation du processus inflammatoire et le retour à l'homéostasie tissulaire. Toutefois, la RI non seulement entraîne un inconfort lié à la douleur et à l'œdème occasionnés, mais peut devenir chronique. L'inflammation dite « chronique » survient en cas d'agressivité de l'agent pathogène (ou de la sévérité du trauma) ou de persistance du siège inflammatoire (Weill et Batteux, 2003). Elle peut également être causée par des anomalies dans la régulation du processus inflammatoire (déséquilibre de la balance pro-inflammatoires/ anti-inflammatoires ; stress oxydatif) ou par anomalies quantitatives et qualitatives des cellules intervenant dans l'inflammation (Schwartz, 2011). L'inflammation est ainsi impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies tant infectieuses (paludisme, hépatite C, tuberculose...) que systémiques (cancers, obésité/diabète de type II...) (Nathan, 2002).

Les modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* des processus inflammatoires établis nécessitent de nombreux inducteurs dont l'un des plus utilisés est le Lipopolysaccharide Bactérien (LPS). Le LPS est une endotoxine pyrogène de la paroi des bactéries à Gram négatif, dont la libération dans la circulation sanguine lors d'une infection, puis la fixation au «*Toll-like receptors* » (TLR4) déclenche une multitude de signaux intracellulaires aboutissant à l'activation du facteur

nucléaire Kappa B (NF- $\kappa$ B) qui régule l'expression des gènes cibles qui codent pour les cytokines pro-inflammatoires. La surstimulation des récepteurs peut conduire à une inflammation générale incontrôlée et éventuellement à une septicémie (**Tamara et al., 2013 ; Sali, 2014**). En outre, le LPS est un activateur de la neuro-inflammation chronique et de la neurodégénération progressive. En effet, les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 jouent un rôle clé dans la communication neuro-immune via l'augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE), la propagation du signal inflammatoire, puis l'activation des cellules immunitaires innées du SNC (cellules gliales) (**Block, 2014**). Les cellules gliales (astrocytes et microglies) activées produisent encore plus de médiateurs pro-inflammatoires et cytotoxiques contribuant ainsi au processus neuroinflammatoire (**Moss et Bate, 2001; Liu et al., 2002; Block, 2014**) impliqué dans diverses pathologies du SNC incluant l'inflammation cérébrale, les traumatismes, les infections cérébrales (paludisme cérébral), les tumeurs cérébrales et les troubles neurodégénératifs (les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, et les multiples scléroses) (**Schwartz, 2011; Mimche et al., 2011**).

Les traitements anti-inflammatoires sont utilisés en complément aux traitements spécifiques à chaque cas de maladie afin de soulager la douleur et inhiber les processus inflammatoires chroniques (**Néant, 2017**). Néanmoins, les plus utilisées en automédication ou sous ordonnance sont les anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que l'aspirine et le diclofénac pour leurs effets antalgiques et antipyrétiques associés. Cependant, au regard d'une part de la recrudescence des pathologies inflammatoires et d'autre part des effets nocifs de ces médicaments sur la santé humaine (hypertension, insuffisance rénale, ulcères gastro-intestinaux etc...), il est nécessaire d'opter pour la recherche de nouveaux composés bioactifs ou de nouvelles combinaisons capables de booster l'efficacité des médicaments existants (**Schwartz, 2011 ; Grandin, 2013**). La phytothérapie est ainsi une source de molécules bioactives naturelles pouvant être utilisées pour le traitement des maladies inflammatoires (**OMS, 2002 ; Kuete et Efferth, 2010**).

Les polysaccharides sont des macromolécules complexes jouant un rôle important dans la croissance, le développement et les mécanismes de défense des plantes. Ils ont été identifiés comme ingrédients actifs de nombreuses préparations traditionnelles (**Xiaojuan et al., 2012**). En effet, les polysaccharides isolés des plantes médicinales présentent un large spectre d'action biologiques (immunomodulateurs, anti-inflammatoires, antioxydants, antimicrobiens, antiviraux, anticancéreux, cardioprotecteurs...) et une toxicité relativement faible (**Min-Bo lan et al., 2010 ; Zhang et al., 2013 ; Mediesse et al., 2014 ; Jiao et al., 2014b ; Boudjeko et al.,**

2015). Parmi les plantes sources de composés prometteurs, *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) et *Cryptolepis sanguinolenta* (Apocynaceae) sont utilisées en médecine traditionnelle au Cameroun et dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest pour le traitement de la fièvre, des céphalées et de nombreuses maladies (le paludisme, l'ulcère gastrique, le rhumatisme, la jaunisse, les hépatites, les infections intestinales etc...) (Moundipa *et al.*, 2002 ; Olowokudejo *et al.*, 2008, Osafo *et al.*, 2017). De nombreuses études ont mis en exergue les propriétés biologiques des polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes et limonoïdes de ces plantes, justifiant ainsi leur utilisation thérapeutique (Owona, 2015 ; Njayou *et al.*, 2016 ; Pal et Katiyar, 2016). Cependant, bien que les polysaccharides soient des molécules hydrosolubles et potentiellement présentes dans les préparations traditionnelles (décoctés et infusions), à notre connaissance les effets immunomodulateurs, antioxydants et anti-inflammatoires des polysaccharides isolés de ces plantes n'ont pas été étudiés.

#### ◆ Hypothèse de Recherche

Les polysaccharides de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta* ne possèdent pas d'activités anti-inflammatoires, ne contribuant pas ainsi au traitement traditionnel des pathologies inflammatoires.

#### ◆ Objectif Général

L'objectif général de ce travail a été d'étudier *in vitro* et *in vivo* les propriétés anti-inflammatoires des extraits et fractions polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta*.

#### ◆ Objectif Général

Plus spécifiquement, il s'est agi de :

- 1) Déterminer la composition chimique et les propriétés antiradicalaires et immunomodulateurs des extraits polysaccharidiques des deux plantes ;
- 2) Déterminer *in vitro* l'effet des fractions polysaccharidiques sur la production des médiateurs de l'inflammation par les macrophages RAW 264.7 et cellules gliales cancéreuses U87 stimulées par le LPS;
- 3) Déterminer *in vivo* l'effet des fractions polysaccharidiques d'intérêts sur la douleur et la neuro-inflammation induite chez les souris BALB/c par le LPS.

*Chapitre I :*  
*Revue de la Littérature*



## **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

### **I.1. L'INFLAMMATION**

#### **I.1.1. Généralités**

##### **I.1.1.1. Définition, étiologie et manifestations cliniques**

La réponse immunitaire regroupe un ensemble de processus et de mécanismes de défense mis en œuvre pour lutter contre l'attaque par les éléments étrangers (microorganismes, agents physiques [chaleur, froid ou rayons UV, X] ou chimiques [toxines, venins], trauma [blessures, piqûres], cellules tumorales ou endommagées). L'agent agresseur entraîne en général une destruction tissulaire ou cellulaire, formant le signal d'appel de la réaction du système immunitaire. Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense de l'organisme. La réponse qu'il fournit est immédiate, non spécifique et invariante, fait partie d'un système régulé de manière complexe et ne confère pas de mémoire à l'organisme (**Schwartz, 2011**). La Réaction inflammatoire (RI) est la base de cette réponse et consiste au recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Barton, 2008**). Le système immunitaire adaptatif intervient en seconde ligne. La réponse apportée est plus spécifique et intervient après une période de latence. Ce système également très régulé, confère à l'organisme une mémoire. Bien que la RI implique majoritairement le système immunitaire inné, elle reste étroitement liée à la mise en place et au déroulement de la réponse du système immunitaire adaptatif.

La RI est responsable de phénomènes locaux caractérisés par quatre signes cardinaux : la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. Mais elle peut aussi entraîner de multiples effets biologiques et cliniques généraux (altération de l'état général, associant une asthénie, une anorexie, un amaigrissement, une fièvre, des troubles du sommeil et une cachexie avec fonte musculaire) d'intensité plus importante en cas de persistance de la RI (**Schwartz, 2011**).

##### **I.1.1.2. Déroulement général de l'inflammation**

Classiquement, l'inflammation dite « aigüe » se déroule en trois grandes étapes quel que soit le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé (Figure 1) (**Dorward et al., 2012**).

###### **I.1.1.2.1. Phase d'initiation : activation des cellules résidentes au niveau du tissu lésé pour recruter des patrouilles circulantes**

Cette phase s'établit suite à la reconnaissance de l'agent étranger par les cellules résidentes grâce à des récepteurs, et est caractérisée par une vasoconstriction artériolaire de type réflexe

très brève (quelques secondes). Cette dernière résulte de l'action du système sympathique qui est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération de facteurs histamine, sérotonine et kinine; et l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux. Cette constriction va également induire l'activation et l'agrégation plaquettaire entraînant le colmatage des brèches afin de limiter l'intégration de l'agent pathogène dans l'organisme. Très vite à cette vasoconstriction va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée entraînant l'extravasation des cellules sanguines par diapédèse, responsable de la chaleur et de la rougeur. La migration de ces cellules s'accompagne d'un transfert de plasma dans le tissu qui crée l'œdème (**Dorward et al., 2012**).

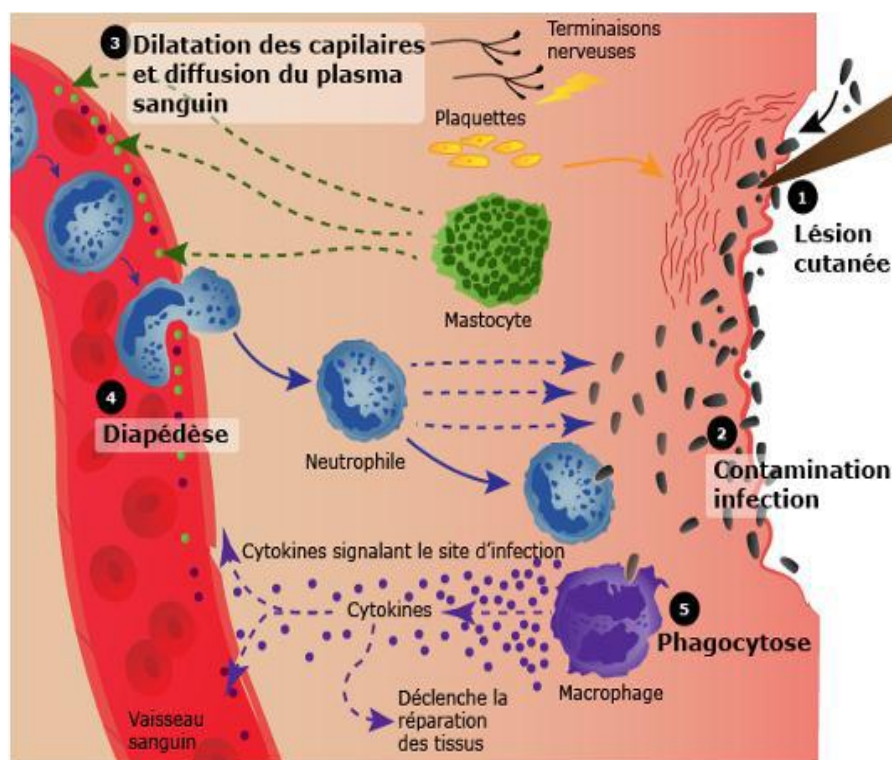
### **I.1.1.2.2. Phase d'amplification : arrivée des patrouilles circulantes et activation des cellules au niveau du tissu lésé**

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place ( $\approx 6$  h) sont les polynucléaires principalement les neutrophiles (PNNs) qui seront remplacés sur le site inflammatoire progressivement par les monocytes. L'afflux des cellules, fait que celles-ci vont se marginaliser sur le site de l'agression en environ 30 min. Les neutrophiles adhèrent aux cellules endothéliales et traversent la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants tel que l'Interleukine IL-8. Ces cellules vont léser les éléments ingérés par dégranulation des composants internes à savoir la sécrétion des protéases (élastase et collagénase) et la libération des radicaux libres. Les PNNs vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y'a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme). Dans ce type de situation, la réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages dont le pouvoir phagocytaire est important ont pour fonction d'assurer la détersion. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (**Callahan et al., 2014**).

### **I.1.1.2.3. Phase de résolution et de réparation tissulaire**

Cette phase dépend du degré de lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PNNs et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors produire des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste premièrement en la réparation

de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes. Ces cellules peuvent produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Ces derniers vont participer à l'angiogénèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. A la fin, le système de l'angiogénèse est remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill et Batteux, 2003).



**Figure 1** : Schéma récapitulatif de la réponse inflammatoire.

1. Les pathogènes entrent par la blessure.
2. Les plaquettes relâchent des protéines qui favorisent la coagulation.
3. Les mastocytes sécrètent des facteurs qui favorisent la vasodilatation. Il y'a une augmentation dans l'apport de sang et plasma vers la blessure.
4. Les macrophages produisent des cytokines pour promouvoir le recrutement d'autres cellules effectrices.
5. Les neutrophiles sont recrutés, puis les neutrophiles et macrophages détruisent le pathogène.

L'inflammation aiguë guérie spontanément ou avec un traitement sans aucune séquelle fonctionnelle ou anatomique. Cependant, en absence d'une résolution, elle peut donner lieu à une inflammation dite « chronique » (Weill et Batteux, 2003).

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, elle peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois et années). La RI chronique est

considérée comme être causée par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise (**Schwartz, 2011**). Les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent le fibroblaste pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour la libération d'autres médiateurs responsables des réponses inflammatoires. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettront leur transmigration dans le compartiment extravasculaire. A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculo-exudative et cellulaire ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé. Elle peut également être retrouvée si l'organisme n'est pas en mesure de répondre à cause de maladies intercurrentes (**Dorward et al., 2012**).

### I.1.2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation

Les médiateurs inflammatoires peuvent être classés selon leur origine, notamment les médiateurs exogènes (endotoxines bactériennes : lipopolysaccharide [LPS]) ou endogènes d'origine cellulaire (prostaglandines, leucotriènes, histamine, facteur d'activation des plaquettes, cytokines, radicaux libres, oxyde nitrique) ou d'origine plasmatique (produits des systèmes du complément, de la coagulation et kinines) (**Rankin, 2004**).

#### I.1.2.1. Les cytokines

Les cytokines (du grec « cyto », cellule et « kinos », mouvement) sont des facteurs solubles peptidiques (8 à 50 kDa) synthétisés et libérés par les cellules mononuclées (lymphocytes [lymphokines] et macrophages [monokines]). Ce sont des médiateurs de la communication intercellulaire, qui agissent à faible concentration, généralement localement par action autocrine et paracrine grâce à la fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité. En fonction de leurs rôles et de la nature de leur cible, il s'agit :

- Des cytokines intervenant dans l'immunité innée : TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , $\beta$ , IL-1 et IL-6, IL-12 ;
- Des cytokines intervenant dans l'immunité adaptative et qui régulent la croissance, la différenciation et l'activation des lymphocytes : IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 ;
- Des cytokines qui stimulent l'hématopoïèse, la croissance et la différenciation des leucocytes par les « *colony stimulating factors* » (CSF), tels qu'IL-7.

- Des chimiokines qui jouent un rôle dans le chimiotactisme et l'activation des leucocytes à l'exemple de l'IL-8 puissant agent chimiotactique des neutrophiles, monocytes et macrophages, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des ERO et intervient dans la réparation tissulaire.

Les cytokines majoritairement responsables des effets locaux et systémiques de l'inflammation sont l'IL-1, IL-6 et TNF  $\alpha$  (Figure 2).

### **I.1.2.1.1. L'IL-1**

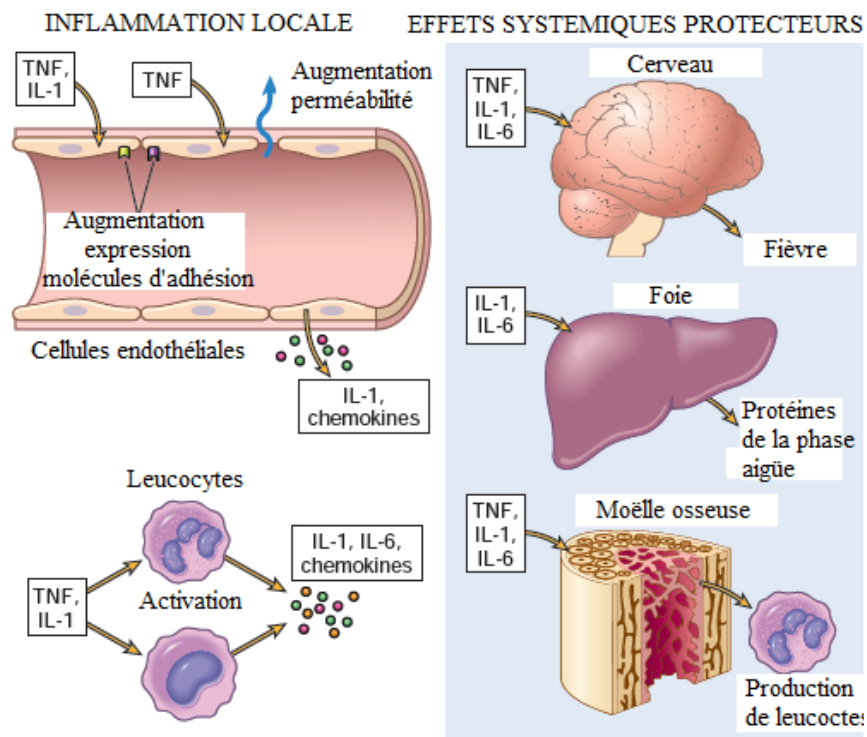
La superfamille des IL-1 est produite par un grand nombre de cellules, principalement les macrophages, les kératinocytes, les fibroblastes et les lymphocytes B. Cette famille est subdivisée en plusieurs classes parmi lesquelles l'IL-1  $\beta$ , qui est généralement produite par les cellules de la lignée myéloïde. Si la production d'IL-1 est parfois spontanée, la plupart du temps elle est stimulée par les micro-organismes, les virus, les particules (microcristaux) ou les lésions cellulaires. Cette famille de cytokine existe sous forme immature « Pro-IL-1 » dans les cellules et une cascade d'évènements est déclenchée et conduit à la libération de la forme active de l'IL-1. Contrairement à la plupart des autres cytokines, l'IL-1 peut être stockée dans la cellule et son action peut donc être immédiate. Localement, l'IL-1 agit en se fixant sur son récepteur (IL-1R) présent à la surface des cellules cibles (macrophages, lymphocytes) provoque une augmentation de l'adhérence des leucocytes par action sur les cellules endothéliales, la synthèse de l'IL-6 et stimule l'hématopoïèse. Son action systémique s'étend sur le système nerveux central (fièvre, fatigue, somnolence et anorexie), sur les hépatocytes (synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation) et sur les ostéoclastes (augmentation de la résorption osseuse).

### **I.1.2.1.2. Le TNF- $\alpha$**

Le TNF- $\alpha$  est la première cytokine libérée lors de la RI par les macrophages sous l'influence de divers stimuli (produits bactériens, viraux). Localement, le 1<sup>er</sup> rôle du TNF- $\alpha$  est d'attirer les globules blancs sur le lieu de l'infection en stimulant la production de chimiokines ; et induisant l'augmentation du flux sanguin, la perméabilité vasculaire et l'expression des molécules d'adhérence (fixation des leucocytes et plaquettes à l'endothélium). De plus, cette cytokine stimule la synthèse d'IL-1 et d'IL-6 et possède la plupart des propriétés pro-inflammatoires de l'IL-1 ; de même qu'une activité anti-tumorale, antivirale et antiparasitaire. L'effet pyrogène de TNF- $\alpha$  peut s'exercer de façon directe ou par l'intermédiaire de l'IL-1 et son action systémique s'étend sur le système nerveux et le foie.

### I.1.2.1.3. L'IL-6

L'IL-6 est produite par les cellules résidentes (épithéliales, endothéliales, macrophages, kératinocytes, mastocytes, cellules gliales) suite à leur activation. Il favorise l'adhésion de ces cellules aux vaisseaux et favorise la perméabilité des vaisseaux. L'IL-6 est un pyrogène endogène, à l'image de l'IL-1 et de TNF- $\alpha$ . Il est aussi le principal inducteur des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes en synergie avec l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . Cette cytokine peut être produite par les lymphocytes T CD4+ et agit sur la maturation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps lors de la mise en place de la réponse immune spécifique.



**Figure 2** : Effets locaux et systémiques des cytokines pro inflammatoires produites par les macrophages (CRP : Protéine C-réactive).

De multiples signes clinico-biologiques observés lors du syndrome inflammatoire sont la conséquence des effets des cytokines pro-inflammatoires sur le système nerveux (fièvre, somnolence, anorexie), sur le foie (production des protéines de l'inflammation : CRP), sur la moelle osseuse (hyperleucocytose), et sur les vaisseaux (marginalisation, diapédèse, activation des cellules recrutées).

### I.1.2.2. L'oxyde nitrique (NO)

Le NO est un gaz soluble produit par les macrophages, les cellules endothéliales et les neurones. Il est synthétisé à partir de la L-arginine par action de l'enzyme NO synthétase (NOS) après l'activation par le Ca<sup>2+</sup> ou par les cytokines TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ . A faible dose, le NO est un important vasodilatateur, il régule le recrutement des leucocytes et réduit l'agrégation

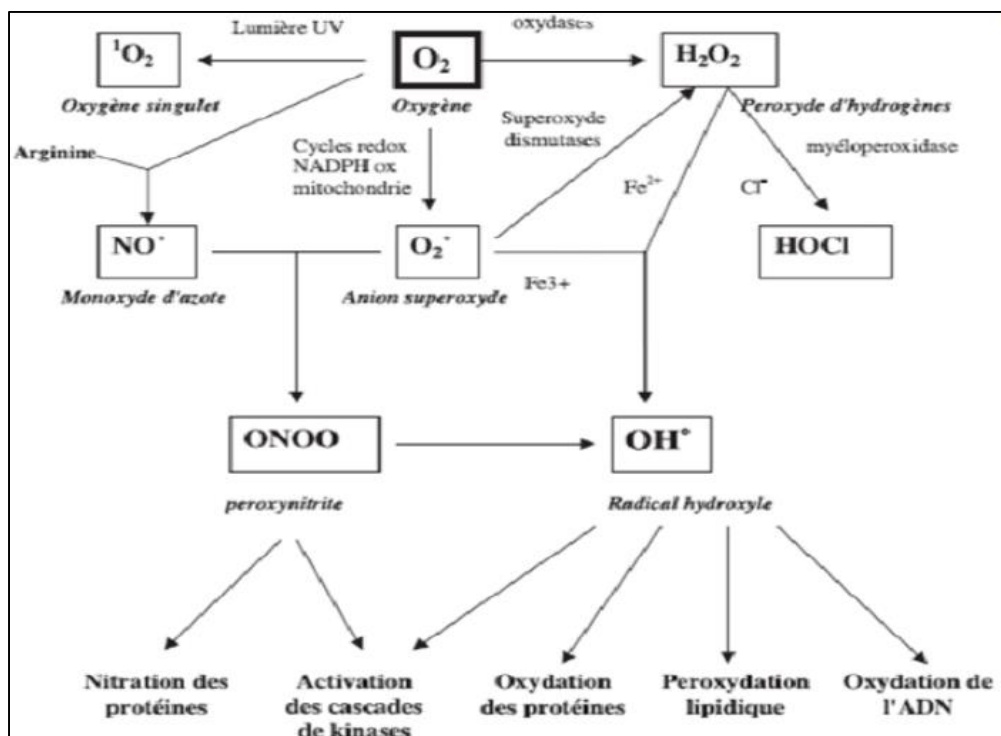


plaquettaire. Tandis qu'à forte dose, ce dernier possède une activité antimicrobienne par les métabolites qu'il forme avec les dérivés de l'oxygène (Figure 3).

### **I.1.2.3. Les radicaux libres**

Les radicaux libres sont des molécules ayant un ou plusieurs électrons non appariés les rendant extrêmement réactifs. Ils sont responsables de la destruction des microorganismes ou des débris cellulaires par les cellules phagocytaires. Les radicaux libres tel que l'anion superoxyde peuvent être libérés, combinés avec le NO et produire d'autres radicaux à l'instar du nitro-peroxyde (ONOOH) et le radical hydroxyle (OH•). L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactifs car ils sont des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (**Figure 3**). Les ERO possèdent des propriétés microbicides. Cependant, en quantité anormalement importante, ces espèces peuvent être relarguées dans le milieu extracellulaire et exercer des effets délétères sur les macromolécules de l'hôte (lipides [peroxydation], protéines [altération de la structure des protéines par oxydation des acides aminés ou rupture des ponts, modification de la charge électrique, modification de conformation et augmentation de la protéolyse], ADN [cassures des brins, pontages ADN-protéines, formation des sites abasiques]) (**Favier, 2003**). Ces dommages tissulaires sont observés dans de nombreuses pathologies chroniques tels que les désordres neurodégénératifs, les cancers et les maladies cardiovasculaires (**Sugamura et Keaney, 2011**). Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO par les défenses anti-oxydantes et anti-radicalaires de l'organisme est par conséquent indispensable.





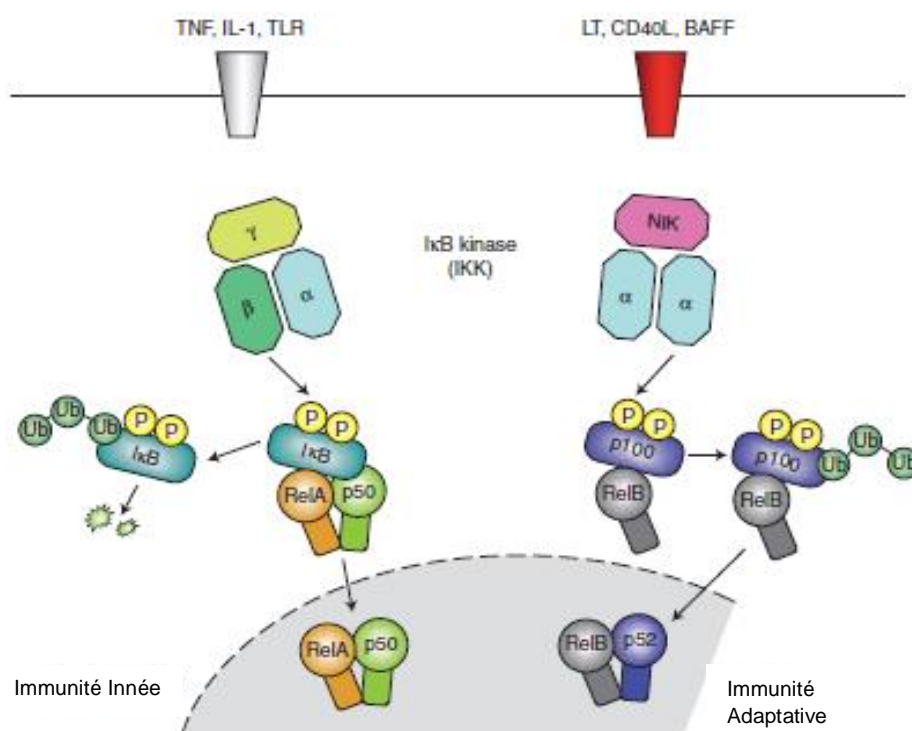
**Figure 3 :** Origine des différentes Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) impliquées en biologie (Favier, 2003).

L'Oxygène ( $O_2$ ) sous l'action de la lumière UV ou des oxydases conduit respectivement à la formation de l'oxygène singulet et du peroxyde d'hydrogène. De plus l' $O_2$  combiné à l'Arginine produit le NO. Ce dernier combiné à Anion superoxyde libéré lors du cycle redox conduit au peroxynitrite impliqué dans la nitration des protéines et l'activation des cascades de Kinases. Par ailleurs, l'anion  $O_2^-$  sous l'action de la superoxyde dismutase conduit à  $H_2O_2$ , qui sous l'action des ions Ferriques produit le radical  $OH^\bullet$  responsable de l'oxydation des protéines, de l'ADN et de la peroxydation lipidique.

#### 1.1.2.4. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B

Le NF- $\kappa$ B représente une famille de facteurs de transcription inductibles présente dans la plupart des cellules de l'organisme, qui régule un grand nombre de gènes impliqués dans différents processus de la réponse inflammatoire et immunitaire. Cette famille est composée de cinq membres structurellement liés, comprenant NF- $\kappa$ B1 (aussi appelé p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB et c-Rel, qui médient la transcription des gènes cibles en se fixant à un élément spécifique de l'ADN appelé  $\kappa$ B enhancer, sous forme d'hétéro ou d'homodimère. La protéine NF- $\kappa$ B est normalement séquestrée dans le cytoplasme par la famille des protéines inhibitrices, y compris les membres de la famille I $\kappa$ B. En outre, les précurseurs protéiques de NF- $\kappa$ B1 et NF- $\kappa$ B2, p105 et p100, servent de protéines de type I $\kappa$ B car leurs extrémités C-terminal ressemblent à la structure d'I $\kappa$ B et possèdent des fonctions inhibitrices de NF- $\kappa$ B. (Toby, 2009). L'activation de NF- $\kappa$ B implique deux voies majeures de signalisation, les voies canoniques et alternatives (Figure 4).

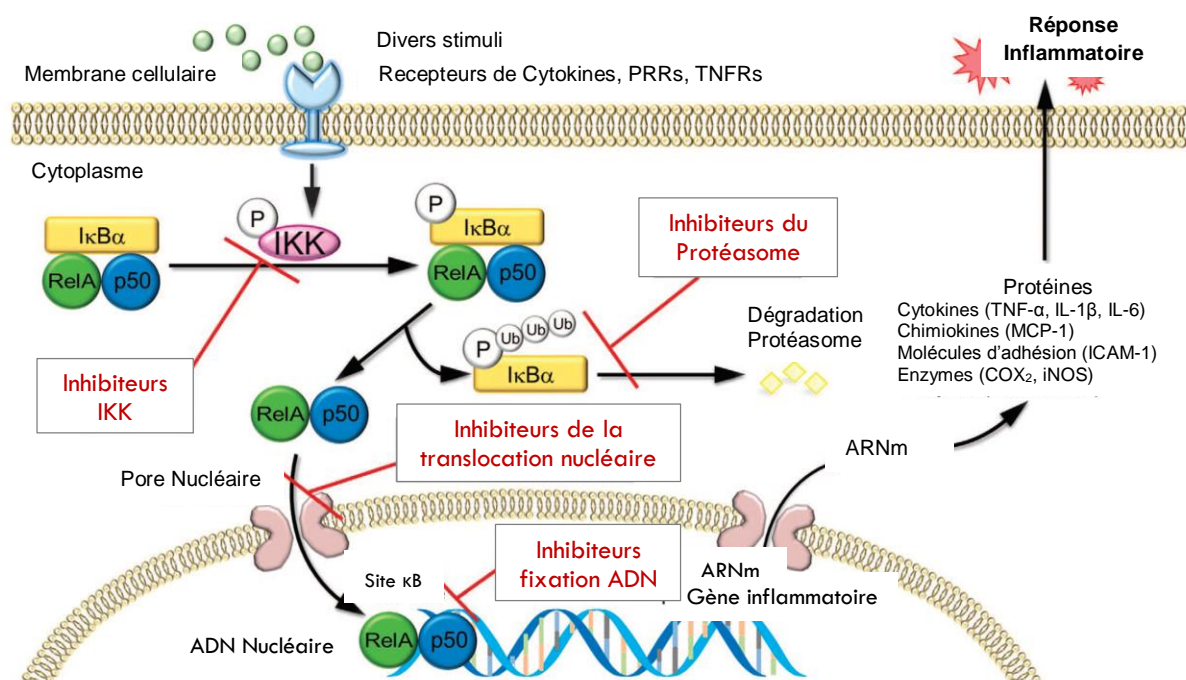
L'activation canonique de NF- $\kappa$ B est initiée par la dégradation inductible des protéines I $\kappa$ B, qui se produit principalement via l'activation des kinases appelées I $\kappa$ B Kinase (IKK). En effet, IKK est composé de deux sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et d'une sous unité régulatrice IKK $\gamma$ . Lorsqu'il est activé par un signal extracellulaire (cytokines, mitogènes, composantes microbiennes), IKK phosphoryle deux résidus de serine situés à l'extrémité N-terminal de I $\kappa$ B et, de ce fait déclenche la dégradation ubiquitine dépendante de I $\kappa$ B dans le protéasome entraînant une translocation nucléaire rapide du dimère NF- $\kappa$ B (RelA/p50) (Toby, 2009 ; Liu *et al.*, 2017). Contrairement à la voie canonique de NF- $\kappa$ B, la voie alternative est initiée par un groupe spécifique de stimuli tels que les membres de la superfamille de TNF excepté TNF- $\alpha$ , les lymphotoxines (LT), les activateurs des lymphocytes B (BAFF). En outre, l'activation alternative de NF- $\kappa$ B n'implique pas la dégradation d'I $\kappa$ B mais la modification de la protéine p100. En effet, la NF- $\kappa$ B *inducing* Kinase (NIK) active IKK $\alpha$  pour médier la phosphorylation de p100 et son ubiquitination, entraînant la formation de NF- $\kappa$ B mature p52 et la translocation nucléaire du complexe p52/RelB (Figure 4).



**Figure 4 :** Voies canonique et alternative de l'activation de NF- $\kappa$ B (Toby, 2009)

Après son activation, NF- $\kappa$ B peut activer la transcription de divers gènes et ainsi réguler l'inflammation. NF- $\kappa$ B cible l'inflammation non seulement directement en augmentant la production des cytokines inflammatoires, chimiokines et molécules d'adhésion. Mais également en régulant la prolifération cellulaire, la morphogénèse et la différenciation (Liu *et al.*, 2017). La voie de signalisation NF- $\kappa$ B jouant un rôle pathogénique dans diverses maladies

inflammatoires, de nombreuses stratégies thérapeutiques des maladies inflammatoires visant à bloquer l'activité de NF- $\kappa$ B ont été mis sur pieds (Figure 5).



**Figure 5 :** Thérapies ciblées sur NF- $\kappa$ B dans les maladies inflammatoires (Liu *et al.*, 2017). Les thérapies visant l'inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B peuvent consister en l'inhibition de l'activité d'IKK Kinase et ainsi prévenir la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , ou inhiber l'activité de la protéase afin de prévenir la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Ensuite l'inhibition de la translocation nucléaire, qui prévient l'entrée des sous-unités de NF- $\kappa$ B dans le noyau. Enfin, l'inhibition de la fixation à l'ADN qui prévient la fixation des sous-unités de NF- $\kappa$ B aux gènes cibles et par conséquent inhibent la transcription.

### I.1.2.5. Régulateurs de l'inflammation

Le mécanisme de régulation de l'inflammation consiste principalement en la neutralisation locale du pathogène ou la neutralisation via l'immunité adaptative. Le retour au calme est assuré par la disparition du stimulus, la mort des cellules immunitaires sur le site initialement lésé, la dégradation des messagers solubles de l'inflammation, le nettoyage local par la phagocytose grâce aux macrophages résidents et la production des cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4), et la libération d'anti protéases, d'anti radicalaires et d'antioxydants.

### I.1.3. Notion de neuro-inflammation

Le système immunitaire et le cerveau communiquent et cette communication est bidirectionnelle, car les attaques du système immunitaire périphérique sont détectées par le SNC. En effet, une activation immunitaire en périphérie est transmise au cerveau à l'aide de

plusieurs voies neurales et humorales, puis l'inflammation est interprétée et propagée dans le cerveau et la moelle épinière. L'inflammation cérébrale ou neuro-inflammation est médiée par plusieurs cytokines pro-inflammatoires clés (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ), des chimiokines et des messagers secondaires (ERO, NO) principalement produits par les cellules résidentes activées du SNC (cellules gliales) comprenant les microglies et les astrocytes (**Block, 2014**). De plus, le degré de neuro-inflammation dépend du contexte (lésions cérébrales de la moelle épinière ou trauma du SNC), de la durée et de l'évolution du stimulus primaire.

La neuroinflammation est une réponse bénéfique, fortement régulée et rapidement résolue par le SNC. Néanmoins, elle peut persister même après élimination du stimulus initial et donner lieu à une neuro-inflammation hautement destructive et pathologique associée à l'activation excessive des cellules gliales avec une production significative des cytokines et chimiokines, une infiltration des cellules immunitaires périphériques, l'œdème, l'augmentation de la perméabilité et la rupture de la barrière hématoencéphalique (**Block, 2014**).

### I.1.3.1. Les microglies

Les microglies représentent 10 % de la population du SNC et sont le point central de toute discussion sur la neuro-inflammation. Ceci est dû au fait que ces cellules immunitaires innées effectuent la surveillance immunitaire primaire et les activités du SNC, analogues à celles des macrophages incluant la production des cytokines et des chimiokines. En effet, une grande partie de la capacité immunitaire innée du CNS est médiée par les microglies. Ces dernières sont localisées dans les matières blanche et grise du cerveau et dans la moelle épinière (**Disabato et al., 2016**). Les autres activités immunitaires connexes des microglies incluent la propagation du signal inflammatoire initiée dans les tissus périphériques. Ces réponses sont essentielles dans la communication coordonnée entre le système immunitaire et le cerveau. Par exemple, en cas d'infection ou de maladie, les microglies deviennent actives et en fonction du contexte, produisent des cytokines et chimiokines qui facilitent le recrutement des leucocytes au cerveau (**Disabato et al., 2016**). Les microglies activées subissent également des réarrangements cytosquelettiques qui altèrent l'expression des récepteurs à leurs surfaces. Ces altérations permettent aux microglies de migrer vers le site de la lésion et d'augmenter leur efficacité phagocytaire. En général, l'activation des microglies et l'augmentation de l'expression des cytokines sont destinées à protéger le SNC et profiter à l'organisme hôte. Toutefois, une activation amplifiée, exagérée ou chronique des microglies peut conduire à des changements pathologiques robustes et à des complications neurocomportementales (**Norden et Godbout, 2013**).

### I.1.3.2. Les astrocytes

Les astrocytes représentent le type cellulaire le plus abondant du SNC (**Farina et al., 2007**). Ils sont habituellement décrits comme des cellules de maintien qui participent à la transmission nerveuse, car possèdent un bon nombre de récepteurs fonctionnels pour les neurotransmetteurs. Par ailleurs, les astrocytes sont également reconnus pour participer activement à la réponse neuro-inflammatoire. Toutefois, ces astrocytes réactifs ne semblent pas attaquer l'agent pathogène ou encore promouvoir la guérison comme le ferait la cellule microgliale. Les astrocytes entourent le site en guise de protection. La densité des astrocytes est beaucoup plus forte dans les régions cérébrales plus fragiles contrairement aux régions contenant des neurones plus résistants. Cette caractéristique suggère le potentiel neuro-protecteur de ces cellules. Les astrocytes sont aussi en mesure de produire un grand nombre de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines et facteurs neurotrophiques) (**Farina et al., 2007**).

### I.1.3.3. Neuro-inflammation et douleur

Les cellules gliales sont également fortement associées au système nerveux sensoriel et la neuro-inflammation peut donner lieu à la douleur neuropathique (**Calvo et al., 2012 ; Tenorio et al., 2013**). Les microglies et les astrocytes sont les deux types de cellules gliales d'intérêt qui sont impliquées dans le développement de la douleur persistante. En effet, l'activation combinée des microglies et des astrocytes et la production des cytokines telles que IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  provoque un changement dans la signalisation du réseau d'astrocytes, potentialisant ainsi la transmission neuronale de la douleur (**Block, 2014**).

### I.1.4. Les lipopolysaccharides bactériens (LPS): Modèle d'étude de la(l') (neuro)inflammation

Les LPS encore appelé lipoglycanes sont les principaux constituants de la membrane externe des bactéries qui contribuent fortement au maintien de la structure bactérienne et protègent la membrane plasmique des attaques externes. Les LPS sont des larges molécules de nature non-protéique composées d'une partie lipidique (lipide A) et d'une partie polysaccharidique constituée de la chaîne O (ou antigène O, pour Ohn Kapsel) et d'un oligosaccharide central (Core). L'antigène O, est l'élément le plus distal de la bactérie, elle constitue donc l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. Le lipide A permet l'ancrage des LPS à la membrane externe (**Sali, 2014**) et représente la partie toxique du LPS (action sur les granulocytes et les cellules épithéliales). Par ailleurs, lors d'une infection bactérienne, le

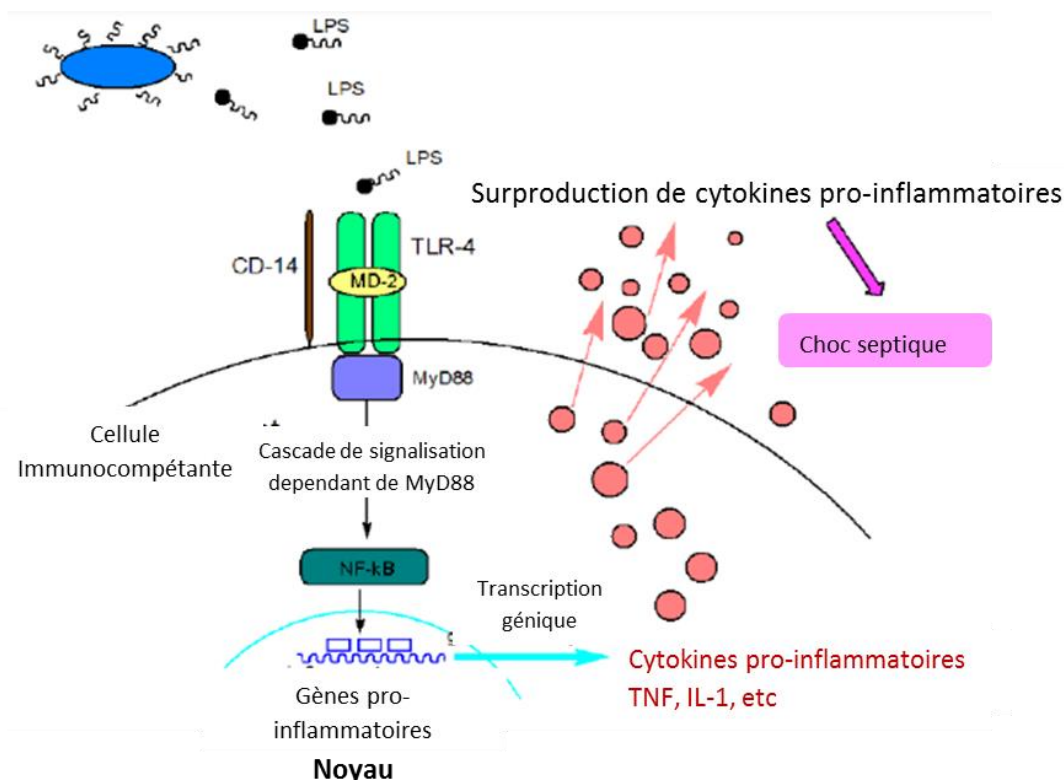
## Chapitre I : Revue de la Littérature

lipide A est responsable du déclenchement de la réponse inflammatoire impliquant le récepteur TLR4. Dans la recherche fondamentale, LPS est très utilisé pour induire l'inflammation sur les cellules ou organes en culture (Sali, 2014).

Afin d'étudier les processus neuro-inflammatoires de plusieurs maladies, il fut nécessaire de créer des modèles *in vitro* et *in vivo* reproduisant le plus fidèlement possible les manifestations retrouvées chez l'humain. Depuis quelques années, le LPS est l'une des toxines les plus utilisées. De plus, il est l'un des plus puissants activateurs des cellules gliales. Son mécanisme d'activation est bien connu. D'abord il se lie avec la *LPS binding protein* (LBP). Ensuite, Le complexe LPS/LBP peut aller se fixer au récepteur hétérodimère CD14-TLR4 et avec une autre protéine, la «myeloid differentiation protein-2» (MD-2) (Da Silva *et al.*, 2001). La signalisation intracellulaire qui suit la création du complexe CD14/TLR4/MD-2 - LPS/LBP mène à une robuste production de cytokines inflammatoires telles qu'IL-6, IL-1 et TNF- $\alpha$  et aussi les chimiokines telle qu'IL-8. Comme la plupart des TLR, cette production des cytokines semble passer par l'activation du facteur NF- $\kappa$ B (Figure 6).

Il a été démontré qu'une inflammation périphérique induite chez les animaux adultes par injection systémique de LPS (5 mg/kg, intrapéritonéale [*i.p.*]) entraîne une augmentation rapide de la production de TNF- $\alpha$  dans le cerveau (teneur élevée pendant 10 mois) menant à l'activation des microglies cérébrales pour la production de façon chronique des facteurs pro-inflammatoires cérébraux tels que TNF, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 et NO (Sawada *et al.*, 1989 ; Arai *et al.*, 2004 ; Qin *et al.*, 2007). Cette activation microgliale mène à une perte retardée et progressive des neurones dopaminergiques dans la substance grise (Qin *et al.*, 2007). Bien que l'activation des microglies soit une composante clé de plusieurs conditions neurodégénératives et contribue aux déficits comportementaux et cognitifs, les astrocytes jouent également un rôle essentiel dans la régulation des processus du SNC, de la plasticité synaptique et des réseaux neuronaux (Fu *et al.*, 2014).





**Figure 6 :** Signalisation intracellulaire induite par LPS (Tamara *et al.*, 2013)

### I.1.5. Implications pathologiques de l'inflammation

Ces dernières décennies, de nombreux résultats de recherche ont mis en évidence le rôle de l'inflammation chronique dans de nombreuses maladies qui n'étaient initialement pas classées comme maladies inflammatoires (Tableau I).

**Tableau I :** Exemples de maladies liées à l'inflammation (Nathan, 2002 ; Rousselet *et al.*, 2005 ; Schofield et Grau, 2005).

<b>Désordres dans lesquels le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation</b>
Arthrose, Asthme, Polyarthrite rhumatoïdes, Eczéma, Goutte, Maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Artériosclérose)
<b>Maladies infectieuses, métaboliques, ou génétiques dans lesquelles l'inflammation contribue à la pathologie</b>
Paludisme cérébral, Tuberculose, Hépatite C, Obésité, Diabète de type II, Cancers, Dysenterie bactériennes, mucoviscidose
<b>Maladies d'origine diverses dans lesquelles la fibrose post inflammatoire est la cause principale de la pathologie</b>
Bilharziose, Cirrhose hépatique post virale ou alcoolique, Fibrose pulmonaire idiopathique...



### **I.1.6. Thérapeutiques de l'inflammation**

Les traitements utilisés dans le cadre de l'inflammation chronique sont variés et dépendent de la maladie. Ces traitements agissent sur les effets initiateurs ou amplificateurs de l'inflammation (migration des cellules inflammatoires, bronchoconstriction, production d'ERO).

#### **I.1.6.1. Les Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes**

Les AIS sont une vaste famille de médicaments anti-inflammatoires dérivés du cortisol (Prednisone, paraméthazone, dexaméthazone) doués également de propriétés antiallergiques. Ils agissent par inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ), de l'activation de la prolifération des lymphocytes T et B, de l'expression de certaines molécules d'adhésion intervenant dans l'immunité innée ; et par réduction de la perméabilité vasculaire empêchant l'afflux des leucocytes au site. L'usage des AIS est cependant associé à de nombreux effets indésirables qui s'accroissent avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie : l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'apparition d'ulcères gastroduodénaux, l'ostéoporose, le diabète sucré (Schwartz, 2011).

#### **I.1.6.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Qu'ils soient délivrés avec ou sans ordonnance, les AINS sont l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde à propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique (les salicylates [Aspirine], les dérivés d'acides propénoïques [Ibuprofène], les dérivés d'acide acétique [Diclofénac], les Indoles [Indométhacine]), mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (COX), contribuant ainsi à inhiber la production des prostaglandines. Cependant, leur utilisation thérapeutique est associée à des effets indésirables, principalement les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (Grandin, 2013).

#### **I.1.6.3. Les immunosuppresseurs**

Les immunosuppresseurs à l'instar de la cyclophosphamide (Endoxan®) ou la ciclosporine (Néoral®) peuvent être utilisés dans les maladies inflammatoires où l'immunité est excessive. La ciclosporine est une molécule extraite d'un champignon capable d'interagir avec les constituants intracellulaires mis en jeu dans la transmission des signaux d'activation des lymphocytes T. Elle est très utilisée dans les transplantations d'organes et dans les formes graves de maladies auto-immunes. Tandis que la cyclophosphamide largement utilisée en

cancérologie, agit directement sur l'ADN en soudant les brins entre eux, les empêchant de se séparer, entraînant ainsi l'inhibition de la réplication et la division cellulaire. Cependant les traitements immunosuppresseurs peuvent induire un risque infectieux (Schwartz, 2011).

### **I.1.6.4. Les biothérapies**

Les biothérapies utilisent des tissus (thérapie tissulaire), des cellules (thérapie cellulaire) ou des composés biologiques à l'exemple de l'ADN (thérapie génique) et des protéines. Les biothérapies utilisées pour traiter les maladies inflammatoires ciblent un type de cellules, de cytokines ou de leurs récepteurs. Ainsi une cytokine elle-même peut être utilisée (dans le cas de cytokines inhibitrices comme l'IL-10) ou des anticorps dirigés contre les cytokines afin de diminuer sa production, le neutraliser après sa production ou bloquer ses cibles. A l'exemple des anticorps anti-TNF- $\alpha$  (golimumab [Simponi®]) et anti-IL-1 $\beta$  (Anakimra [Kineret®]) (Schwartz, 2011).

### **I.1.6.5. Les anti-inflammatoires d'origine végétale**

La phytothérapie anti-inflammatoire peut être employée en complément de ces traitements afin d'en diminuer la consommation et de limiter ainsi leurs effets indésirables. Le nombre de composés phytochimiques présents dans le règne végétal est très vaste et leur spectre d'activité tout aussi grand.

## **I.2. LES POLYSACCHARIDES VEGETAUX**

### **I.2.1. Définition, classification et fonctions**

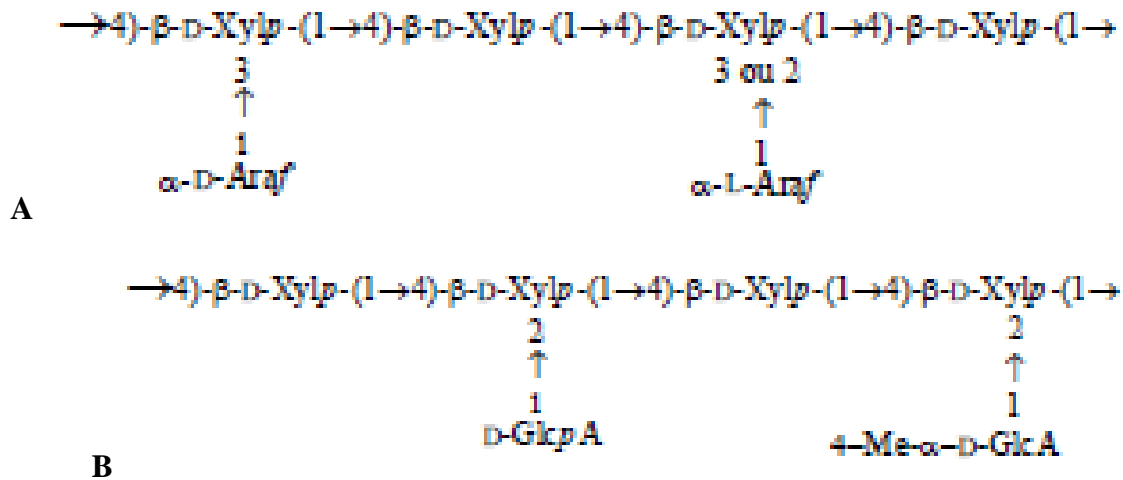
Les polysaccharides sont composés d'enchainements d'unités osidiques reliées par des liaisons glycosidiques et représentent l'une des familles de biomolécules les plus diversifiées en termes de structure. Le premier niveau de complexité concerne l'existence ou l'absence d'unité de répétitions dans leur structure c'est-à-dire composée du même monosaccharide (homosaccharide) ou de plusieurs motifs différents (hétérosaccharide). Puis, les polysaccharides peuvent être caractérisés par cette séquence répétitive constituée d'oses neutres (glucose, galactose, xylose, fucose...), d'oses acides (glucuronique, galacturonique, iduronique...) ou d'hexosamines (N-acétyl-glucosamine, N-acétyl-galactosamine). La diversité peut encore s'accroître par la présence des structures de motifs non glucidiques de nature organique (acétate, lactate, pyruvate, succinate) ou inorganique (phosphate, sulfate...), associés de façon covalente à certains hydroxyles secondaires des monosaccharides constitutifs.

Chez les végétaux, la variabilité structurale des polysaccharides est principalement liée à leurs fonctions biologiques. Ils peuvent ainsi être classés en polysaccharides de structure

présents dans la paroi cellulaire (cellulose, hémicellulose et pectine), en polysaccharides de réserve (amidon), en gommages ou exsudats (gommages arabiques) et en mucilages (Tinamri et Lagmi, 2014).

### I.2.2. Les hémicelluloses

Ils représentent 30 % des polysaccharides pariétaux et sont constitués de monosaccharides neutres (xylose, arabinose, galactose, glucose et mannose) et d'acides uroniques (acides glucuronique et acide 4-O-méthyl-glucuronique). Les hémicelluloses présentent un haut degré de variabilité en fonction des espèces végétales, du type de tissus et des stades de maturité. Cependant, leur structure consiste en un squelette de base de monosaccharides (glucose, mannose et xylose plus représentés) liés en  $\beta$ -(1,4) et de type D-pyranoses. Même si ces polysaccharides sont principalement de nature hétéropolymériques (xyloglucanes, arabinoxyanes, glucomannanes, glucuronoxyanes ou glucuronoarabinoxyanes), quelques hémicelluloses homopolymériques (glucanes, mannanes et xylanes) ont été décrites dans la littérature (Figure 7) (Moine, 2005).



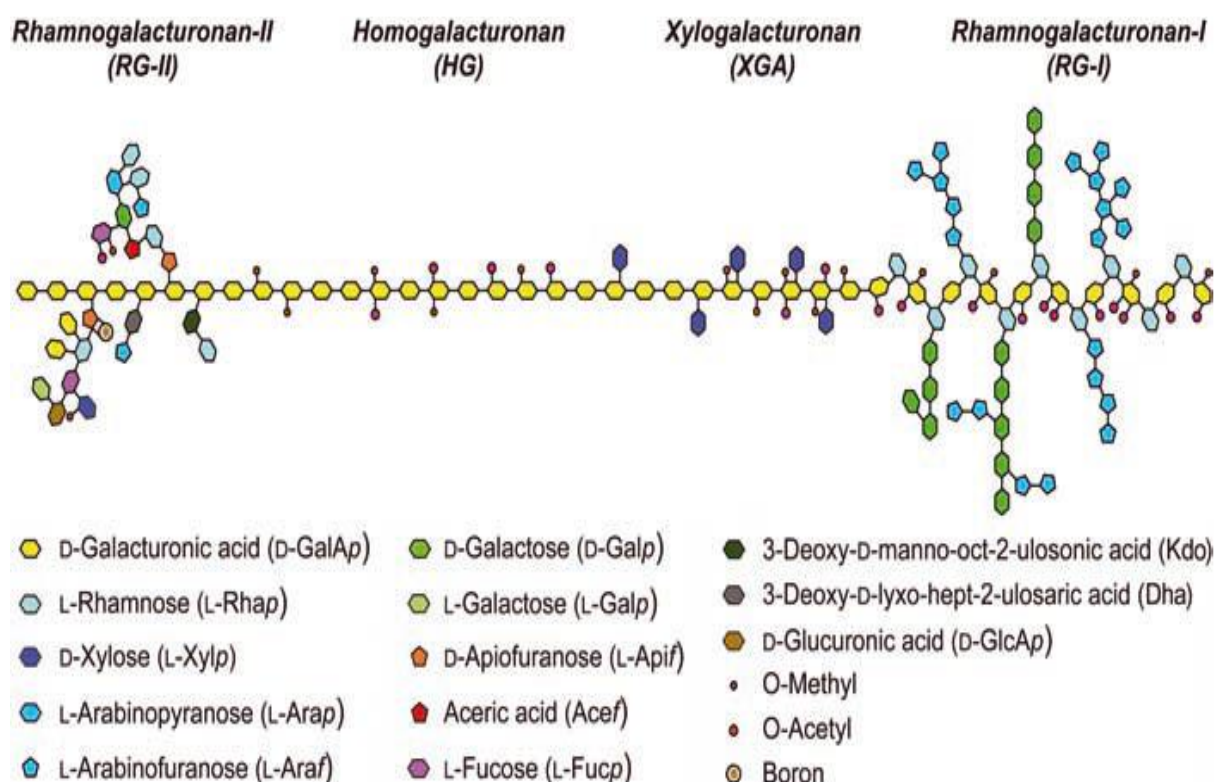
**Figure 7** : Structure d'un arabinoxyane (A) et d'un xylane acide (B)

Les arabinoxyanes ou xylane neutres (A) sont composés d'une chaîne linéaire de résidus de type xylopyranoses (Xylp) liés en  $\beta$ -(1,4) présentant des branchements plus ou moins réguliers. Elle est substituée par des résidus de type Arabinoses (Ara) liés à la chaîne principale par des liaisons (1,3) ou (1,3) et (1,2). Les xylanes acides sont substitués par de l'acide glucuronique ou de l'acide 4-O-méthyle- $\alpha$ -Dglucuronique en position 2 des unités xylopyranoses (B).

### I.2.3. Les pectines

Les pectines sont des macromolécules exclusivement végétales dont les structures très complexes évoluent au cours du développement cellulaire. Elles représentent le principal constituant de la lamelle moyenne, ou elles forment un ciment biologique (ciment pectique) qui rattache les cellules les unes aux autres.

Les pectines, essentiellement composées d'acides galacturoniques peuvent être classées en deux sous-catégories (Figure 8): Les pectines acides (Homogalacturonane [HG], Xylogalacturonane [XGA], Rhamnogalacturonane [RG] de types I et II) et les pectines neutres (Arabinanes, Galactanes, Arabinogalactanes) associées de manière covalente aux rhamnogalacturonanes au sein de la macromolécule pectique. Le modèle de l'organisation de ces sous-catégories décrit une alternance de zones « lisses » (HG) et de zones « hérissées » (RG-I et II) substituées par des chaînes latérales d'oses neutres (Sergey *et al.*, 2011). A ce jour, l'organisation complexe des polymères pectiques n'est donc pas encore totalement élucidée.



**Figure 8 :** Représentation schématique d'un modèle de la structure de base des pectines (Sergey *et al.*, 2011).

Les Homogalacturonanes (HG) sont les polysaccharides pectiques majeurs (50 à 70 %). Il s'agit d'homopolymères contenant plus de 200 résidus d'acide galacturonique (GalA) liées en  $\alpha$  (1,4) avec des groupes d'ester d'acétyle et de méthyl. Il existe deux types d'HG structurellement modifiés, à savoir les Xylogalacturonane (XGA) et Rhamnogalacturonane-II (RG-II) qui sont les composantes mineures des pectines. XGA a également un squelette HG, mais 25-75 % d'unités d'acide galacturonique sont substitués par le Xylose. RG-II (5 à 10 kDa) est un Glycan assez complexe, très ramifié. Quatre chaînes latérales qui au total se compose de jusqu'à 29 monosaccharides sont

attachées au court squelette Homogalacturonane des RG-II. Le Rhamnogalacturonane-I (RG-I) est le second composant majeur (7 à 15 %) des polysaccharides pectiques et, contrairement aux trois autres pectines, il possède un squelette d'unités répétitives d'acides galacturonique et de Rhamnose en alternance [4)- $\alpha$ -D-GalA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rha-(1,]. Ce squelette est diversement substitué par les chaînes latérales d'Arabinanes, de Galactanes ou d'Arabinogalactanes.

### I.2.4. Les arabinogalactanes

Les arabinogalactanes (AG) sont des polymères composés de résidus d'arabinoses et de galactoses impliqués dans diverses fonctions telles que la croissance, le développement, la signalisation, l'embryogenèse et la mort cellulaire programmée. Ils sont répartis en 3 classes : AG de type I, AG de type II et les arabinogalactanes associés à des protéines (qualifiés d'AGP et plus rarement d'AG de type III).

Les AG-I sont le plus souvent associés aux RG-I et parfois classifiés dans cette catégorie. Ils sont constitués de chaînes linéaires d'unités D-galactopyranoses liées en  $\beta$ -(1,4), sur lesquelles peuvent être substituées en position O-3 des unités D-galactopyranoses et/ou des unités L-arabinofuranoses. Tandis que les AG-II plus répandus dans la nature (**Liang et al., 2014**), sont constitués d'une chaîne principale de résidus galactopyranoses liés en  $\beta$ -(1,3) et/ou  $\beta$ -(1,6) sur laquelle peuvent se greffer des chaînes latérales riches en groupements arabinofuranoses, arabinopyranoses et galactopyranoses. Les AGPs sont une classe de protéoglycane de plantes contenant 90 à 99 % de polysaccharides et 1 à 10 % de protéines. Ils constituent l'un des composants majeurs de nombreuses gommages et exsudats tel que la gomme arabique.

### I.2.5. Activités biologiques des polysaccharides végétaux

De nombreux travaux ont été menés sur les extraits/fractions polysaccharidiques de nombreuses plantes médicinales, mettant en exergue leur large spectre de propriétés pharmacologiques (Tableau II).

## Chapitre I : Revue de la Littérature

**Tableau II :** Activités biologiques des extraits polysaccharidiques de quelques plantes médicinales

Activités	Plantes d'intérêts	Références
<b>1. Antioxydantes et anti-inflammatoires</b> Piégeage des radicaux libres (OH•, O <sub>2</sub> •, DPPH•, ABTS•), chélation et réduction du fer, inhibition de la peroxydation lipidique, inhibition des dommages oxydatifs sur l'ADN humain	<i>Thé vert Camelia sinensis</i> (feuilles, fleurs, graines)	<b>Wang et al., 2012</b>
	<i>Herba Lophatheri E.</i> (feuilles)	<b>Ge et al., 2013</b>
	<i>Aralia elata</i> (écorce de racine)	<b>Zhang et al., 2013</b>
	<i>Athyrium multidentatum</i> (Doll.) Ching (rhizome)	<b>Liu et al., 2013</b>
	<i>Sarcandra glabra</i>	<b>Jin et al., 2012a</b>
	<i>Pinus koraiensis</i>	<b>Zou et al., 2013</b>
	<i>Opuntia dillenii</i>	<b>Yang et al., 2013</b>
	<i>corneum gigeriae</i>	<b>Xiong et al., 2014</b>
	<i>Ilex latifolia Thunb</i> (feuilles)	<b>Fan et al., 2014</b>
	<i>Stévia rebaudiana</i> (feuilles)	<b>Mediesse et al., 2014</b>
	<i>Cedrus deodara</i>	<b>Zeng et al., 2014</b>
	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer (racines, fleurs, feuilles)	<b>Jiao et al., 2014a</b> <b>Sheng et Sun, 2014</b>
	<i>Artemisia argyi</i> (feuilles)	<b>Min-Bo lan et al., 2010</b>
	<i>Epimedium acuminatum</i> Franch	<b>Cheng et al., 2013</b>
<i>Allanblackia floribunda</i> (écorces)	<b>Boudjeko et al., 2015</b>	
<i>Chomolaena odorata</i> (feuilles)		
<b>2. Anti-inflammatoires et immunomodulateurs</b> - Amélioration de la prolifération des lymphocytes T et des cellules mononuclées et de la production des Interféron-γ (IFN-γ) et interleukine -2 (IL-2) induit par la Concanavallin A. - Inhibition de la production excessive du NO, ERO et TNF- α par les macrophages	<i>Sutherlandia frutescens</i> (feuilles)	<b>Lei et al., 2015</b>
	<i>Artemisia argyi</i> (feuilles)	<b>Min-Bo lan et al., 2010</b>
	<i>Allanblackia floribunda</i> (écorces)	<b>Boudjeko et al., 2015</b>
	<i>Chomolaena odorata</i> (feuilles)	

---

**3. Effets hépato, cardio et Neuroprotecteurs**

**Hepatoprotection :** Inhibition de la libération des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT) et la formation du MDA, amélioration des activités de la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase chez les souris atteintes de lésions hépatiques induites par le tétrachlorure

*Huangshan Maofeng*  
*Ilex latifolia* Thunb

**Lu et al., 2013**  
**Fan et al., 2014**

**Cardioprotection :** Inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes, du changement du potentiel de membrane mitochondrial et de la libération du cytochrome C induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Aralia elata*

**Zhang et al., 2013**

**Neuroprotection :** Augmentation de la viabilité des cellules PC12, réduction de l'apoptose et de l'accumulation des ERO induites par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Opuntia dillenii*

**Huang et al., 2009**

---

**4. Antiplasmodiales, antimicrobiennes, anti tumorales**

*Bulgaria inquinans* (Fries)  
*Achyranthes bidentata*  
*Epimedium acuminatum* Franch  
*Panax ginseng*

**Bi et al., 2011**  
**Zhu et al., 2012**  
**Cheng et al., 2013 ;**  
**Jiao et al., 2014b**

- 
1. Radical Hydroxyle (OH•), Anion superoxyde (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), 1,1-diphényl-2- picrilhydrazine (DPPH) et 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzylthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS).
  2. Oxyde Nitrique, Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), Cytokines Interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukines (IL)-2 et *Tumor necrosis Factor* (TNF)-  $\alpha$ .
  3. Aspartate amino transférase (ASAT), ALAT (Alanine Amino Transférase), Malondialdéhyde (MDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène), lignée cellulaire dérivés de phéochromocytome de Rat PC12.



### I.2.6. Applications dans le domaine pharmaceutique

Grâce à leur grande diversité structurale et à leurs fonctions spécifiques, les polysaccharides occupent une place importante tant dans le domaine pharmaceutique que agroalimentaire (épaississant ou gélifiants, plastiques biodégradables) et cosmétique (peintures).

Les polysaccharides actuellement pourraient être un potentiel important pour leur utilisation en milieu médical (**Diallo et al., 2003 ; Inngjerdingen et al., 2007 ; Aboughe et al., 2010**). En effet, l'amélioration de la réponse immunitaire par les polysaccharides immunostimulants permet de lutter contre les affections opportunistes dans les situations comme le SIDA, qui fragilise le système immunitaire. De plus, les polysaccharides sont au cœur de la recherche comme candidats prometteurs d'adjuvants pour la formulation des vaccins. En effet, ils peuvent augmenter la réponse spécifique à un antigène par stimulation directe du SI tout en agissant en tant que système de livraison du principe actif en raison de leur toxicité relativement faible, de leur biodégradabilité et de leur stabilité (**Singh, 2011 ; Mata et al., 2013 ; Li et Wang., 2015**).

## I.3. MONOGRAPHIE DES ESPECES VEGETALES ETUDIEES

### I.3.1. *Khaya grandifoliola* (Welw) C.D.C

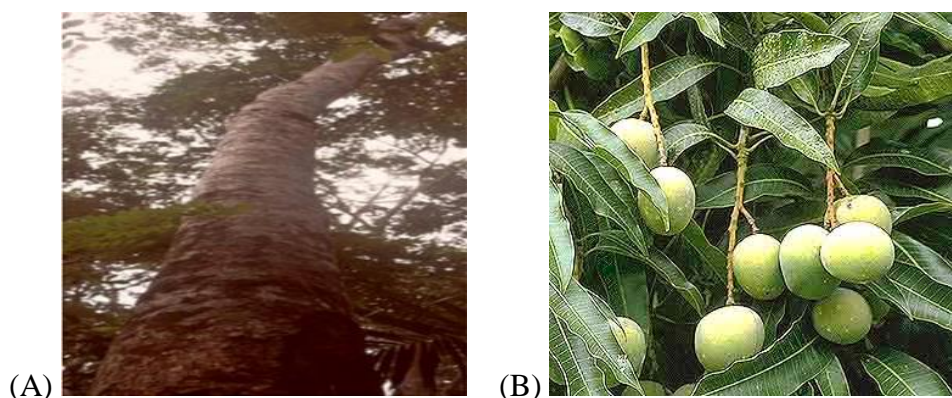
#### I.3.1.1. Etude botanique et Taxonomie

De son nom scientifique *Khaya grandifoliola* (Welw) C.D.C, cette plante médicinale tropicale est appelée en langue française Acajou à grandes feuilles ou Acajou lisse ; et en langue anglaise *Broad-leaved mahogany, Big-leaved mahogany ou Dry-zone mahogan*. Elle est connue au Bénin sous le nom Acajou du Bénin, en Afrique de l'ouest sous les noms *senufobamana, diala-ir, guinea kissi diala* ou *baule lukru*, à l'Est-Cameroun sous les noms *Oh mangona* ou *N'Gollon*, et au Nigéria sous le nom Oganwo. Elle appartient à la/l' :

<b>Embranchement</b>	<i>Viridiaeplantae</i>	
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>	
<b>Sous-classe</b>	<i>Rosidae</i>	
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>	
<b>Famille :</b>	<i>Meliaceae</i>	
<b>Sous-famille</b>	<i>Swietenoidae</i>	
<b>Genre :</b>	<i>Khaya</i>	
<b>Espèce :</b>	<i>grandifoliola</i>	<b>(Hawthorne, 1998)</b>

### I.3.1.2. Caractéristiques morphologiques

*K. grandifoliola* est un arbre de forêt dominant atteignant 40 m de hauteur et 9 m de circonférence, dépourvu de branches sur 23 m et souvent tordu ou incliné à proximité du sommet. Son écorce est brun grisâtre à la surface, rugueuse et de coloration rose foncé à rougeâtre sur le côté interne avec des stries blanches. Cet arbre exsude un peu de liquide rougeâtre avec un tronc droit et cylindrique ayant à sa cime des branches longues, horizontales et nombreuses (Photo 1). *K. grandifoliola* possède les petites fleurs blanches de méliacées en particulier très fleuries (Sofowora *et al.*, 2008).



**Photo 1 :** *Khaya grandifoliola*. (A) : Aperçu tronc d'arbre (photographié à l'arboretum de Mbalmayo par **Mediesse K.F., 2014**), (B):Feuilles et fruits (Source : **National Parks Flora & Fauna Web**).

### I.3.1.3. Origine, distribution et habitat

*K. grandifoliola* originaire de l'Afrique tropicale, est largement distribué à travers l'Afrique de l'Ouest depuis la côte de la Guinée jusqu'au Cameroun et s'étend vers l'est à travers le bassin du Congo jusqu'en Ouganda et dans certaines parties du Soudan. La végétation y est du type savane soudano-guinéenne pour la partie la plus sèche, et forêt dense pour la partie la plus humide (1200-1800 mm de pluviométrie annuelle et d'une saison sèche de 3 à 5 mois). En zone de savane, il se cantonne surtout aux bandes de forêt galeries le long des cours d'eau et on ne le rencontre que rarement à l'état isolé. Dans la zone de forêt semi décidue, cet arbre préfère les lisières et les emplacements bien éclairés. De même, cet arbre est rencontré dans les plaines, basses montagnes et plateaux jusqu'à une altitude de 1,400 mètres. Ce dernier préfère les sols humides mais bien drainés et est fréquent dans les alluvions de fonds de vallées et dans les sols d'éboulis au pied des collines granitiques (**Hutchinson et Dalziel, 1978**).

### I.3.1.4. Utilisation en médecine traditionnelle

Traditionnellement, l'écorce au goût amer, les racines et les feuilles de cet arbre sont utilisés pour le traitement de nombreux maux listés dans le Tableau III.

**Tableau III** : Quelques utilisations de *Khaya grandifoliola* en médecine traditionnelle.

Organes	Mode de préparation	Indications	Références
Ecorces	Infusion	Fièvre, Céphalées, Paludisme, Maux de ventre, Diabète, Ulcère gastrique,	<b>Moundipa et al., 2002</b> <b>Njifutie et Njikam, 2006</b>
		Maladies de la peau, Gonorrhées, convulsion,	<b>Odugbemi et al., 2007</b>
	Décoction	Toux, Rhumatisme, Diarrhée	<b>Olowokudejo et al., 2008</b>
Feuilles	Décoction (eau) macération	Diabète, anémie, hépatite	<b>Hashem et al., 2014</b>

### I.3.1.5. Données phytochimiques et pharmacologiques

#### I.3.1.5.1. Phytochimie

Les études menées sur les extraits aqueux, éthanolique et méthanolique des écorces de *K. grandifoliola* ont révélé la présence d'une large variété de composés phytochimiques qui incluent les hydrates de carbones, saponines, tannins, quinones, coumarines, flavonoïdes, anthraquinones, anthocyanosides et les alcaloïdes spécifiques tels que l'émétine (alcaloïde isoquinolique) et les strychnines (alcaloïdes indoliques) (**Stephen et al., 2009 ; Ojokuku et al., 2010 ; Musa et al., 2013 ; Essama et al., 2016**). La forte teneur en limonoïdes (le Grandifotane A, l'hydroxykhayalactone et le grandifolide) est responsable de la saveur amère des écorces de cette plante (**Zang et al., 2008**). Les minéraux tels que le magnésium, le calcium, le sodium, le potassium et le manganèse y sont également présents (**Ojokuku et al., 2010**). Par ailleurs, les huiles essentielles obtenues des fleurs fraîches de cette plante sont principalement constituées de sesquiterpènes (86,32 %) (**El soudar et al., 2016**). Les gommés de *Khaya* quant à elles sont constituées en chaîne centrale de D-galactose, L-rhamnose et d'acide D-galacturonique, de même que l'acide 4-O-méthyl~glucuronique en chaîne latérale.

### I.3.1.5.2. Activités biologiques

#### (a) Activités antioxydantes et anti-inflammatoires

Les travaux de **Njayou et al. (2013)** ont mis en exergue l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique microsomale par l'extrait aqueux et au chlorure méthylène/méthanol (1/1 : v/v). De plus, les extraits bruts (aqueux, éthanolique, à l'hexane) et les fractions au chlorure de méthylène, au chlorure de méthylène/méthanol (95/5 (F5); 90/10 (F10); 75/25 (F25) v/v) et méthanolique des écorces et feuilles possèdent des propriétés de piégeage des radicaux DPPH, OH et réductrices du Fer (**Bumah et al., 2005a ; Bumah et al., 2005b ; Hashem et al., 2014 ; Njayou et al., 2015 ; Oyewale et al., 2016**). La meilleure activité antioxydante de la fraction méthanolique a été corrélée à sa teneur élevée en polyphénols (**Njayou et al., 2015**). En outre, **Owona (2015)** a mis en exergue les activités anti-inflammatoires des extraits bruts des écorces de cette plante. La fraction F25 riche en polyphénols, inhibe l'expression des mRNA des cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6) dans les macrophages et les microglies, et les activités de la p38 MAPKinase et du JNK3 (de l'ordre de 90 % et 60 % respectivement).

#### (b) Activités hépatoprotectrices et gastroprotectrices

*In vitro*, les extraits bruts et les fractions au chlorure de méthylène/méthanol, F5, F10 et F25 ont présenté un effet hépatoprotectif contre le stress oxydatif induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, par inhibition dose dépendante de la libération de la Lactate déshydrogénase (**Njayou et al., 2013**). La fraction F25 plus active (Concentration inhibitrice 50 : CI<sub>50</sub>=4,05  $\mu$ g/mL) agit par induction de la translocation nucléaire de Nrf2 (**Njayou et al., 2015**). De plus, les effets hépatoprotecteurs et curatifs des extraits de cette plante contre la toxicité induite par l'acétaminophène, le tétrachlorure de carbone et le paracétamol ont été démontrés *in vitro* et *in vivo*. Il s'agit de l'inhibition de la libération des transaminases (ALAT, ASAT), de la formation du malondialdéhyde, de l'amélioration de la viabilité cellulaire, de l'activité des enzymes antioxydantes et de la teneur en glutathion réduit (**Njayou et al., 2013 ; Hashem et al., 2014, Njayou et al., 2016**). En outre, l'extrait éthanolique (81,1 % à 500 mg/kg) inhibe la formation de l'ulcère gastrique induit par HCl/éthanol chez le rat (**Essama et al., 2016**).

#### (c) Activités antipaludiques

De nombreuses expérimentations ont mis en évidence les activités antipaludiques des extraits éthanoliques, au chloroforme, à l'acétate d'éthyle, au n-hexane des écorces et feuilles de cette plante. Il s'agit de l'effet chimio suppressif dose dépendant de la croissance de *P. falciparum*, *P. yoelii nigerense* et de *P. berghei* (*in vitro* : après 15 jours d'inoculation, *in vivo* :

4 jours d'infection chez la souris). De plus, l'effet suppressif amélioré a été obtenu par combinaison de l'extrait avec l'Artémisinine, la Chloroquine et l'Halofantrine (**Bickii et al., 2000 ; Ijarotimi et al., 2010; Agbedahunsi et al., 2013; Nurain et al., 2018**).

#### (d) Antimicrobiennes et antivirales

Les travaux d'**Oyewale et al. (2016)** sur les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et écorces ont montré qu'ils possèdent des effets microbicides contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichophyton rubrum* et *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*. Les extraits bruts des écorces de racines ont également présenté des activités antimicrobiennes (**Moundipa et al., 2005**). Tandis que, l'extrait au chlorure de méthylène/méthanol (1:1, v/v) et la fraction F25 (plus active) des écorces inhibent *in vitro* la réplique du virus de l'hépatite C (**Galani et al., 2016**).

#### I.3.1.5.3. Données toxicologiques

L'extrait aqueux (400 mg/kg) des écorces, administré chez des souris est sans effet sur les paramètres hématologiques (teneur en hémoglobine, le nombre de globules rouges, globules blancs et plaquettes) excepté l'augmentation de la teneur en lymphocytes (**Nurain et Bewaji, 2017**). De même, aucune altération histopathologique des reins, du foie et de la rate des rats traités avec cet extrait n'a été observé (**Bumah et Agbedahunsi, 2009**).

#### I.3.2. *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter

##### I.3.2.1. Etude botanique et Taxonomie

De son nom scientifique *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter, cette plante est encore appelée *Cryptolepis barteri* (K. Schum), *Strophantus radcliffei* (Moore), *Cryptolepis triangularis* ou encore *Pergularia sanguinolenta*. Elle est également connue sous de nombreux noms vernaculaires : Quinine du Ghana (Ghana), *Nurubima* (langue Guans), *Kadze* (langue Ewe), *Nimiba* (langue Twi et Ashanti), *Paran pupa* (langue Yoruba), *Kpokpo-yangolei* (langue Mende), *gangamau* (langue Haoussa), *Koli mekari* (langue Bantou), *ouidoukoi* (langue Bambara), *nombon* (langue Dioule) et *Biwodo* (langue Ewondo). (Thornell, 2004 ; Yakubu, 2006).

## Chapitre I : Revue de la Littérature

*Cryptolepis sanguinolenta* appartient à la/l' :

**Embranchement** *Magnoliophyta*

**Classe** *Magnoliopsida*

**Sous-classe** *Asteridae*

**Ordre** *Gentianales*

**Famille :** *Apocynaceae*

**Sous-famille** *Periplocaceae*

**Genre :** *Cryptolepis*

**Espèce :** *Sanguinolentza*

(Venter et Verhoeven, 1997)



**Photo 2 :** Feuilles et Fleurs de *Cryptolepis sanguinolenta* (Tropical Plant Database, 2014)

### I.3.2.2. Caractéristiques morphologiques

*C. sanguinolenta* est un arbuste rampant à tiges fines (liane) pouvant atteindre 3 à 5 m de hauteur et contenant une sève jaune orangée qui devient rouge à maturité (Photo 2). Ses feuilles sont opposées, simples et entières, lisses, à limbe généralement elliptiques (5 cm de long, 3 cm de large), avec un apex peu acuminé, cunéiforme et parfois aigu ou arrondi à la base. Les fleurs de coloration jaune verdâtre sont bisexuées, régulières d'environ 1,5 cm de long. Le fruit de *C. sanguinolenta* est une paire de follicules linéaires étalés, chacun étroitement cylindrique atteignant 18×0,5 cm ; tandis que les graines mesurent 10 à 12 mm de long et possèdent une touffe de poils soyeux à l'extrémité terminale (Ameyaw, 2012).

### I.3.2.3. Origine, distribution et habitat

*C. sanguinolenta* est originaire de l'Afrique de l'Ouest (Sénégal, Nigeria, Ghana, Côte-d'Ivoire...) et se trouve principalement dans les forêts tropicales humides, les fourrés et les écologies montagneuses et dans certaines régions d'Afrique Centrale tels que le Cameroun et le Congo-Brazaville. Elle pousse généralement près de l'eau, depuis le niveau de la mer jusqu'à 850 m d'altitude. Les graines de *C. sanguinolenta* perdent rapidement leur viabilité. Cependant, fraîchement récoltées, elles présentent une germination de 90-100 % (Jansen et Schmelzer, 2010).



### I.3.2.4. Utilisations en médecine traditionnelle

*C. sanguinolenta* est utilisée traditionnellement pour traiter diverses maladies (Tableau IV).

**Tableau IV** : Utilisations traditionnelles de *C. sanguinolenta*

Organes	Modes de préparation	Indications	Références
<b>Parties aériennes</b>	Infusion	Diarrhée	<b>Tona et al., 1998</b>
<b>Feuilles</b>	Bandages Baumes	Maladies entériques, insomnies, amibiases, Diabète, Plaies	<b>Tona et al., 1998</b> <b>Neuwinger, 2000</b>
<b>Racines feuilles</b>	Décoction à l'eau; Macération	Hypertension, Conditions inflammatoires, Paludisme Fièvre, infections de voies respiratoires supérieures et urinaires, Maux de l'estomac et intestinaux, Tuberculose, Hépatite	<b>Tempesta, 2010</b> <b>Neuwinger, 2000</b> <b>Claude et al., 2012</b>
<b>Racines</b>			

### I.3.2.5. Données phytochimiques et pharmacologiques

#### I.3.2.5.1. Phytochimie

L'analyse phytochimique des racines et feuilles de *C. sanguinolenta* a montré la présence par ordre décroissant d'alcaloïdes, d'hydrates de carbohydrates, de sucres réducteurs, de protéines, et une variété d'autres métabolites secondaires (saponines, tannins, flavonoïdes et terpénoïdes (Tona et al., 1998 ; Odoh et Akwuaka, 2012 ). De même, les études de Mills-Robertson et al. (2009) ont mis en évidence la présence de sucres réducteurs, polyuronides, alcaloïdes et anthocyanosides dans les extraits aqueux, éthanoliques et au chloroforme. L'alcaloïde majeur présent dans les racines de *C. sanguinolenta* est l'indoloquinoline cryptolepine. D'autres alcaloïdes reportés chez cette plante comprennent la quindoline, la spirononacyclique et cryptoheptine (Osafu et al., 2017).

#### I.3.2.5.2. Activités biologiques

La popularité ethno médicinale de *C. sanguinolenta* a justifié les diverses activités de recherches menées et publiées (Osafu et al., 2017).

##### (a) Activités antioxydantes et anti-radicalaires

La 11-hydroxycryptolepine contrairement aux autres dérivés alcaloïdes de cette plante (cryptoquindoline, quindoline, cryptolépine, neocryptolépine, and biscryptolépine), inhibe

significativement l'activité de la xanthine oxydase et la production de l'anion superoxyde (Cimanga *et al.*, 2000).

### (a) Activités anti-inflammatoires et analgésiques

L'extrait éthanolique des racines de *C. sanguinolenta* inhibe *in vitro* l'expression de COX-2 et la production de TNF- $\alpha$ , IL-6 induit par IL-1 $\beta$  chez les cellules neuronales (Olajide *et al.*, 2013). Tandis que l'extrait méthanolique a montré un effet inhibiteur dose dépendant de l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine, le formol ou le dextrane (Odoh *et al.*, 2012). La cryptolépine réduit également l'œdème de la patte et la pleurésie chez le rat. De plus, la cryptolépine possède des effets analgésiques et inhibe *in vitro* la production de NO, la liaison à l'ADN de NF- $\kappa$ B, la perméabilité microvasculaire et les contractions abdominales induits chez la souris par LPS et l'acide acétique respectivement. (Olajide *et al.*, 2010). Cet alcaloïde a montré des effets anti-inflammatoires et analgésiques sans induction des lésions gastriques (Olajide *et al.*, 2010).

### (b) Activités antipaludiques

Komlaga *et al.* (2015) dans l'analyse de la composition de diverses préparations de plantes médicinales et des produits à base de plantes commercialisés, pour le traitement du paludisme dans la région Ashanti au Ghana a montré que la majorité (47,8 %), contiennent *C. sanguinolenta*. En effet, l'extrait aqueux des racines et feuilles inhibe *in vitro* et *in vivo* la croissance des souches chloroquino résistantes et sensibles de *P. falciparum* avec des CI50 de 1 à 2  $\mu$ g/mL (Grellier *et al.*, 1996). De tous les composés présents, les alcaloïdes indoliques contribuent fortement à l'arsenal thérapeutique dans le traitement du paludisme (Frederich *et al.*, 2008). La cryptolépine a également présenté *in vitro* des activités antipaludiques contre diverses souches *P. falciparum* avec des CI50 de 0,2 à 0,6  $\mu$ M (Kirby *et al.*, 1995). De plus, un effet synergique en combinaison avec des dérivés d'artémisinine (artésunate, artemether, dihydroartémisinine et amodiaquine) a été observé *in vitro* contre les gamétocytes en phase tardive de *P. falciparum*. *In vivo*, la cryptolépine inhibe le développement de *P. vinckei petteri* et *P. berghei* chez les souris (Grellier *et al.*, 1996). Selon les travaux d'Onyeibor *et al.* (2005), l'activité antipaludique de cette plante résulte de l'effet inhibiteur de la polymérisation de l'hémozoïne par la cryptolépine. En outre, en 2010, un essai clinique a été menée pour tester l'efficacité d'une formulation de thé contenant 2,5 g de poudre de racine de *C. sanguinolenta* sur 44 sujets atteints de paludisme non compliqué. Trois prises de cette formulation pendant



trois jours ont permis la réduction significative de la parasitémie chez 50 % des sujets, et chez tous les sujets de l'étude après 7 jours (**Bugyei et al., 2010**).

### (c) Activités antimicrobiennes

Les travaux de **Boakye-Yiadom (1979)** et **Mills-Robertson et al. (2009)** confirment les activités des extraits aqueux (chaud et froid), éthanolique et au chloroforme de cette plante contre un large spectre de bactéries (*Candida. albicans* et *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*). Ces auteurs attribuent ces activités à la présence des dérivés alcaloïdes principalement la cryptolépine, qui cause des changements morphologiques et des dommages cellulaires (**Mills-Robertson et al., 2009**). L'inhibition de l'intercalation de l'ADN et la topoisomérase II est le mécanisme d'action impliqué dans les effets antibactériens (**Ansah et al., 2005**).

### (d) Activités anticancéreuses

Les activités anticancéreuses de *C. sanguinolenta* ont principalement été attribuées à la cryptolépine, bien que d'autres études impliquent les dérivés d'autres alcaloïdes (**Ansah et Mensah, 2013 ; Gudivaka, 2014 ; Wang et al., 2014**). La cryptolépine inhibe la transcription du gène NF- $\kappa$ B dans diverses cellules et induit l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose dans des cellules cancéreuses pulmonaires A549 (**Zhu et Gooderham, 2006**). L'interférence de la cryptolépine avec l'activité de NF- $\kappa$ B conduit à la régulation en baisse des gènes inflammatoires et anti apoptotiques tels que COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , et Bcl-2 (**Ansah et Mensah, 2013 ; Pal et Katiyar, 2016**).

#### I.3.2.5.3. Données toxicologiques

**Ajayi et al. (2012)** a démontré que le traitement des souris par l'extrait éthanolique n'entraîne aucune variation des paramètres hématologiques. En outre, la cryptolépine (25-100 mg/kg, *a.o*) et en combinaison avec l'artésunate (4 mg/kg) ou artemether (50 mg/kg) (n'a montré aucune toxicité aiguë, et aucun changement morphologique dans le rein, la rate, l'estomac et les tissus hépatiques (**Donkor et al., 2016**).

## I.4. METHODES UTILISEES POUR INDUIRE L'INFLAMMATION

Les méthodes d'études des activités anti-inflammatoires des extraits de plantes médicinales sont très nombreuses. Dans les différents modèles, l'inflammation est produite sur les cellules en cultures (tests *in vitro*) ou sur les animaux de laboratoires (tests *in vivo*) par différents inducteurs en libérant des médiateurs inflammatoires (**Nile et Park, 2013**). Les

## Chapitre I : Revue de la Littérature

techniques les plus couramment utilisées sont récapitulées dans le tableau V. *In vitro*, le Diclofénac, l'Acide acétylsalicylique et l'Indométhacine sont les médicaments les plus fréquemment utilisés comme standard (Sarveswaran *et al.*, 2017).

**Tableau V : Méthodes d'évaluation des activités anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo***

<i>Tests in vitro</i>			
Agent Physiologique	Modèles expérimentaux	Effets	Références
<b>LPS</b>	Cellules Raw 264.7	Augmentation de la production de NO, des Radicaux libres et des Cytokines pro inflammatoires	<b>Cheenpracha <i>et al.</i>, 2010 ; Kang <i>et al.</i>, 2011 ; Hwang <i>et al.</i>, 2011 ; Hendra <i>et al.</i>, 2011 ; Hur <i>et al.</i>, 2012 ; Tosun <i>et al.</i>, 2014 ; Sarveswaran <i>et al.</i>, 2017</b>
	Cellule microgliale transformée BV-2	Augmentation de la production de NO	<b>Hosseini <i>et al.</i>, 2014</b>
<b>Chaleur</b>	Globules rouges	Hémolyse	<b>Rajendra et Lakshni, 2008</b>
<i>Tests in vivo</i>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Acide arachidonique</b> (Application à la surface de l'oreille),</li> <li>-<b>Huile de croton</b>, (Application locale dans l'oreille),</li> <li>-<b>Carragénine, Formol</b> (Injection dans la patte postérieure),</li> <li>-<b>Albumine de l'œuf</b> (injection intra-articulaire dans la patte postérieure), <b>phorbol myristate acétate</b> (application sur la surface de l'oreille gauche)</li> </ul>	rat, souris	Œdème	<b>Aldjia, 2012 Nile et Park (2013) Mansour, 2015 Hayat, 2015 Sarveswaran <i>et al.</i>, 2017</b>
<b>Acide acétique</b> (injection intra-péritonéale)		Augmentation de la perméabilité vasculaire péritonéale	<b>Ayoub, 2011</b>

LPS : Lipopolysaccharide bactérien ; NO : Oxyde nitrique

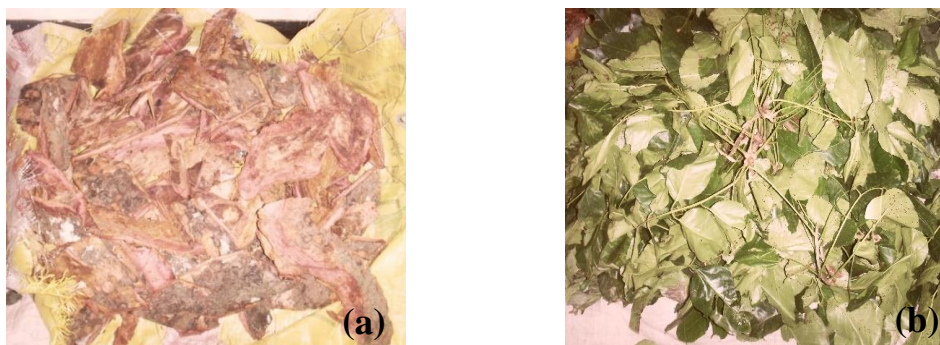
*Chapitre II :*  
*Matériel et Méthodes*

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### II.1. MATERIEL

#### II.1.1. Matériel végétal

Les échantillons d'écorces de *K. grandifoliola* et de feuilles de *C. sanguinolenta* utilisés pour l'extraction des polysaccharides ont respectivement été collectés en Novembre 2014 dans l'arboretum de Mbalmayo (Département du Nyong-et-So'o, Région Centre) et dans la forêt de la localité d'Ongot (Département de la Mefou Akono; Région du Centre). Après identification à l'Herbier National du Cameroun (HNC) en référence aux souches N° 52658 SFR Cam (Société Forestière du Cameroun) et N° 28247/SFR Cam respectivement pour *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* ; les échantillons ont été séchés au laboratoire à l'air libre sur une bâche à l'abri de la lumière du soleil pendant deux semaines puis broyés. Les poudres obtenues ont été conservées dans un bocal fermé à l'abri de l'humidité et de la lumière (Photo 3).



**Photo 3 :** Ecorces de *Khaya grandifoliola* (a) et feuilles de *Cryptolepis sanguinolenta* (b) récoltées et mises à sécher.

(Photographié par **Mediesse K.F.**, 2014)

#### II.1.2. Matériel biologique

##### II.1.2.1. Sang veineux

###### a) *Considération éthique*

Cette étude a reçu l'approbation du Comité National d'Ethique sur la Recherche et la Santé Humaine (N° 2015/03/568/CE/CNERSH/SP) en 2015 (Annexe 8) pour le recrutement au Centre de Biotechnologie (CBT) de Nkolbisson de 05 participants (2 femmes et 3 hommes) sur la base des critères suivants :

###### Critères d'inclusion

- Etre âgé entre 23 et 30 ans, résider à Yaoundé et avoir donné son consentement pour participer à l'étude.

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

### Critères de non-inclusion

- Avoir de la fièvre ( $T^{\circ} > 37,5$ ), avoir consommé un médicament anti-inflammatoire ou antipaludique (deux semaines) ou l'alcool (24 h) avant l'étude, ou être en période de menstruation.

La notice de consentement éclairé et le questionnaire de l'étude sont décrites en langue française et anglaise en Annexe 9 et 10.

#### **b) Prélèvement du sang veineux**

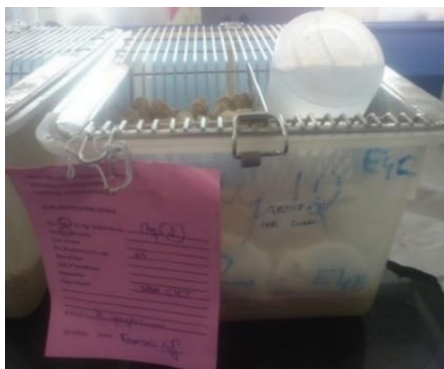
Cinq millilitres de sang veineux ont ainsi été prélevés après obtention du consentement du donneur et ont été introduits dans des tubes avec anticoagulant héparine pour l'extraction des cellules mononuclées du sang périphérique.

### **II.1.2.2. Lignées cellulaires**

Les cinq lignées cellulaires utilisées pour les tests *in vitro* dans cette étude sont la lignée cellulaire de macrophage du sang de souris immortalisée (RAW 264.7), les lignées cellulaires humaines cancéreuses de glioblastome (U87) et neuroblastome (IMR32), et d'adénocarcinome alvéolaire (A549) et mammaire (MDA-MB 231) (Annexe 11). Ces dernières provenaient de la banque de lignées cellulaires du *National Centre for Cell Science, NCCS, Pune (Inde)*.

### **II.1.3. Matériel Animal**

Des souris mâles de souche BALB/c, âgées de 08 semaines et pesant entre 25 à 35 g ont été utilisées pour l'étude *in vivo*. Ces animaux ont été fournis par l'animalerie du *Birla Institute of Technology and Sciences (BITS) (Inde)*. Les animaux ont été logés dans des cages en polypropylène possédant des couvercles en maille métallique, puis exposés à la température ambiante (TA) du laboratoire ( $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) et à un cycle lumière obscurité de 12 h. L'alimentation de base et l'abreuvement à l'eau courante étaient fournis à volonté (Photo 4). Les animaux ont été acclimatés pendant 07 jours, marqués et regroupés aléatoirement ( $n=6$ ).



**Photo 4 :** Exemple de lot de souris de l'étude (Photographié par **Mediesse K. F., 2015**).

### II.1.4. Matériel de laboratoire

#### a) Réactifs

- Solution antibiotique liquide (Himedia) ;
- Milieu complet RPMI 1640 (RPMI 1640, humain type AB, d'Hepes 1 M, L-glutamine 200 mM et gentamicine 50 mg/mL) (Himedia);
- MTT: Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium (Sigma life science, USA);
- *Minimum Essential Medium* (MEM) (Invitrogen, USA);
- Milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Invitrogen, USA);
- *Foetal Bovin Serum* (FBS) (Invitrogen, USA);
- *PCR Master Mix: KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR* (BIO-RAD CFX)
- *Kit Verso cDNA Synthesis* (Thermo scientific, #AB-1453A)
- *RNA Xpress* (Himedia, MB601-100M)
- *Human Premixed Multi-Analyte Kit HCYTOMAG-60K-05* (R&D Systems, Inc. Minneapolis. MN 55413, USA)

#### b) Equipements

- Centrifugeuse
- Etuve
- Bain Marie
- Lyophilisateur
- Spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu
- Hotte de Biosécurité de type II
- Microscope optique Motio BA 210
- MJ Mini<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)
- BIO-RAD CFX Connect Real Time System<sup>TM</sup> (BIO-RAD Laboratories, Inc)
- Agitateur de microplaques Lab-line, Melrose Park, IL
- Appareil LUMINEX (LiquichipM100 QIAGEN, Valencia, CA)
- Spectrophotomètre à lecteur de plaque (SpectraMaxplus 4)
- *Digital Actophotometer* (Dolphin<sup>TM</sup>)
- Rota Rod (Dolphin<sup>TM</sup>)

## II.2. METHODES

### II.2.1. Préparation des extraits polysaccharidiques

#### II.2.1.1. Extraction des polysaccharides solubles totaux (PoS)

L'extraction des polysaccharides solubles totaux a été effectuée suivant le protocole de **Dehong et al. (2014)**. Ainsi, dix grammes de poudres d'écorces de *K. grandifoliola* et de feuilles de *C. sanguinolenta* ont été solubilisés dans 200 mL d'eau distillée et le mélange a été chauffé à 80 °C pendant 3 h. Après centrifugation (4000 g; 20 min, 25 ± 1 °C [température ambiante : TA]), L'opération a été répétée avec le culot, puis les deux (02) surnageants récupérés à l'aide d'une pipette ont été mélangés et ajoutés à quatre (04) volumes d'éthanol 95 %. Ensuite, le mélange a été incubé à 4 °C pendant 48 h et filtré à l'aide du papier Whatman N°10. Le Filtrat obtenu a été centrifugé (4000 g ; 30 min, TA) et le culot représentant les polysaccharides solubles totaux ou bruts a été solubilisé dans 5 mL d'eau distillée, dialysé contre de l'eau distillée (<14 000 MWCO) pendant 72 h et lyophilisé (Figure 9).

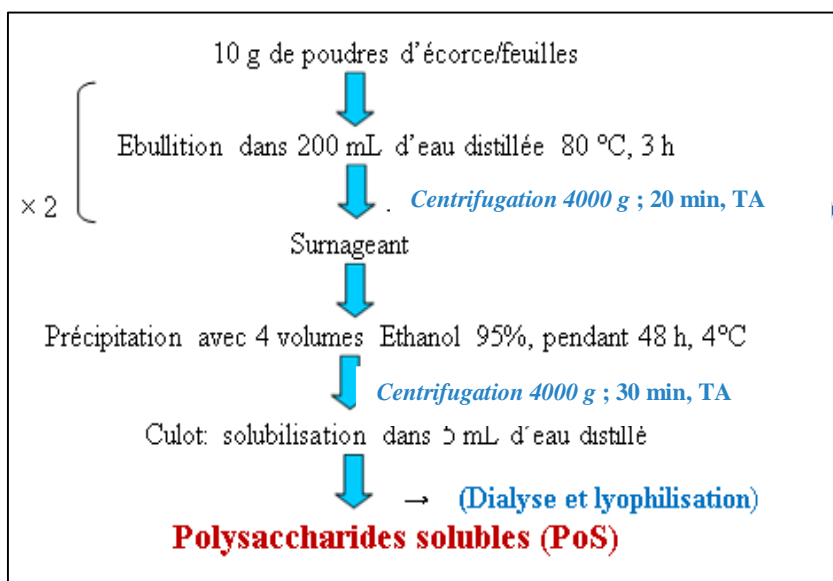


Figure 9 : Etapes d'extraction des polysaccharides solubles totaux (PoS)

#### II.2.1.2. Extraction des polysaccharides pariétaux

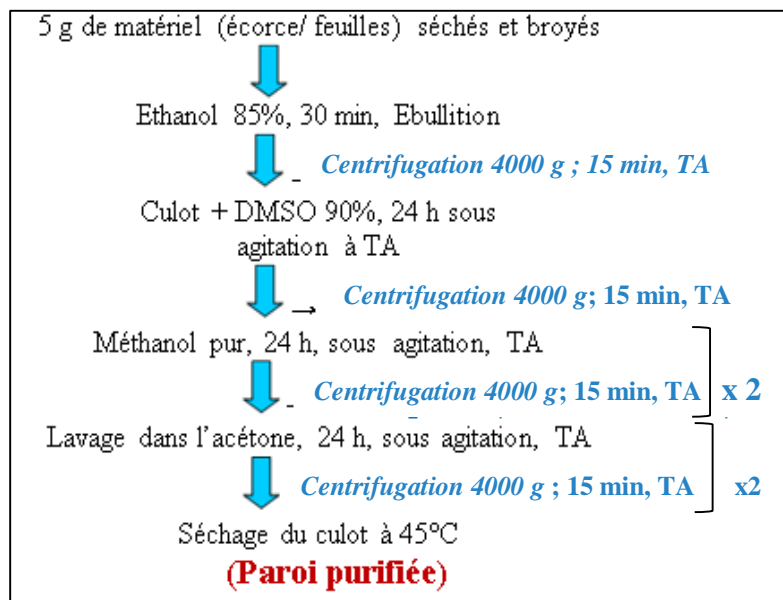
##### II.2.1.2.1. Isolement de la paroi cellulaire

L'isolement de la paroi cellulaire s'est effectué selon le protocole de **Ray et al. (2004)**. Pour cela, cinq grammes de poudre d'écorces de *K. grandifoliola* ou de feuilles de *C. sanguinolenta* ont été chauffés à 80 °C pendant 30 min dans 100 mL d'éthanol 85 % (v/v). Après centrifugation (4000 g; 30 min, TA), le surnageant a été éliminé et le culot obtenu a été



## Chapitre II : Matériel et Méthodes

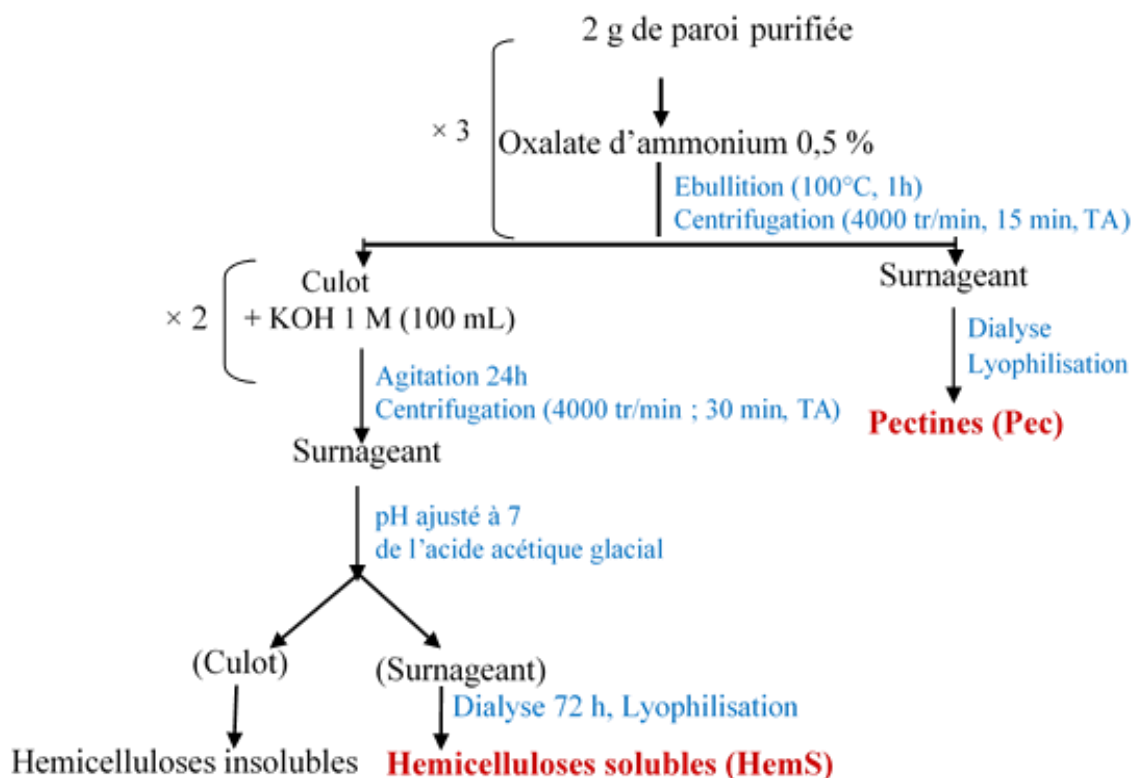
suspendu dans 100 mL de DMSO 90 % (v/v) puis laissé sous agitation à TA pendant 24 h. Ensuite, le mélange a été centrifugé (4000 g ; 15 min, TA) et le culot lavé successivement deux fois avec le méthanol 95 % (v/v) et l'acétone. L'opération a été répétée dans du méthanol 95 % puis le culot méthanolique a été lavé à deux reprises à l'acétone, séché à l'étuve à 45 °C pendant 2 h et constituait ainsi la paroi cellulaire brute (Figure 10).



**Figure 10 :** Etapes d'extraction de la paroi cellulaire

### II.2.1.2.2. Extraction des pectines (Pec) et hémicelluloses solubles (HemS)

L'extraction des pectines et des hémicelluloses solubles a été réalisée selon le protocole de **Ray et al. (2004)**. Pour cela, deux grammes de paroi purifiée ont été dissouts à trois reprises dans 100 mL d'oxalate d'ammonium 0,5 % (p/v) et le mélange chauffé à 100 °C pendant une heure. Les surnageants combinés représentant l'extrait pectique totale (Pec) a été récupéré après centrifugation (4000 g ; 15 min, TA) à l'aide d'une pipette. Tandis que les culots ont été traités à deux reprises pendant 24 h avec 100 mL de KOH 1 M (p/v) à TA et sous agitation afin d'extraire les hémicelluloses. Après centrifugation (4000 g, 30 min, TA), les surnageants ont été récupérés à l'aide d'une pipette, combiné et leur pH ajusté à 7 par ajout de l'acide acétique glacial. La neutralisation s'accompagne de la formation de deux phases constituées respectivement des hémicelluloses solubles et insolubles. La séparation des deux phases a été effectuée par centrifugation (4000 g, 30 min, TA) et le surnageant constituait l'extrait hémicellulosique soluble (HemS). Les extraits Pec et HemS ont été dialysés contre de l'eau distillée pendant 72 h puis lyophilisés (Figure 11).



**Figure 11** : Etapes d'extraction séquentielle des pectines (Pec) et hémicelluloses solubles (HemS)

## II.2.2. Préparation des fractions polysaccharidiques solubles

### II.2.2.1. Préparation de la fraction polysaccharidique de faible poids moléculaire

Les polysaccharides solubles de faible poids moléculaire ont été extraits suivant le protocole de **Thangam et al. (2014)**. Pour cela, 200 g de poudre de chaque plante d'intérêt ont été délipidées et dépigmentées par solubilisation dans 500 mL de méthanol 60 % suivi de 48 h d'agitation à l'agitateur électrique « shaker ». Après centrifugation du mélange (4000 g ; 20 min, TA), le culot a été séché à l'étuve à 40 °C pendant 2 h. La nouvelle biomasse sèche a été suspendue dans de l'eau distillée (1:10 ; p/v) et le mélange chauffé à 80 °C (2 h) au bain marie. L'opération a été répétée et les deux surnageants obtenus après centrifugation (4000 g ; 20 min, TA) ont été filtrés et ajoutés à deux (02) volumes d'éthanol 95° pendant 48 h à 4 °C. Le précipité obtenu par centrifugation (4000 g ; 5 min, TA) a été solubilisé dans de l'eau distillée et le mélange Butanol-Chlorure de méthylène (1:4, v/v) a été ajouté pour enlever les protéines par agitation vigoureuse pendant 30 min. Après centrifugation (4000 g ; 5 min, TA), le surnageant a été récupéré, dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 h et lyophilisé. Les poudres obtenues représentaient les fractions polysaccharidiques de faible poids moléculaires de *K. grandifoliola* (FKG) et *C. sanguinolenta* (HCS) (Figure 12).

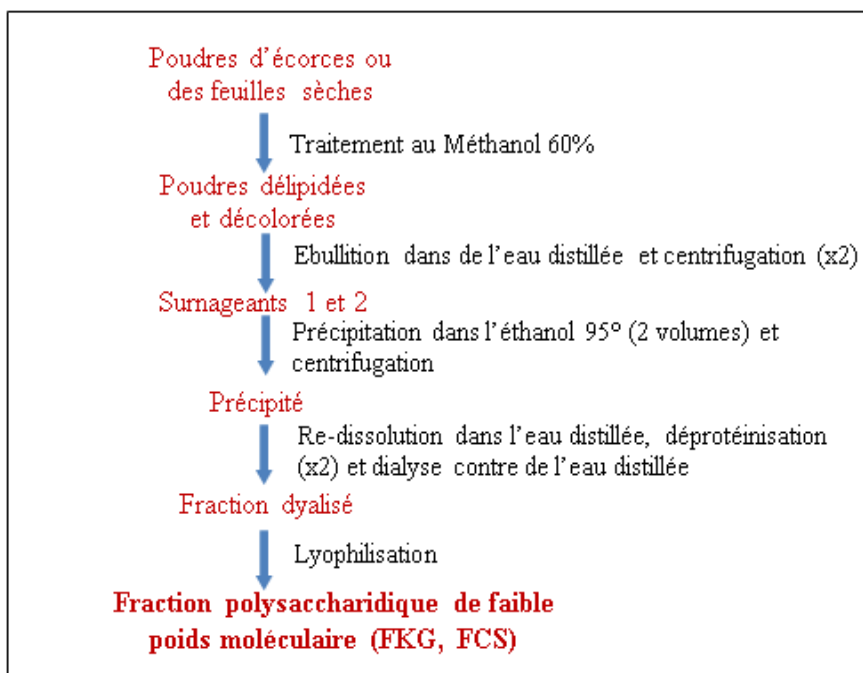
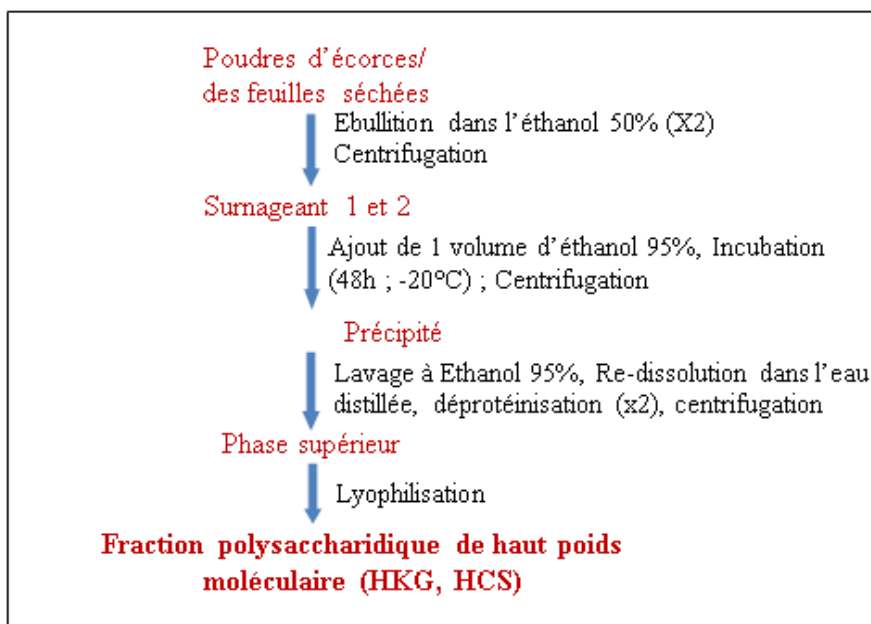


Figure 12 : Etapes d'extraction des polysaccharides de faible poids moléculaire

#### II.2.2.2. Préparation de la fraction polysaccharidique de haut poids moléculaire

Pour l'extraction des polysaccharides de haut poids moléculaire de chaque plante (Grzanna *et al.*, 2006), les poudres obtenues après broyages ont été chauffées à 80 °C dans l'éthanol 50 % pendant 2 h (1 :10, p/v). Cette opération a été répétée, puis, les surnageants ont été combinés et leur concentration ajustée à 75 % par addition d'un volume d'éthanol 95°. Après incubation (-20 °C ; 48 h), le précipité a été lavé avec l'éthanol 95 %, solubilisé dans de l'eau distillée, puis déprotéiné comme précédemment décrit. Le surnageant obtenu après centrifugation (4000 g; 5 min, TA) a été directement lyophilisé. Les poudres ainsi obtenues représentaient les fractions polysaccharidiques de haut poids moléculaire de *K. grandifoliola* (HKG) et *C. sanguinolenta* (HCS) (Figure 13).



**Figure 13 :** Etapes d'extraction des polysaccharides de haut poids moléculaire

Les rendements d'extraction des extraits polysaccharidiques obtenus ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse du lyophilisat (extrait polysaccharidique)}}{\text{Masse de poudre d'écorces/feuilles}} \times 100$$

### II.2.3. Mesure de la teneur en protéines, en composés phénoliques et analyses des sucres solubles totaux

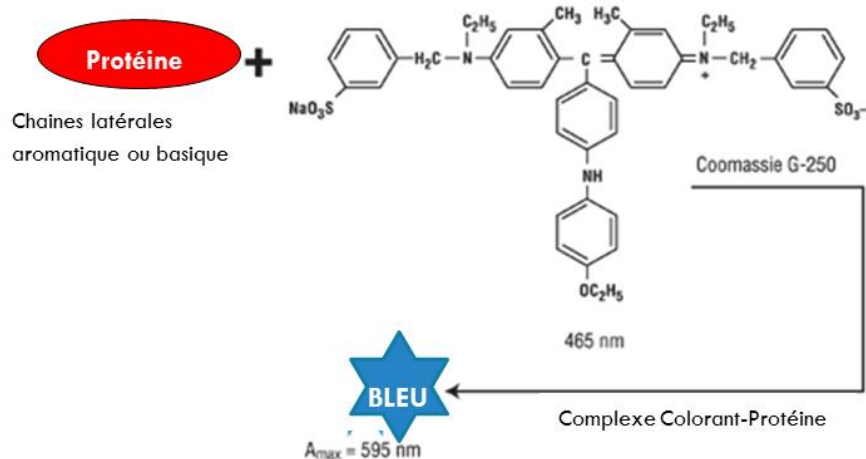
#### II.2.3.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)** utilisant le Bleu de Coomassie G250.

#### *Principe :*

En milieu acide, le Bleu Brillant de Coomassie G250 de couleur brun clair se fixe sur les résidus hydrophobes des acides aminés constituant les protéines pour former un complexe de coloration bleu absorbant à un maximum de 595 nm et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

## Chapitre II : Matériel et Méthodes



### Protocole :

Dans un tube à essai, 500  $\mu$ L d'extrait ou de fraction polysaccharidique solubilisé dans de l'eau distillée à la concentration 1 mg/mL a été mélangé à 1000  $\mu$ L de réactif de Bradford fraîchement préparé (solution acide de Bleu brillant de Coomassie G250, Annexe 1). Après agitation à l'homogénéisateur électrique «Vortex», le mélange a été incubé à TA et à l'obscurité pendant 20 min. La lecture des densités optiques s'est faite à 595 nm au spectrophotomètre contre de l'eau distillée. Le BSA (Bovin Serum Albumin) aux concentrations 0, 10, 20, 40 et 60  $\mu$ g/mL a été utilisé comme étalon. La quantité de protéines présente a ainsi été exprimée en  $\mu$ g équivalent de BSA par mg (eqBSA/mg) d'extrait ou de fraction polysaccharidique sec (he).

### II.2.3.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été réalisé selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

#### Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu, acide fort de couleur jaune, formé d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration obtenue ayant un maximum d'absorption à 760 nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présente dans le milieu réactionnel.

#### Protocole :

Dans un tube à essai, 75  $\mu$ L d'extrait ou de fraction polysaccharidique solubilisé(e) dans de l'eau distillée à 500  $\mu$ g/mL, 675  $\mu$ L d'eau distillée et 75  $\mu$ L de Réactif de Folin 0.2 N (Annexe 1) ont été successivement ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 3 min à TA puis

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

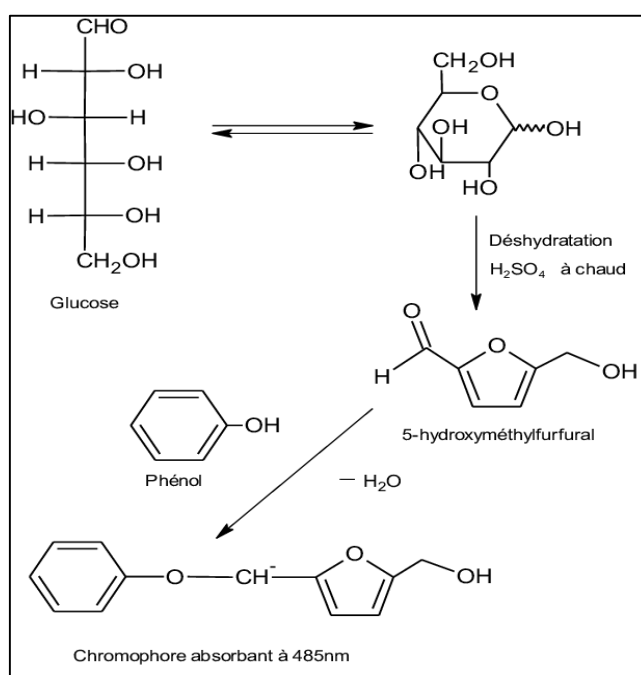
750  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 % (m/v) ont été ajoutés. La densité optique a été mesurée à 760 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 1 h d'incubation à TA et à l'obscurité contre le blanc dépourvu d'extrait ou fraction. L'acide gallique à gradient de concentration a été utilisé comme étalon. La quantité de composés phénoliques présente a été exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique (EAG) par mg d'extrait ou de fraction polysaccharidique sec(he).

### II.2.3.3. Dosage des sucres totaux

La quantité de sucres a été déterminée par la méthode de **Dubois *et al.* (1956)**.

#### Principe :

Les oses en milieu acide et à chaud sont déshydratés en dérivés du furfural. Ces dérivés se combinent facilement avec le phénol et donnent une coloration (orangée) dont l'absorbance est mesurée à 490 nm. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la quantité de sucres présente dans le milieu réactionnel.



#### Protocole :

Dans un tube à essai, 50  $\mu\text{L}$  de fraction polysaccharidique solubilisée dans de l'eau distillée à la concentration 1 mg/mL et 450  $\mu\text{L}$  d'eau distillée ont été introduits. Ensuite 500  $\mu\text{L}$  de phénol à 5 % et 1 mL d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 95 % ont été rapidement ajoutés. Après agitation, une incubation au bain marie (100 °C ; 10 min) a été réalisée suivi d'un refroidissement pendant 30 min à TA à l'abri de la lumière. Une coloration jaune se développe, stable durant plusieurs heures. L'absorbance de la coloration a été déterminée à 490 nm contre

le blanc dépourvu de fraction polysaccharidique. Les teneurs en sucres ont été déterminées en référence à une gamme étalon (0 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50 µg/mL) de glucose et exprimées en µg équivalent de glucose (EG) par mg de fraction polysaccharidique sèche.

### **II.2.3.4. Détermination de la composition monosaccharidique par chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

#### ***Principe***

La composition monosaccharidique des extraits polysaccharidiques a été déterminée par CPG au Laboratoire de Glycobiologie et de la Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) de l'Université de Rouen. C'est une technique chromatographique qui permet la séparation et l'identification des molécules d'un mélange gazeux ou susceptible d'être vaporisé par chauffage. La CPG est une chromatographie d'adsorption où les molécules à séparer sont soumis à une force de rétention par la phase stationnaire solide (par adsorption) et à une force d'entraînement par la phase mobile gazeuse. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des molécules de l'échantillon à analyser et de ce fait à leur séparation.

#### ***Protocole***

##### **Préparation des échantillons**

Avant chaque analyse l'hydrolyse des échantillons s'est fait selon la méthode décrite par **Ray et al. (2004)**. Deux milligrammes des différents extraits ont été hydrolysés dans 1 mL de d'acide trifluoro acétique 4N pendant 2 h à 110 °C. L'inositol (1 mg/mL) a été ajouté comme standard interne à ces solutions avant hydrolyse. Après centrifugation (10 min, 5000 g, TA), les différents surnageants ont été prélevés et lyophilisés. Les monosaccharides présents dans l'hydrolysats ont été traités avec 0,5 mL de méthanol/HCl 1M (Kit methanolic-HCl 3N de Supelco, Bellefonte, USA) pendant 16 h à 80 °C. Ce traitement permet de convertir les monosaccharides présents en leurs glycosyls de méthyls correspondants et les acides uroniques en esters de méthyl, rendant ainsi les polysaccharides volatiles. Ensuite, les échantillons ont été évaporés sous flux d'air à 40 °C, lavés deux fois avec 250 µL de méthanol anhydre et évaporés de nouveau. Deux cent µL de réactif de silylation (kit HMDS+ TMCS+ pyridine, 3/1/9, Supelco, Bellefonte, USA) ont été ajoutés aux échantillons, chauffés (20 min, 80 °C) afin de dériver les glycosides de méthyl en triméthylsilyl glucosides et le réactif de silylation a été évaporé par l'air comprimé à 40 °C. Les échantillons ont enfin été solubilisés dans 1,5 mL de cyclohexane, puis un millilitre de cette solution a été déposé dans des microtubes.



## *Chapitre II : Matériel et Méthodes*

### Chromatographie en phase gazeuse (York et al., 1985)

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon a été prélevé par le passeur d'échantillon et injecté pour l'analyse de son contenu en monosaccharides. Les dérivés triméthylsilylés séparés et volatilisés dans la colonne, ont été détectés par ionisation de flamme chauffée à 250 °C et à 280 °C. Cet appareil fonctionne avec l'hélium, l'air, l'azote et l'hydrogène. L'hélium est le gaz vecteur de la chromatographie et est réglé à 1,40 bars (1,7 mL/min), la pression à 20 psi, la flamme du détecteur fonctionne avec l'hydrogène, l'air et l'azote dont le débit est de 20 mL/min. L'azote est le gaz « make-up » c'est-à-dire qui empêche la contamination dans le détecteur des gaz venant de l'air ambiant. La fuite de gaz est réglée sur un débit de 3 mL/min, le débit d'hydrogène au niveau du détecteur est de 27 mL/min et il est ramené à 300 mL/min avec de l'air.

La colonne, traversée par le flux d'hélium, est équilibrée à la température initiale du programme, 120 °C. Après injection, la température du four au niveau de la colonne augmente graduellement de 10 °C/min jusqu'à 160 °C, puis de 1,5 °C/min jusqu'à 220 °C et enfin de 20 °C/min jusqu'à 280 °C, température à laquelle elle se stabilise. A la fin du cycle, la colonne se refroidit jusqu'à 120°C. Les aires de dérivés triméthylsilylés de chaque monosaccharide sont intégrées (intégrateur STAR Workstation Varian 5.52), additionnées et servent à établir la composition glycosidique relative de la fraction dérivée. L'attribution des pics chromatographiques, issus de l'analyse de la composition de la fraction est réalisée par comparaison des temps de rétention relatifs avec ceux de monosaccharides standards (Figure 14; Tableau VI). De la même façon, la quantification relative des oses est déduite des facteurs de réponse obtenus à partir d'un mélange équimolaire (2 mg/mL) de monosaccharides standards contenant un mélange des différents oses présents dans la paroi (arabinose, Rhamnose, fucose, xylose, acide galacturonique, acide glucuronique, mannose, galactose et glucose) et 50  $\mu\text{L}$  du témoin interne inositol (1 mg/mL). Les résultats obtenus pour chaque ose sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des monosaccharides détectés. Les différents chromatogrammes obtenus sont présentés en Annexe 3.

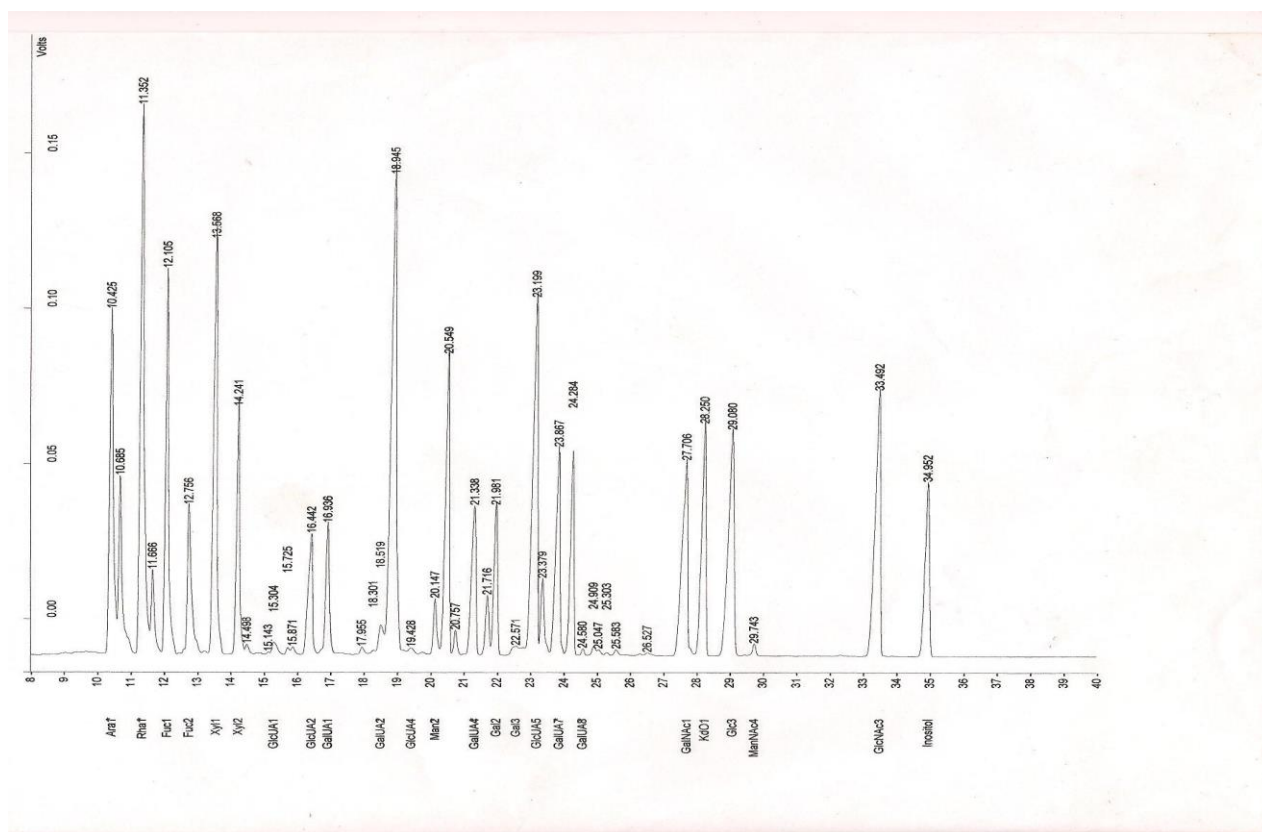


Figure 14 : Chromatogramme standard des oses majoritaires de la paroi végétale

Tableau VI : Temps de rétention des glycosides de méthyle correspondants aux oses standards rencontrés dans la paroi des végétaux.

Oses	Temps de rétention (min)	Oses	Temps de rétention (min)
Arabinose	10,8	Acide galacturonique	17,50
	11,08		19,14
Rhamnose	11,72		21,92
Fuco	12,52		22,35
	13,23		25,31
Xylose	13,98	Galactose	19,63
	14,71		21,13
Mannose	19,44		21,43
Acide glucuronique	16,86		22,63
	24,03	Glucose	23,77
			24,92
		Inositol (témoin)	35,84

## II.2.4. Détermination des propriétés antiradicalaires des extraits polysaccharidiques

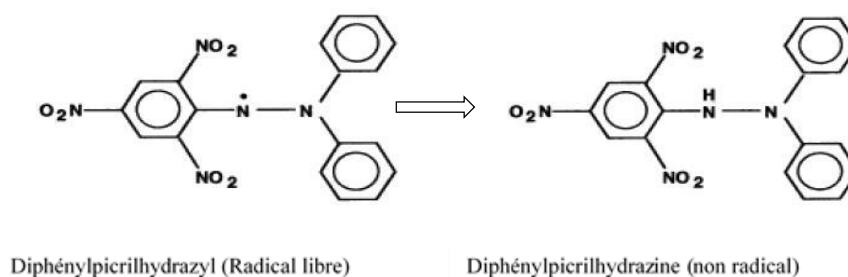
La mesure du pouvoir antiradicalaire des extraits polysaccharidiques des deux plantes s'est effectuée par les tests de piégeage des radicaux libres DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) et ABTS (acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzylthiazoline-6-sulphonique).

### II.2.4.1. Test de piégeage du radical DPPH

Le radical DPPH est un radical stable avec un maximum d'absorption à 517 nm et qui peut facilement être piégé par les antioxydants. Le mécanisme antioxydant de piégeage du radical DPPH• est lié à l'acceptation de l'hydrogène par le DPPH•. Avec l'hydrogène donné par l'antioxydant, le DPPH• est converti en DPPH-H, une forme non-radicalaire. Le modèle de piégeage du radical DPPH• est bien reconnu et largement appliqué pour estimer l'aptitude de piégeage des radicaux libres par divers composés naturels (Jin *et al.*, 2012b). La capacité à donner l'hydrogène décide de leur capacité antioxydante. Dans cette étude, l'évaluation du potentiel anti-radicalaire DPPH a été faite selon le protocole décrit par (Katalinié *et al.*, 2004).

#### Principe

En présence d'antioxydants, le radical DPPH• est piégé par transfert d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant pour former le DPPH-H stable, entraînant une décroissance de l'absorbance mesurée à 517 nm résultant du changement de la couleur initiale (violet) au jaune au fur et à mesure que le radical est piégé. L'intensité de la coloration étant inversement proportionnelle à l'activité des composés anti radicalaires de l'échantillon.



#### Mode opératoire

Une série de tubes de différentes concentrations (50, 100, 200, 300 µg/mL) pour chaque extrait polysaccharidique contenant chacun 500 µL de fraction solubilisé dans de l'eau distillée est mélangée à 500 µL d'une solution méthanolique de DPPH 400 µM fraîchement préparée (Annexe 1). Ensuite, le mélange a été agité vigoureusement et incubé à l'obscurité (30 min, TA). Parallèlement, l'acide gallique et la catéchine (solubilisés dans de l'eau distillée aux concentrations 0,1, 1, 10 et 100 µg/mL) ont été utilisés comme standard. La lecture de la densité

optique a été faite à 517 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à TA et à l'obscurité contre un blanc constitué 500 µL de méthanol et 500 µL d'eau distillée. La solution contrôle était constituée de 500 µL d'eau distillée et 500 µL de solution de DPPH.

L'activité antiradicalaire s'exprimant en pourcentage de radical DPPH réduit, a été calculé comme suit :

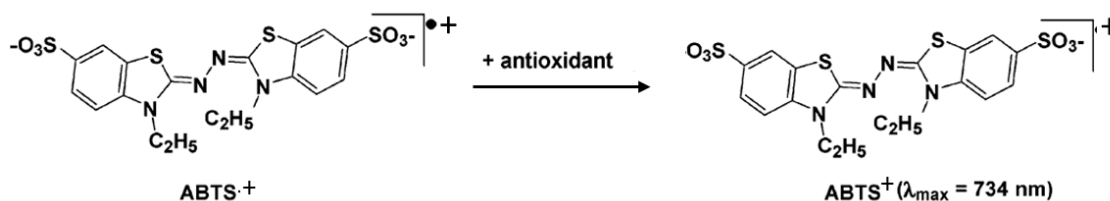
$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO}_{\text{échantillon 517}}/\text{DO}_{\text{Témoin 517}})] \times 100$$

### II.2.4.2. Test de piégeage du radical ABTS

Le test ABTS est une méthode acceptée de mesure du pouvoir antioxydant total d'un antioxydant potentiel. Dans cette étude, l'évaluation du potentiel anti-radicalaire ABTS a été faite selon le protocole décrit par **Re et al. (1999)**.

#### Principe

En présence d'antioxydants donneurs de proton, le radical ABTS<sup>•+</sup> de couleur verte arrache un proton entraînant une décoloration de la solution due à la formation de l'ABTS<sup>+</sup> avec une absorption maximale à 734 nm.



#### Mode opératoire

Un volume de 20 µL d'extrait polysaccharidique solubilisé dans de l'eau distillée à différentes concentrations (50, 100, 200 et 300 µg/mL) a été introduit dans un tube à essai, puis 500 µL du Réactif ABTS fraîchement préparé (Annexe 1) y ont été ajoutés. La densité optique a été déterminée à 734 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à TA et à l'obscurité contre de l'eau distillée (blanc). L'acide gallique et la catéchine utilisés comme standards, ont subi le même traitement aux concentrations de 0,1, 1, 10 et 100 µg/mL. L'extrait a été remplacé par de l'eau distillée dans la solution contrôle. L'activité antiradicalaire a été exprimée en pourcentage de radical ABTS<sup>•+</sup> réduit et calculée comme suit :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO}_{\text{échantillon 734}}/\text{DO}_{\text{Témoin 734}})] \times 100$$

## II.2.5. Mesure de la capacité immunomodulatoire des extraits polysaccharidiques

### II.2.5.1. Isolement et Numération des PBMCs

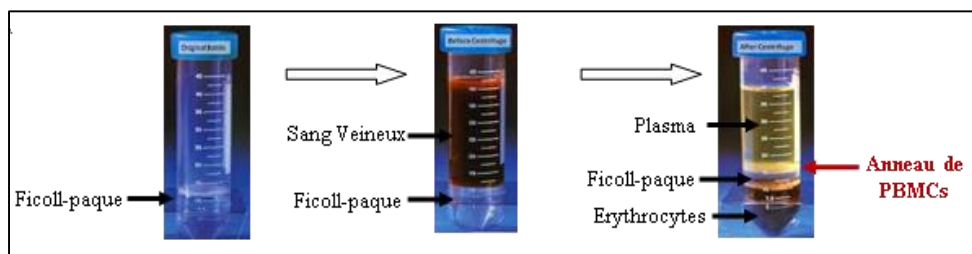
Le sang veineux a été utilisé pour l'isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) par la technique de séparation par gradient de densité utilisant le Réactif Ficoll-Paque (**Chi et Harris, 1978**).

#### *Principe*

La technique de séparation par gradient de densité est basée sur les différences de densités existantes entre les cellules mononuclées, le Ficoll et les autres cellules plus denses telles que les érythrocytes et les polynucléaires. Les globules rouges et les polynucléaires (plus denses que le Ficoll) passent à travers et sédimentent au fond du tube. Alors que les lymphocytes et certains macrophages qui ont une densité plus faible que le Ficoll restent à l'interface du milieu et du Ficoll.

#### *Protocole*

Cinq millilitres de sang veineux ont été prélevés dans des tubes héparines puis délicatement transférés dans des tubes coniques de 15 mL contenant 5 mL de tampon PBS (Phosphate Buffer Salin)-EDTA. Le mélange a ensuite été déposé sur du Ficoll (5 mL) contenu dans un tube conique de 15 mL (le tube est incliné pendant le dépôt afin que le sang forme une couche au-dessus du Ficoll). Après centrifugation (400g ; 25 min, TA), l'anneau de PBMCs (Figure 15) a été récupéré à l'aide d'une pipette stérile jetable et solubilisé dans 5 mL de tampon PBS-EDTA. Après deux lavages au tampon PBS-EDTA par centrifugation (80g ; 5 min, TA), le culot représentant les cellules mononuclées isolées a été suspendu dans 5 mL de milieu complet RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640.



**Figure 15** : Isolement des PBMCs par la technique de séparation par gradient de densité utilisant le Ficoll ([TestBookhaematology4medical-scientist.Blogspot.SG/](http://TestBookhaematology4medical-scientist.Blogspot.SG/)).

### II.2.5.2. Mesure de la viabilité cellulaire

Basée sur les travaux de **Boudjeko *et al.* (2015)** et d'autres travaux récents mettant en évidence les activités antioxydantes et immunomodulatoires des polysaccharides de nombreuses plantes médicinales; la concentration de 200 µg/mL étant la plus active a été choisie comme concentration test pour cette étude. Sur une microplaque de culture cellulaire de 36 puits, 5 x 10<sup>5</sup> cellules /500 µL/ puits ont été introduites dans différents puits. Ensuite 500 µL des différents extraits polysaccharidiques (200 µg/mL) ou des standards, antigène malarique *Merozoite Surface Protein 1* (MSP1, 20 µg/mL) et mitogène Phytohémagglutinine (PHA, 10 µg/mL) solubilisés dans le milieu RPMI 1640. Les cellules ayant été exposées uniquement au milieu de culture complet RPMI 1640 correspondaient au témoin négatif. La plaque a enfin été incubée à 37 °C pendant 48 h avec 5 % de CO<sub>2</sub> et 89 % d'humidité relative (HR).

Après incubation, les contenus des puits ont été récupérés dans différents tubes stériles et centrifugés (80 g ; 5 min, TA). Les culots représentant les cellules PBMCs ont respectivement été suspendus dans 1 mL de milieu complet RPMI 1640. Puis, 50 µL de cette suspension ont été ajoutés à 50 µL de Bleu Trypan (0,4 %) pour la numération des cellules vivantes et mortes sur la cellule de Neubauer au microscope optique.

La cellule de Neubauer est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Elle est principalement utilisée pour la numération des leucocytes. La lame de verre de la cellule de Neubauer est gravée d'un quadrillage comportant 9 grands carrés externes de 1 mm<sup>2</sup> chacun. Les 4 grands carrés externes sont composés de 16 petits carrés de 0.25 mm de côté. Les cellules vivantes (claires) et mortes (colorées en bleu) ont été comptés dans les 4 carrés externes et les moyennes déterminées. Ensuite, la concentration (nombre de cellules vivantes/mL) et la viabilité cellulaire ont été déterminées par les formules suivantes :

$$C : = (\text{Nombre de cellules vivantes comptées dans les 4 carrés}/4) \times (100/50) \times 10^4$$
$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = (\text{nombre de cellules vivantes}/ \text{nombre de cellules totales}) \times 100$$

Une dilution a été effectuée pour l'obtention d'une suspension de PBMCs concentrée à 1 x 10<sup>6</sup> cellules/mL pour les analyses ultérieures.



Photo 5 : Hématimètre de Neubauer (Barbé B *et al.*, 2011)

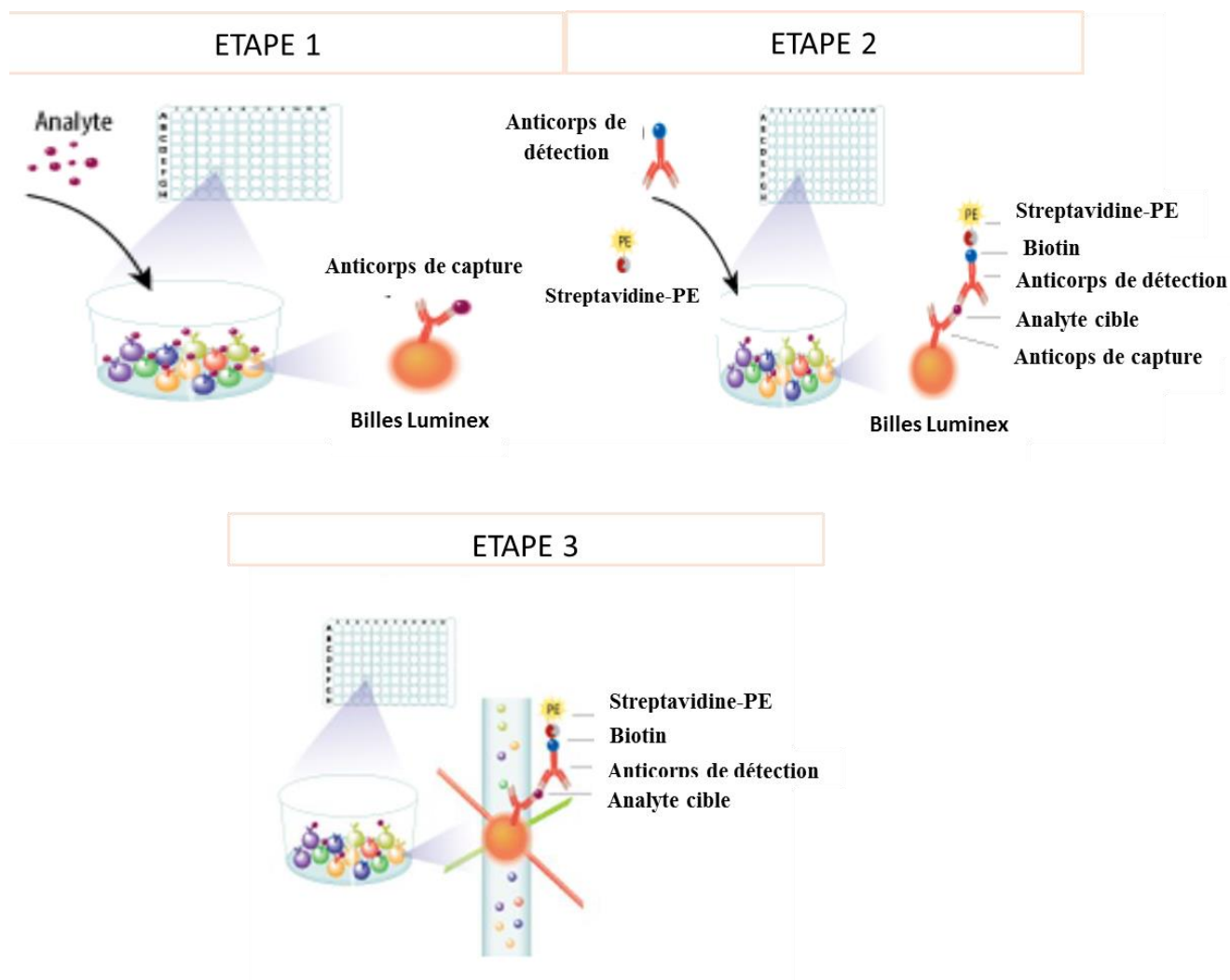
### II.2.5.3. Mesure de la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6 par les PBMCs

Après culture des PBMCs avec les extraits polysaccharidiques et/ou l'antigène malarique MSP1 comme décrit en II.2.5.2. (48 h, 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> et 89 % d'humidité relative), les surnageants obtenus par centrifugation (2500 g ; 5 min, TA) ont été utilisés le dosage des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 par la technique *Magnetic Luminex Screening Assays* (Jager *et al.*, 2003).

#### *Principe*

La technologie du Luminex permet de détecter et de quantifier simultanément un à plusieurs biomarqueurs (1 à 100) dans un micro volume d'échantillon. Il s'agit d'une variante de la technique immunoenzymatique, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) réalisée non pas sur un support mais en suspension. Luminex est basée sur l'utilisation de microsphères (microperles de polystyrène) sur lesquels sont fixés des anticorps dits « de captures ». Ces anticorps permettront la capture des analytes cibles (cytokines) présents dans l'échantillon (Etape 1). Par la suite des anticorps secondaires dits « de détection » couplés à la biotine sont introduits dans les puits et permettront de fixer les molécules de Streptavidine-Phycoérythrine (Streptavidine-PE) qui sont ajoutées à la fin de l'expérimentation. Ces dernières émettent un signal fluorescent grâce à un procédé de bi-coloration, chaque lot de microsphère spécifique à un analyte possède une couleur ou une adresse spectrale spécifique. Ce gradient de coloration permet d'utiliser simultanément jusqu'à cent lots de billes différentes (Etape 2). Lors de la lecture (Etape 3), les billes passent chacune dans le système de lecture de l'appareil Luminex, un cytomètre pourra ainsi premièrement réassocier le signal obtenu via le laser « vert » (635 nm) à l'adresse spectrale de la bille et deuxièmement quantifier l'intensité de la fluorescence via le laser « rouge » (532 nm) à la quantité de Streptavidine-PE liée sur ces billes. Plusieurs analytes peuvent être dosés dans le même puits par introduction du nombre de lot de billes correspondant. L'appareil Luminex les différencie, compte cent billes de chaque lot et réalise une moyenne de la fluorescence (Figure 16).





**Figure 16 :** Principe de la détection et quantification des cytokines par Luminex

Le laser vert détermine l'adresse spectrale (identité de la microsphère et de la cytokine fixée). Le laser rouge détermine la quantité de PE (quantité d'anticorps de détection liée aux antigènes) (<http://www.rndsystems.com>).

**Protocole:**

Les cytokines IL-1  $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  ont été dosées simultanément à l'aide d'un kit de dosage multiplex selon le protocole fourni par le fabricant.

Immédiatement avant utilisation, le stock de la suspension de microsphères liées aux anticorps de capture a été soigneusement remis en suspension par vibration et sonication. Des aliquots de microsphères ont été transférés dans les tubes coniques de 1,5 mL et dilués à 100 microsphères/ $\mu$ L en utilisant une solution du PBS 1X + 1 % de BSA (tampon de dilution). Parallèlement, la plaque de 96 puits a été lavée avec 200  $\mu$ L/puits de PBS-EDTA (tampon de lavage), puis lavée avec 200  $\mu$ L/puits de tampon de dilution. Vingt-cinq microlitres de

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

microsphères dilués ont été introduits dans les puits de microtitrage (2500 microsphères/puits). Puis, dans les puits *Background* (standard à 0 ng/mL), standard et témoin, 25 µL de tampon de charge, de standard et témoin ont été respectivement ajoutés, suivi de 25 µL de milieu RPMI complet. Tandis que dans les puits échantillons, 25 µL de surnageant résultant des différents traitements de PBMCs ont été ajoutés (Annexe 7). Les plaques ont ensuite été scellées avec du papier aluminium et incubées à l'obscurité sous agitation (TA ; 2 h ; 500 rpm). Après incubation, les plaques ont été lavées deux fois avec 200 µL de tampon de lavage et une fois avec du tampon de dilution. Le lavage consistait à introduire le volume de tampon correspondant dans chaque puits, puis fixer la plaque sur un support magnétique et retourner l'ensemble sur du papier adsorbant afin d'éliminer le tampon). La plaque est ensuite retirée de son support et 25 µL d'anticorps de détection ont été ajoutés dans tous les puits et la plaque de nouveau scellée et incubée (1 h, TA, 500 rpm). Puis, 25 µL de Streptavidine-phycoerythrine PE ont directement été ajoutés dans les puits, suivi d'une incubation additionnelle sous agitation (30 min, TA, 500 rpm) et de deux lavages de la plaque avec le tampon de lavage et un lavage avec le tampon de dilution. Enfin 150 µL de tampon de dilution ont été ajoutés dans chaque puits afin de constituer la suspension de microsphères, suivi de l'incubation de la plaque sur l'agitateur de plaque pendant 5 min. L'intensité de la fluorescence a été déterminée par le "Luminex MAGpix Analyzer. Le lecteur a été programmé pour la lecture d'au moins 100 microsphères par adresse spectrale. La courbe des intensités médianes de fluorescences (MFI) des cytokines standard obtenues en fonction de leurs concentrations a permis d'extrapoler les concentrations plasmatiques en pg/mL des différentes cytokines pour chaque échantillon.

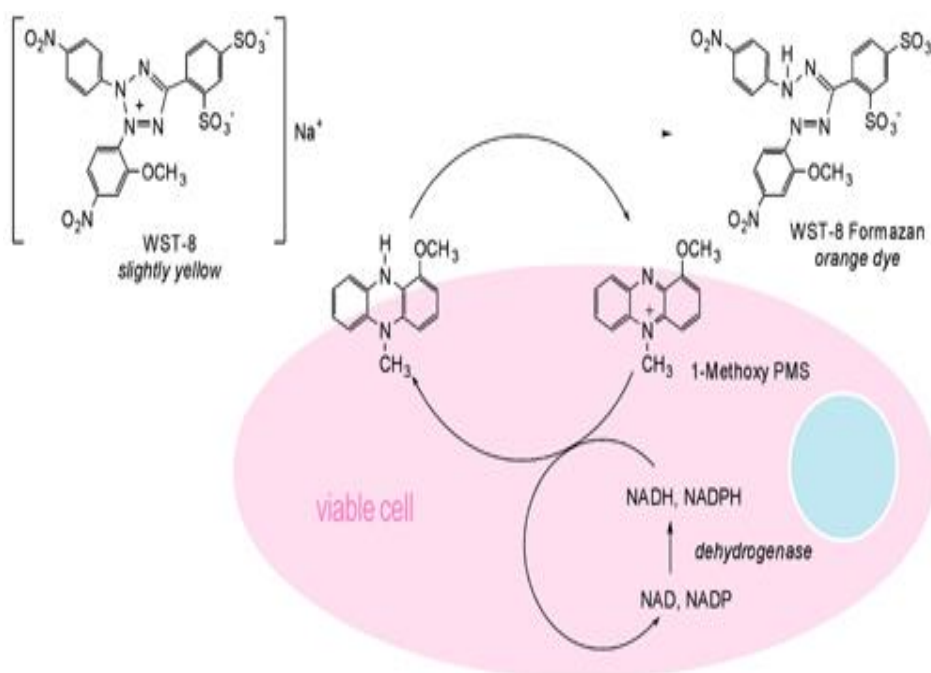
### II.2.6. Mesure de la capacité antiprolifératives des fractions polysaccharidiques

Cinq (05) lignées cellulaires Raw 264.7, U87, IMR 32, MDA-MB 231 et A549 (Annexe 11) ont été utilisées pour évaluer *in vitro* les activités antiprolifératives des fractions polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta* par la méthode de **Mosmann (1983)** utilisant le colorant MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium). La culture cellulaire s'est faite dans les milieux MEM (U87, MDA-MB 231, A549), DMEM/F12 (IMR32) et RPMI (Raw 264.7) supplémenté de 5 % de FBS (Fœtal Bovin Serum, *Invitrogen, USA*) et d'une solution antibiotique (Himedia : L-Glutamine 200 mM, streptomycine 200 µg/mL et de pénicilline 200 U/mL). Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'Humidité Relative (HR) (Annexe 2).

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

### Principe:

Le test MTT permet d'évaluer quantitativement l'activité métabolique des cellules en culture par la mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Il est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium en formazan par réduction enzymatique. En bref, le cycle tétrazolique du MTT, est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan ayant un maximum d'absorption à 590 nm. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes dans le milieu mais aussi à leur activité métabolique.



### Protocole

Après obtention de la suspension cellulaire (Annexe 2). Les cellules RAW 264.7, U87, IMR 32, MDA-MB 231 et A549 (200 µL/puits ; 5 x 10<sup>3</sup> cellules) ont été introduites dans différentes plaques de 96 puits. Une première incubation de 24 h (37 °C ; 5 % de CO<sub>2</sub>, 95% HR) a été effectuée. Ensuite, le milieu de culture a été éliminé de chaque puits et remplacé par le milieu de culture contenant les fractions polysaccharidiques aux concentrations tests (10, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/mL). Les plaques ont encore été incubées pendant 24 h (Raw 264.7) ou 48 h (U87, IMR 32, MDA-MB 231 et A549) et les surnageants de chaque puits ont été remplacés par 100 µL de MTT (0,5 mg/mL dans le PBS 1X stérile) (Sigma life science, USA) suivi d'une incubation additionnelle de 4 h. Après élimination des solutions de MTT, 100 µL/puits de DMSO ont été ajoutés et la densité optique a été mesurée après incubation (10 min ; TA) à 590 nm au spectrophotomètre contre le DMSO (blanc). L'absorbance des cellules

exposées uniquement au milieu de culture (cellules non-exposées aux extraits) représentait le témoin et a été considéré comme correspondant à 100 % de viabilité cellulaire.

Ainsi, les pourcentages d'inhibition de prolifération des différentes fractions polysaccharidiques ont été déterminés par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de cytotoxicité (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Abs (590nm) puits tests}}{\text{Abs (590nm) puits témoin}} \right] \times 100$$

### II.2.7. Mesure de la capacité anti-inflammatoire des fractions polysaccharidiques

#### II.2.7.1. Test d'inhibition de la production de NO par les cellules Raw 264.7 stimulées par le LPS

##### II.2.7.1.1. Traitement des cellules

Les cellules RAW 264.7 (200  $\mu$ L/puits ;  $5 \times 10^3$  cellules) ont été introduites dans une plaque de 96 puits et incubées pendant 24 h (37 °C ; 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % d'humidité) pour leur adhérence au support. Le milieu complet RPMI a ensuite été remplacé par un milieu fraîchement préparé (200  $\mu$ L/puits) contenant les fractions polysaccharidiques à des concentrations croissantes et non-cytotoxiques (10, 50 et 100  $\mu$ g/mL). La production de cellules exposées uniquement au milieu de culture représentait le témoin négatif tandis que celle des cellules exposées au milieu de culture contenant l'aspirine à 1  $\mu$ M (180  $\mu$ g/mL, confirmée non-cytotoxique) représentait le témoin positif. Après une heure de traitement, le LPS à 10  $\mu$ g/mL a été ajouté dans chaque puits suivi d'une incubation supplémentaire de 24 h.

##### II.2.7.1.2. Evaluation de la production de NO

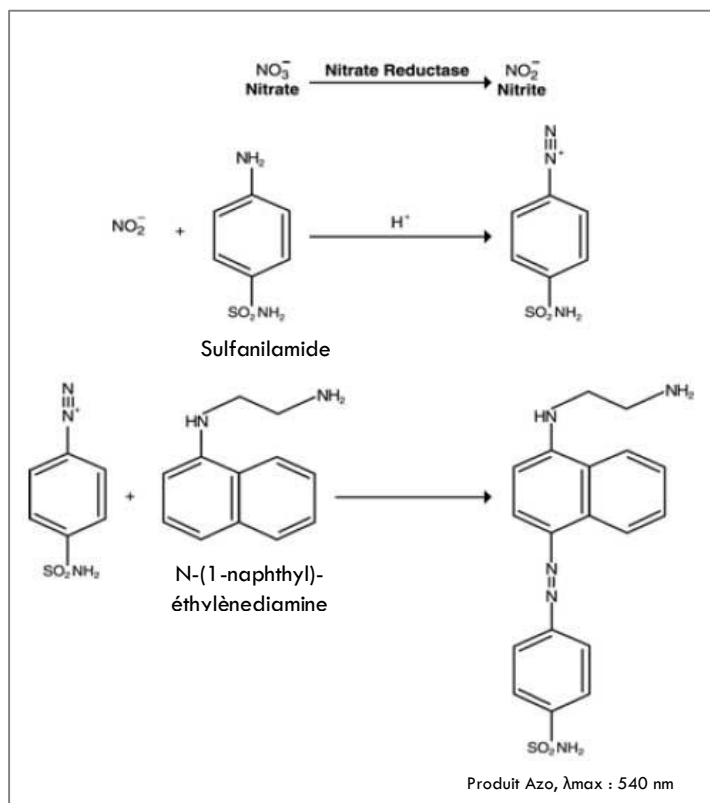
La production de NO dans les milieux de culture a été estimée par dosage des produits de son oxydation en nitrites et nitrates. La concentration des nitrites totaux des surnageants Raw 264.7 prétraités avec les fractions et exposées à LPS a été déterminée par la méthode modifiée de Griess (Sun *et al.*, 2003).

##### **Principe:**

La méthode de Griess repose sur la formation d'un complexe coloré par réaction de diazotation entre l'ion nitrite, une amine primaire aromatique, la sulfanilamide et une autre amine aromatique, le dihydrochlorure de N-(1-naphthyl)-éthylène diamine (NED). Cette réaction de diazotation spécifique de l'acide nitreux se produit en deux étapes. Premièrement, l'ion nitrite réagit avec la sulfanilamide pour former un composé diazoïque (sel de diazonium) qui se combine ensuite en milieu acide (pH<2) avec le NED pour former un composé de

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

coloration rose dont l'absorbance à un maximum de 540 nm est proportionnelle à la concentration des ions nitrites présents dans l'échantillon.



### Protocole:

Comme indiqué en II.2.9.1., 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture de chaque puits, ont été transférés dans des puits d'une nouvelle plaque de 96 puits. Puis, 100  $\mu\text{L}$ /puits de Réactif de Griess fraîchement préparé (Annexe 1) ont été ajoutés. La plaque a été agitée pendant 1 min, incubée (TA ; 15 min) et l'absorbance a été mesurée à 540 nm. La concentration en nitrite dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'étalonnage obtenue à partir d'une série de dilution du nitrate de sodium.

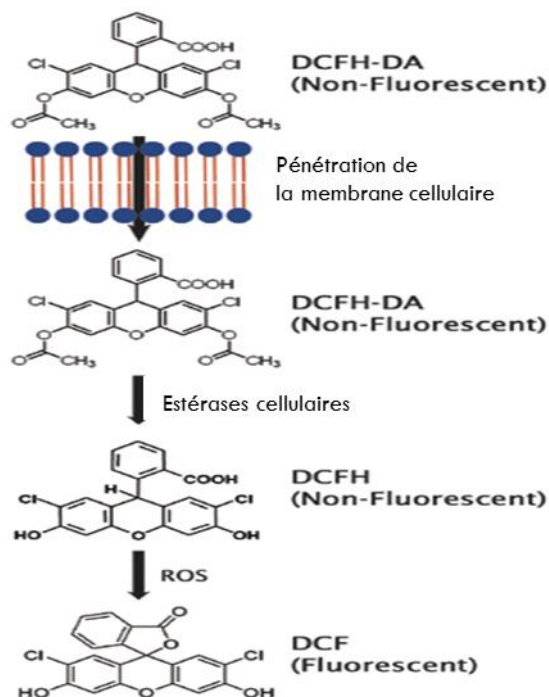
### II.2.7.2. Test d'inhibition de la production des ERO par les cellules U87 stimulées par le LPS

#### Principe :

La méthode utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice de la production des ERO par les cellules cérébrales U87 en présence de LPS est basée sur la conversion de la sonde DCFH (dichlorofluorescéine, non fluorescent) en DCF (fluorescent) par les ERO. En effet, la sonde 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) est capable d'être internalisée par les cellules et sous l'action des estérases cellulaires qui vont cliver la fonction diacétate, celle-ci se retrouve

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

alors piégée dans le compartiment cellulaire sous forme de DCFH. Enfin, les espèces radicalaires vont s'oxyder en présence de DCFH générant la DCF fluorescente à 525 nm lorsqu'elle est excitée à 485 nm. L'intensité de la fluorescence étant proportionnelle à la quantité d'ERO présente dans l'échantillon.



### Protocole :

Les cellules U87 ( $5 \times 10^3$  cellules/100 $\mu$ L/puits) ont été introduites dans une plaque de 96 puits et incubées pendant 24 h (37 °C ; 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % d'humidité). Puis, le milieu complet MEM a ensuite été remplacé par un milieu fraîchement préparé (200  $\mu$ L/puits) contenant les fractions polysaccharidiques à des concentrations croissantes et non-cytotoxiques (10, 50 et 100  $\mu$ g/mL). Le diclofenac de potassium à 25 et 50  $\mu$ g/mL et a été utilisé comme témoin positif. Après 1 h de pré-incubation, le LPS à 10  $\mu$ g/mL a été introduit suivi d'une incubation supplémentaire de 24 h et les cellules ont ensuite été lavées avec 100  $\mu$ L de PBS 1X. Dans chaque puits, 100  $\mu$ L de PBS 1X contenant la sonde DCFH-DA à 10  $\mu$ M ont été introduits et la plaque a été incubée pendant 1 h (37 °C ; 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % HR). Après élimination du tampon contenant la sonde, les puits ont encore été lavés avec du PBS 1X, puis 100  $\mu$ L de PBS 1X ont été introduits pour estimer la production des ERO par mesure de l'intensité de fluorescence relative (IFR). L'IFR est obtenue par lecture de la fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 525 nm respectivement. La fluorescence de cellules exposées uniquement au milieu complet MEM représentait le blanc, tandis que celle de cellules

uniquement exposées au milieu MEM contenant la sonde représentait le témoin négatif (Eruslanov et Kusmartsev, 2010).

### II.2.7.3. Test d'inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules U87 stimulées par LPS

Le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 jouent un rôle essentiel dans la pathologie de nombreuses affections inflammatoires. De plus, la translocation de NF- $\kappa$ B et son activité transcriptionnelle sont cruciales pour la production des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'inflammation. Par conséquent, dans cette étude, la transcription de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de NF- $\kappa$ B a été quantifiée dans les cellules U87 en réponse au traitement par les fractions polysaccharidiques suivi d'une exposition à la concentration toxique de LPS (100  $\mu$ g/mL) utilisant la PCR en temps réel. Seules les fractions de *K. grandifoliola* ont été testées aux concentrations les plus actives déterminées par le test de cytoprotection à savoir 10  $\mu$ g/mL pour FKG et 100  $\mu$ g/mL pour HKG.

Pour cela, les cellules U87 ( $1 \times 10^5$ /puits/2 mL) ont été introduites dans différents puits d'une microplaque de 6 puits, suivi d'une incubation de 24 h. Puis, les fractions polysaccharidiques préparées avec le milieu complet MEM ont été ajoutées. Les cellules traitées par le Diclofénac de potassium représentaient le témoin positif. Après 1 h de pré incubation, 100  $\mu$ g/mL de LPS ont été ajoutés dans chaque puits, suivi d'une incubation supplémentaire de 48 h. Ensuite, les milieux ont été éliminés, la plaque lavée avec 500  $\mu$ L de PBS 1X/puits et le milieu de culture ajouté. Les cellules ont été détachées du support à l'aide d'un grattoir en polypropylène et la suspension cellulaire a été transférée dans des tubes coniques de 1,5 mL et une centrifugation (1200 rpm, 5 min, 4 °C) a permis de récupérer le culot de cellules.

#### II.2.7.3.1. Extraction de l'ARN total

La procédure d'extraction de l'ARN a été menée à froid, pour cela les réactifs et le matériel utilisés étaient maintenus dans de la glace pendant le processus d'extraction. L'ARN total a été extrait à l'aide du Réactif *RNA Xpress*.

Pour cela, 1 mL de réactif *RNA Xpress* a été introduit dans les tubes contenant le culot de cellules. Après une délicate agitation (à l'aide d'une pipette), 200  $\mu$ L de chloroforme ont été ajoutés puis l'ensemble a été agité délicatement (15 s) et laissé au repos (10 min, 4 °C). Une centrifugation (12000 tr/min, 15 min, 4 °C) a permis de récupérer la couche aqueuse supérieure dans de nouveaux tubes coniques de 1,5 mL. Un volume de 500  $\mu$ L d'isopropanol a été ajouté



## *Chapitre II : Matériel et Méthodes*

dans chaque tube et l'ensemble a été délicatement homogénéisé d'un mouvement de la main puis laissé au repos à 4 °C pendant 10 min. Après centrifugation (12000 g, 10 min, 4 °C) et élimination du surnageant, le culot d'ARN visible a été solubilisé dans 1 mL d'éthanol 75 % (préparé dans l'eau DEPC [Eau stérile traité avec 0,1 % de diéthylpyrocarbonate]). Le mélange a été délicatement homogénéisé puis centrifugé à 7500 g pendant 15 min à 4 °C. L'éthanol a ensuite été éliminé et le culot d'ARN séché à l'air afin de permettre l'évaporation de la petite quantité d'éthanol restante. Enfin, l'ARN a été solubilisé dans 5 µL d'eau DEPC et chauffé dans un bloc chauffant à 55 °C pendant 10 min pour permettre l'obtention d'une solution homogène.

L'ARN obtenu a été quantifié au Nanodrop, puis la pureté a été évaluée par le calcul du ratio Absorbance 260 nm/ Absorbance 280 nm. Les solutions d'ARN obtenues des groupes de cellules U87 traitées et non traitées, étaient considérées pures car le ratio était compris entre 2 et 2,2.

### **II.2.7.3.2. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR**

La *RT-PCR* (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) est une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc).

#### ***Principe***

La synthèse d'un brin d'ADN complémentaire est catalysée par des ADN polymérases ARN dépendantes (Reverse Transcriptase) et utilise une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. L'ARNm à amplifier étant polyadénylé en 3', l'amorce choisie est une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythimidines. Les ARNm copiés en ADNc sont amplifiés assurant ainsi une multiplication exponentielle de la molécule hybride d'ADNc issue de la transcription inverse.

#### ***Protocole***

La synthèse des molécules d'ADNc à partir des échantillons d'ARNm a été effectuée suivant le protocole décrit par le fabricant du Kit *Verso cDNA Synthesis* utilisé. Pour cela, 20 µL de mélange réactionnel contenant 4 µL du tampon *cDNA synthesis 5x*, 2 µL du mélange dNTP, 1 µL d'amorces d'ARN « random RNA primer », 1 µL de la RTE (Reverse Transcriptase Enhancer), 1 µL de 200 ng/µL d'échantillon d'ARN, 0,5 µL de *Verso enzyme mix* (incluant la transcriptase reverse) et ajusté au volume final avec de l'eau DEPC. Le mélange réactionnel a été soumis à un programme du cycle de transcription reverse réglé à la

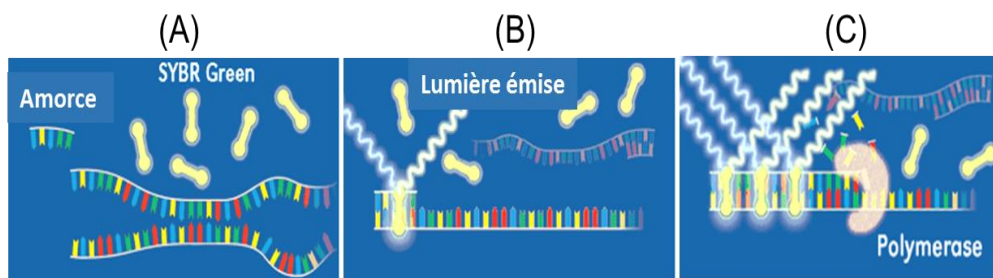
température de 45 °C en 1 cycle de 30 min. Puis, la température a été réglée à 95 °C pendant 2 min pour inactiver l'enzyme et terminer la réaction.

### II.2.7.3.3. Analyse des produits de transcription

La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) est une technologie fusionnant la chimie de la PCR avec l'utilisation des molécules reporteurs fluorescentes afin de surveiller la production de produits d'amplification au cours de chaque cycle de la réaction de PCR. Les niveaux de transcription des médiateurs inflammatoires de cette étude IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et NF- $\kappa$ B ont été évalués. La qPCR a été réalisée selon les instructions du fabricant du Master Mix contenant le *SYBR Green*, un agent intercalant dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il se lie de façon non spécifique à l'ADN double brin et permettant la détection en temps réel des produits de PCR.

#### Principe

La technologie qPCR basée sur le *SYBR Green* repose sur la fixation du *SYBR Green* sur l'ADN double brin (ADNdb) (Figure 17). Le *SYBR Green*, s'intercale au niveau des chaînes double brin d'ADN et devient fluorescent. Pendant la phase d'hybridation (A) du cycle de qPCR, les amorces de PCR s'hybrident à la cible et forment de petites régions d'ADNdb où le *SYBR green* s'intercale et le signal fluorescent faible est observé. Dans la phase d'élongation (B), plus d'ADNdb sont formés et plus de colorants *SYBR Green*, peuvent s'intercaler et le signal fluorescent est plus élevé. A la fin de la phase d'élongation, toutes les molécules d'ADN deviennent double brin et la quantité maximale de *SYBR green*, s'est intercalée (C). Le *SYBR green* a un maximum d'excitation et d'émission respectivement à 491 nm et 521 nm. La fluorescence est ainsi mesurée à la fin de chaque phase d'élongation. La fluorescence est utilisée pour mesurer l'accumulation des produits de la réaction de polymérisation en chaîne après chacun de ces cycles. Les mesures de fluorescence permettent d'extrapoler la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon avant l'amplification.



**Figure 17** : Principe de la PCR quantitative utilisant le colorant *SYBR Green* (Mouchel-Vielh E, 2012)

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

### Protocole

La procédure de qPCR a été réalisée à froid, pour cela les réactifs utilisés étaient maintenus dans de la glace pendant la préparation du cocktail réactionnel. Ainsi, dans des tubes coniques de PCR, le cocktail de réaction contenait 1  $\mu\text{L}$  d'amorce sens, 1  $\mu\text{L}$  d'amorce anti sens, 1  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADNc précédemment synthétisé, 5  $\mu\text{L}$  du Master mix et 1  $\mu\text{L}$  d'eau DEPC. Pour chaque échantillon d'ADNc, un mélange réactionnel contenant l'amorce sens et anti sens du gène de chaque cytokine test a été constitué. Les tubes ont ensuite été couverts, puis centrifugés (01 sec) et le programme de la réaction de PCR quantitative exécuté. Pour cela, les cycles d'amplification de la PCR quantitative ont consisté en une dénaturation à 95 °C pendant 25 s, à la fixation des amorces aux températures comprises entre 58 et 64 °C pendant 30 min et une étape d'extension à 72 °C pendant 1 min pour un total de 37 cycles suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 10 min. L'amplification du GAPDH (Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase) a été utilisée comme standard. Les séquences, longueurs et températures d'hybridation des amorces des différents gènes utilisés sont consignées dans le Tableau VII. La quantification relative du degré d'expression des gènes cibles dans les échantillons a été déterminée par la méthode comparative  $C_T$  (cycle treshold) utilisant le GAPDH comme gène standard (**Livak et Schittgen, 2001**).

$$\Delta C_T = C_T (\text{gène cible}) - C_T (\text{gène standard})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{groupe traité}) - \Delta C_T (\text{groupe témoin})$$

Calcul de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  à l'aide du logiciel *Quantstudio LightCycler Real Time System*:

- Si  $2^{-\Delta\Delta C_T} > 1$ , gène sur-exprimé dans groupe traité par rapport au groupe témoin ;
- Si  $2^{-\Delta\Delta C_T} < 1$ , gène sous-exprimé dans groupe traité par rapport au groupe témoin.

Où :

$C_T$  : nombre de cycles de PCR à partir duquel les produits d'amplification deviennent détectables.

**Tableau VII :** Caractéristiques des séquences d’amorces utilisées pour évaluer la transcription des gènes IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B et GAPDH (Sigma Genosys).

Gènes	Oligoname	Oligonucleotide sequence 5'.....3'	Longueur	T* Hybridation
<b>IL6</b>	Human-IL6-FP	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	20	61.8°C
	Human-IL6-RP	GAGGTGAGTGGCTGTCTGTG	20	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Human-TNFalpha-FP	CTCCAGGCGGTGCCTTGTTTC	20	60.4°C
	H-TNFalpha-RP	CAGGCAGAAGAGCGTGGTG	19	
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Human-IL1beta-FP	GCAAGGGCTTCAGGCAGGCCGCG	23	64°C
	Human-IL1beta-RP	GGTCATTCTCCTGGAAGGTCTGTGGGC	27	
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Human-NF- $\kappa$ B-FP	GCGCTTCTCTGCCTTCCTTA	20	58°C
	Human-NF- $\kappa$ B-RP	TCTTCAGTTTGATGCCCCC	20	
<b>GAPDH</b>	Human-GAPDH-FP	ACCACAGTCCATGCCATCAC	20	60.4°C
	Human-GAPDH-RP	TCCACCACCCTGTTGCTGT	19	

FP : Forward Primer, RP : Reverse Primer

#### II.2.7.4. Test d’inhibition de la toxicité des cellules U87 induite par le LPS

##### II.2.7.4.1. Optimisation de la concentration toxique de LPS

La cytotoxicité de LPS sur les cellules U87 a été évaluée par le test MTT afin de déterminer la concentration d’induction de la toxicité comme décrit par **Balaji et al. (2015)**. Pour cela, après 48 h d’exposition des cellules U87 à différentes concentrations de LPS (1, 10, 100, 200  $\mu$ g/mL), la courbe dose réponse a été utilisée pour déterminer la concentration toxique 50 (CT50). Cette dernière a été choisie comme concentration d’induction de toxicité.

##### II.2.7.4.2. Mesure de la viabilité cellulaire : Test MTT

La capacité des différentes fractions polysaccharidiques à inhiber mort cellulaire induite par LPS sur les cellules U87 a été évaluée en utilisant le test MTT (Protocole modifié de **Balaji et al. 2015**). Pour cela, les cellules U87 ( $5 \times 10^3$ /100  $\mu$ L/puits) ont été pré-incubées avec les fractions polysaccharidiques (10, 50, 100  $\mu$ g/mL) pendant 1 h, puis LPS à CT50/puits a été ajouté. Après une incubation additionnelle de 24 h, le milieu a été éliminé et la viabilité cellulaire déterminée par le test MTT tel que décrit en II.2.7. Le Diclofénac de potassium (préparé dans le milieu de culture à 25 et 50  $\mu$ g/mL, confirmées comme non-cytotoxiques) a été utilisé comme témoin.

### II.2.8. Evaluation *in vivo* des activités antalgiques des fractions polysaccharidiques

Toutes ces expérimentations *in vivo* ont été effectuées suivant les recommandations du comité d'éthique institutionnel (Approbation N° BITS-HYD/IAEC/2016/21).

Ce travail propose d'étudier les activités antalgiques des fractions polysaccharidiques d'intérêt chez les souris BALB/*c*. Ce test consiste à évaluer l'action inhibitrice de la douleur provoquée chez la souris par l'injection intrapéritonéale (*i.p*) d'une solution diluée d'acide acétique 2 % (Writhing test), ou par injection intraplantaire de formol 5 % dans la face dorsale de la patte postérieure (Fliching test) (De Miranda *et al.*, 2001).

Pour cette étude, les souris ont été réparties en 05 groupes de 06 souris chacun. Les souris des deux groupes tests (FKG et HKG) étaient traitées avec les fractions polysaccharidiques (100 mg/kg/10 mL par voie orale [*a.o*]). Le Diclofénac de potassium (50 mg/kg/10 mL, *a.o*; Writhing test) et la Morphine (5 mg/kg par voie sous cutanée, *s.c*, 0.1 mL ; Fliching test) ont été utilisés comme référence. Le groupe témoin ayant reçu la solution de NaCl 0,9 %.

Writhing test : Une heure après le traitement, chaque souris est ensuite injectée (*i.p*) avec une solution d'acide acétique (2 %, 0,1 mL), puis placé dans une enceinte en plexiglas transparente. Le nombre de crampes abdominales (contractions abdominales, mouvements d'étirement du corps et des pattes postérieures et une torsion des muscles dorso-abdominaux associés à une réduction de l'activité, et une incoordination motrice) est noté 5 min après l'injection de l'acide acétique et pendant une période de 20 min.

Fliching test : Une heure après le traitement, chaque souris est injectée avec le formol (5 %, 0,1 mL) et le nombre de lèchements/tressaillement de la patte, ou de sauts de l'animal est noté les cinq premières minutes suivant l'injection de formol, puis de 25 à 30 min après injection.

### II.2.9. Evaluation *in vivo* des activités anti-inflammatoires : Modèle de la neuro-inflammation induite chez la souris BALB/*c* par LPS.

#### II.2.9.1. Tests de neurotoxicité

Les groupes tests ont été traités par une dose test de 100 mg/kg/10 mL (*a.o*) de fraction polysaccharidique. Tandis que le groupe témoin recevait une solution de NaCl 0,9 %.

##### II.2.9.1.1. Test de performance et de coordination motrice

Le Rotarod est une méthode de test simple pour la coordination motrice et la performance des rongeurs. C'est un dispositif qui a été utilisé au cours de nombreuses études afin de déceler des déficits neurologiques chez les rats ou les souris, ou pour étudier l'équilibration chez ces

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

rongeurs. De plus, ce test a pour finalité d'évaluer les capacités d'apprentissage d'un comportement d'équilibration sensori-motrice en situation dynamique.

L'appareil Rotarod possède une barre rotative de 2,5 cm de diamètre, divisée en trois compartiments, placée à 50 cm de hauteur et ayant une vitesse rotative de 20 tr/min (Photo 5). Pour cette étude, la veille du test, les souris ont préalablement été entraînées sur le Rotarod (20 tr/min ; 10 à 15 min). Le jour de l'expérimentation, le temps de latence à tomber de la barre rotative pour chaque animal a été enregistrée avant et 60 min après traitement. Le temps limite d'expérimentation a été de 5 min (**Parvathi et Ravishankar; 2013**).

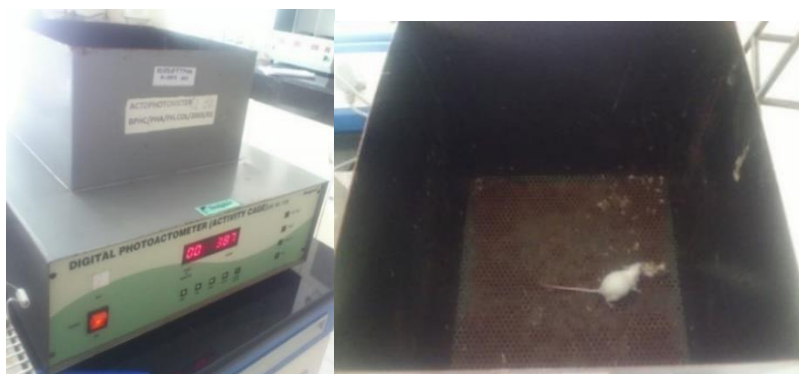


**Photo 6** : Représentation de l'essai utilisant l'appareillage *Rota Rod* (Photographiée par **Mediesse K.F., 2015**).

### II.2.9.1.2. Evaluation de l'effet sur l'activité locomotrice

Pour l'évaluation de l'effet des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur l'activité locomotrice des souris, chaque animal a été placé individuellement dans la cage de l'appareil et les mouvements de l'animal coupent les rayons lumineux qui tombent sur la cellule photoélectrique (Photo 6). Le score de l'activité locomotrice basale de l'animal a été enregistré avant et 60 min après traitement des souris. Le temps limite d'expérimentation a été de 5 min (**Kondawar et al. 2011**). Le pourcentage de diminution du score d'activité a été calculé par la formule :

$$\text{Diminution du score d'activité (\%)} = \frac{\text{Score d'activité de Base}}{\text{Score d'activité après traitement}} \times 100$$



**Photo 7** : Représentation de l'essai utilisant l'appareillage *Actophotometer* (Photographiée par Mediesse K.F., 2015).

### II.2.9.2. Tests de Nociception

**Modèle expérimentale** : Les souris des groupes tests ont été traitées par les fractions polysaccharidiques (100 mg/kg, *a.o*), et les groupes témoins positif et négatif recevaient le NaCl 0,9 %. Une heure après traitement, les groupes tests et témoin positif recevaient une injection de LPS (5 mg/kg, *i.p*).

Ensuite, les souris ont été soumises aux tests de nociception notamment le test d'immersion de la queue (Tail-flick Test) et le test à la plaque chauffante (*hot plate test*) (Le Bars *et al.*, 2001).

*Hot plate Test* : Ce test consiste à introduire chaque souris dans un espace cylindrique ouvert vers le haut dont le plancher, constitué par une plaque métallique, est chauffé par un thermostat (52 °C). La plaque chauffée à température constante déclenche deux composantes comportementales dont on mesure le délai d'apparition : le lèchement des pattes et le saut. Le délai d'apparition a été mesuré avant et 1 h après injection de LPS.

*Tail-flick Test* : consiste à immerger 5 cm de la portion inférieure de la queue de chaque souris dans de l'eau chaude (45 ± 1°C) provoquant un mouvement brusque de la queue et parfois le recul global du corps de l'animal. Le délai d'apparition de la réponse a été mesuré avant, 60 et 120 min après injection de LPS. Le temps limite d'immersion pour les deux tests est de 20 s et les Pourcentage d'Effet Maximal possible (% MPE) ont été déterminé par la formule suivante :

$$\text{MPE (\%)} = \frac{(\text{valeur après traitement}) - (\text{valeur avant traitement})}{(\text{Valeur limite}) - (\text{valeur avant traitement})} \times 100$$



### II.2.9.3. Mesure *in vivo* de la transcription des gènes IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ et NF- $\kappa$ B par qPCR

Trois heures après injection LPS (*i.p*) aux différents groupes de souris suivant le modèle expérimental décrit en II.2.13.2., les animaux de tous les groupes ont été sacrifiés par dislocation spinale. La dislocation spinale est une technique utilisée dans l'euthanasie physique des petits animaux tels que les souris, le but étant de séparer rapidement la moelle épinière du cerveau de façon à fournir à l'animal une mort rapide et indolore. La séparation se produit à la base du cerveau ou dans la région cervicale (le tiers supérieur du cou). Pratiquement, une pression a été exercée sur le cou de l'animal et en disloquant la colonne vertébrale du cerveau. Le tissu cérébral a ensuite été isolé après ouverture de la cavité crânienne et conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

#### Extraction de l'ARN total

Cent milligrammes de tissu cérébral ont été introduits dans des tubes coniques contenant 1 mL de *Tri Reagent*. Après une sonication du mélange (5s) et un repos pendant 5 min à TA, 200  $\mu$ L de chloroforme ont été ajoutés et l'ensemble agité vigoureusement (15 s). Après une seconde phase de repos (10 min ; TA), le mélange a été centrifugé (12000 g ; 15 min, 4 °C). La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube et la suite des expérimentations a été réalisée comme décrite en II.2.11.1.

#### Quantification de la transcription des gènes pro-inflammatoires

L'ARN total obtenu a été utilisé comme matrice pour la synthèse de l'ADNc suivant la procédure décrite en II.2.11.2 et la transcription des gènes NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL6 a été quantifié par qPCR (II.2.11.3).

### II.2.10. Analyses statistiques

Les données obtenues dans cette étude ont été exprimées en termes de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques et le tracé des graphes ont été effectués par le logiciel GraphPad Prism version 6.1. Le test ANOVA a été utilisé pour la comparaison des moyennes suivi du test de comparaison multiples Dunnet's pour la comparaison des groupes tests au groupe non-traité ou traité avec LPS. Les indices \*, \*\*, \*\*\* dénotent des significances statistiques à des valeurs de p respectivement inférieures à 0,05, 0,01 et 0,001 en comparaison au groupe n'ayant subi aucun traitement. Les indices #, ##, ### dénotent des significances statistiques à des valeurs de p respectivement inférieures à 0,05, 0,01 et 0,001 en comparaison au groupe traité avec LPS. Concernant le test utilisant le

## *Chapitre II : Matériel et Méthodes*

Luminex, les données MFI (Median Fluorescence Intensity) obtenues ont été analysées et enregistrées avec le logiciel « 5-parameter logistic » pour le calcul des concentrations des différentes cytokines présentes dans les échantillons en pg/mL.

*Chapitre III :*  
*Résultats et Discussion*

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1. RESULTATS

#### III.1.1. Composition chimique, effets anti-radicalaires et immunomodulateurs des extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*

##### III.1.1.1. Rendement d'extraction

Le Tableau VIII présente les différents rendements d'extraction des polysaccharides solubles totaux (PoS), des pectines (Pec) et des hémicelluloses solubles (HemS) des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta*. A partir de 30 g de poudre sèche d'écorces de *K. grandifoliola* ou de feuilles de *C. sanguinolenta*, 3,61 g et 0,469 g de PoS ont été respectivement obtenu, soit des rendements de 12,03 % et 1,56 %. Par ailleurs pour l'extraction de la paroi, à partir de 5 g de poudre sèche, 3,745 g (74,90 %) et 2,50 g (50 %) de paroi ont été obtenu respectivement de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*. Puis, l'extraction des pectines à chaud en présence de l'oxalate d'ammonium a permis d'obtenir 5,2 % (0,26 g) et 1,00 % (0,05 g) de pectines de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*. Enfin, 8 % (0.4 g) et 4,20 % (0,210 g) d'hémicelluloses solubles ont respectivement été obtenues de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* utilisant le KOH 1 M.

**Tableau VIII :** Rendement d'extraction en pourcentages des extraits polysaccharidiques par rapport à la masse sèche d'écorces ou de feuilles.

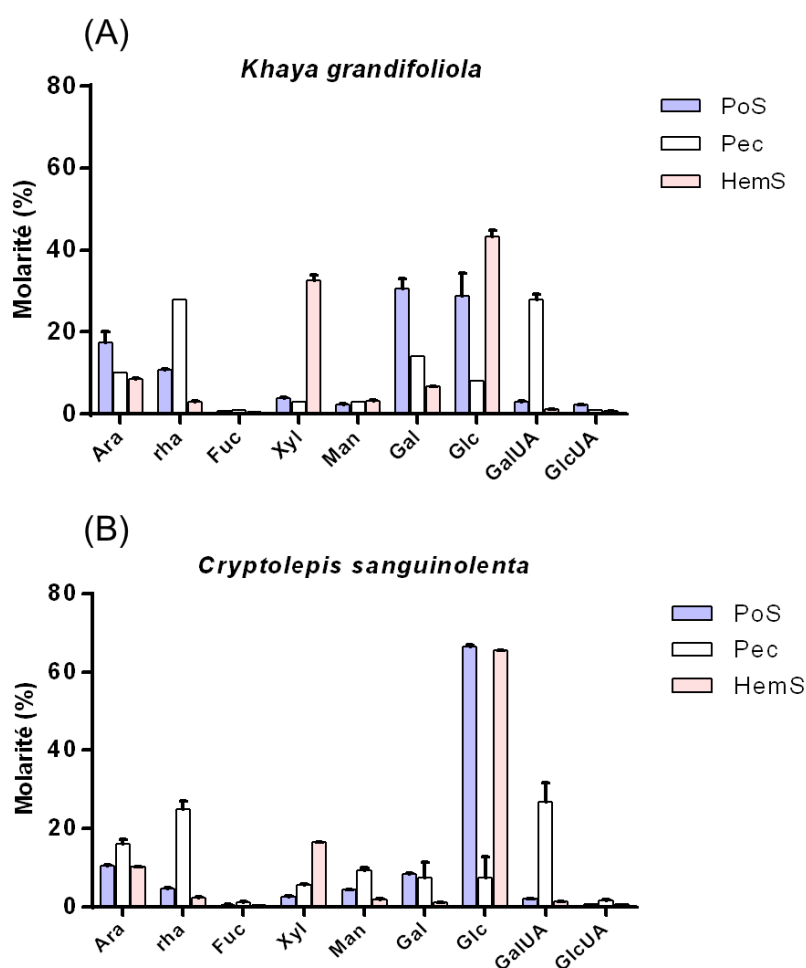
	Rendements (%)	
	Ecorces	Feuilles
	<i>K. grandifoliola</i>	<i>C. sanguinolenta</i>
<b>Polysaccharides solubles totaux (PoS)</b>	12,03	1,56
Paroi cellulaire	74,90	50
<b>Extrait à l'oxalate d'ammonium (Pect)</b>	5,2	1,00
<b>Extrait KOH 1M (HemS)</b>	8	4.20

##### III.1.1.2. Composition monosaccharidique des extraits polysaccharidiques

La Figure 18 donne la composition en oses constitutifs, exprimée en pourcentage molaire (% Mol) des extraits (PoS, Pec et HemS) obtenus de ces plantes. Il en ressort que ces extraits contiennent des hétéropolysaccharides dont la composition varie en fonction de l'extrait et de la plante. En effet, PoS<sub>KG</sub> est principalement composé de Glucose (30,53 ± 2,42 %), de Galactose (28,89 ± 5,47 %) et d'Arabinose (17,57 ± 2,51 %). On y retrouve également le

### Chapitre III : Résultats et Discussion

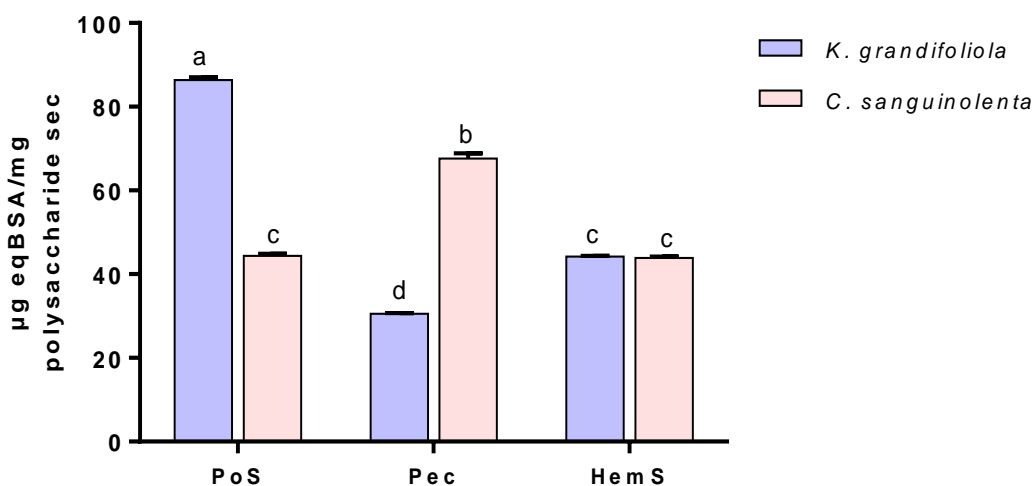
Rhamnose ( $10,74 \% \pm 0,32 \%$ ) qui n'est pas en quantité négligeable. Tandis que, PoS de *C. sanguinolenta* riche en Glucose ( $60,51 \pm 0,46 \%$ ) renferme cependant en faible proportion d'Arabinose ( $10,36 \pm 0,19 \%$ ) et le Galactose ( $8,46 \pm 0,02 \%$ ). Les extraits Pec des plantes contiennent principalement l'Acide galacturonique, le Rhamnose et l'Arabinose à différentes proportions (respectivement  $28,85 \pm 1,15 \%$  ;  $28,81 \%$  ;  $10,29 \%$  pour *K. grandifoliola* et  $26,88 \pm 4,81 \%$  ;  $24,83 \pm 2,28 \%$  ;  $16,16 \pm 1,04 \%$  pour *C. sanguinolenta*). Les extraits HemS des deux plantes quant à eux sont riches en Glucose et en Xylose avec des pourcentages molaires de  $43,38 \pm 1,19 \%$  et  $32,69 \%$  pour *K. grandifoliola* ; et de  $65,51 \pm 1,38 \%$  et  $16,58 \pm 1,19 \%$  pour *C. sanguinolenta*.



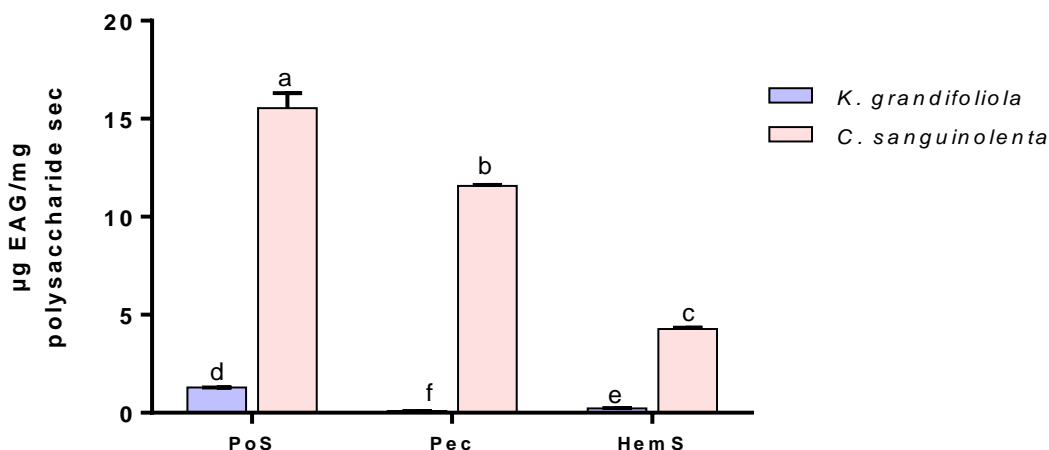
**Figure 18 :** Composition en monosaccharide (% molaire) des extraits polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* (A) et des feuilles de *C. sanguinolenta* (B) après analyse par CPG. **Ara:** Arabinose, **Rha:** Rhamnose, **Fuc:** Fucose, **Xyl:** Xylose, **Man:** Mannose, **Gal:** Galactose, **Glc:** Glucose, **GalUA:** Acide galacturonique, **GlcUA:** Acide glucuronique.

### III.1.1.3. Teneurs en protéines et polyphénols totaux des extraits polysaccharidiques des deux plantes

La caractérisation des extraits polysaccharidiques de plantes d'intérêts a montré une variabilité des différents métabolites. Les Figures 19 et 20 présentent les teneurs en protéines et en composés phénoliques des extraits polysaccharidiques de ces deux plantes, déterminées à partir des courbes d'étalonnage effectuées avec le BSA et l'acide gallique respectivement. Les extraits PoS<sub>KG</sub> ( $86,39 \pm 1,13$  eqBSA/mg) et PoS<sub>CS</sub> ( $15,53 \pm 1,34$  EAG), présentent les teneurs les plus élevées en protéines et en composés phénoliques respectivement, suivi de l'extrait Pec de *C. sanguinolenta* ( $67,66 \pm 2,05$   $\mu$ g eqBSA de protéines et  $11,57 \pm 0,09$  EAG de composés phénoliques). La faible présence des composés phénoliques dans les extraits de *K. grandifoliola* a été représentée par des concentrations de 0,09 à 1,29  $\mu$ g EAG.



**Figure 19** : Teneurs en protéines des polysaccharides hydrosolubles totaux (PoS), pectiques (Pec) et hémicellulosiques solubles (HemS) isolés des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta*. Différence significative  $p \leq 0,05$  :  $a > b > c > d > e > f$ .



**Figure 20 :** Teneurs en composés phénoliques des polysaccharides hydrosolubles totaux (PoS), pectiques (Pec) et hémicellulosiques solubles (HemS) isolés des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta*. Différence significative  $p \leq 0,05$  :  $a > b > c > d > e > f$ .

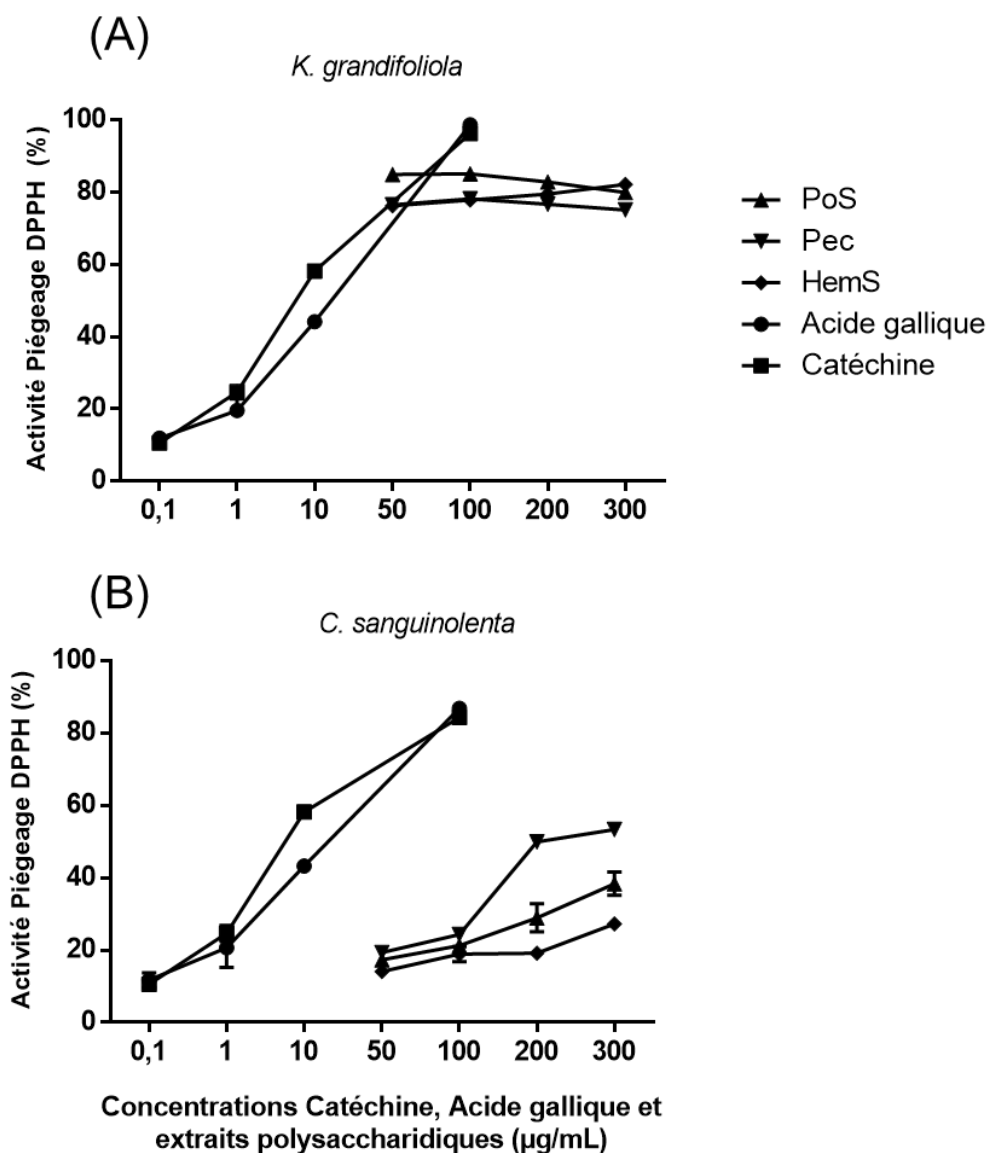
#### III.1.1.4. Effets antiradicalaires DPPH et ABTS des extraits polysaccharidiques des deux plantes d'intérêts

##### III.1.4.1. Activité de piégeage du radical DPPH

La Figure 21 présente l'activité de piégeage du radical DPPH• des extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta*, et celles de l'acide gallique et la catéchine utilisés comme Témoins positifs. Tous les extraits polysaccharidiques aux concentrations variantes de 50 à 300 µg/mL ont montré des activités de piégeage du DPPH•. Toutefois, l'extrait PoS<sub>KG</sub> a montré la plus grande activité à 50 µg/mL avec  $84,98 \pm 0,3$  % d'inhibition, suivi des extraits Pec<sub>KG</sub> et HemS<sub>KG</sub> avec respectivement  $76,52 \pm 0,4$  et  $76,32 \pm 0,44$  % d'inhibition. A 300 µg/mL, les pourcentages d'inhibition sont de  $79,96 \pm 0,04$  ;  $75,09 \pm 0,07$  et  $82,25 \pm 0,25$  % respectivement pour PoS<sub>KG</sub>, Pec<sub>KG</sub> et HemS<sub>KG</sub>. Les extraits de *C. sanguinolenta* quant à eux, ont présenté des faibles activités dose dépendantes et variantes de  $17,35 \pm 1,13$  à  $38,41 \pm 3,2$  % (PoS<sub>CS</sub>);  $19,41 \pm 1,06$  à  $53,41 \pm 0,78$  % (Pec<sub>CS</sub>) et  $14,08 \pm 0,81$  à  $27,27 \pm 0,95$  % HemS<sub>CS</sub> de 50 à 300 µg/mL.

A 100 µg/mL, les activités de piégeage du DPPH de la catéchine et l'acide gallique sont respectivement de  $87,69 \pm 1,41$  et  $86,13 \pm 0,76$  %, supérieures aux activités des extraits des deux plantes.





**Figure 21 :** Activités antiradicalaires DPPH des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* (A) et des feuilles de *C. sanguinolenta* (B).

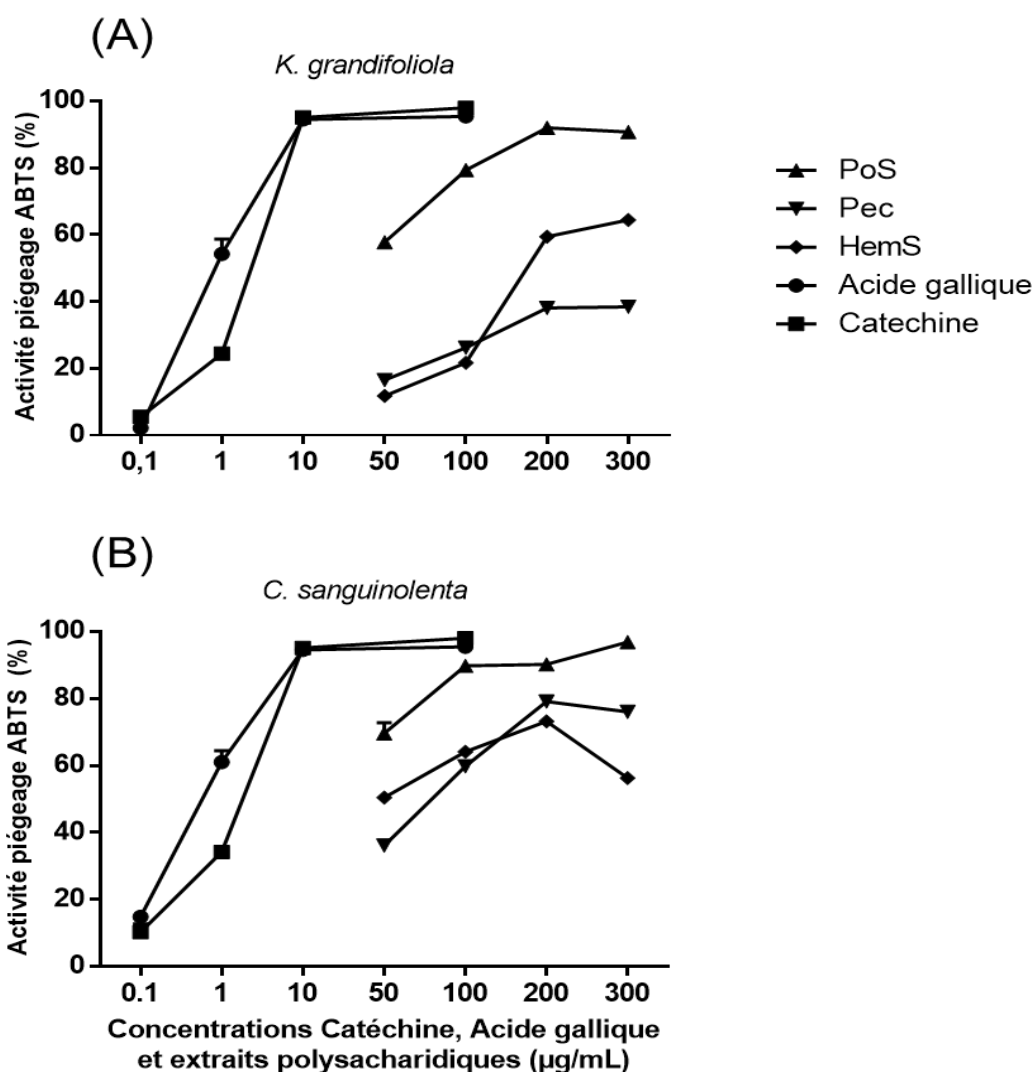
**PoS :** Extrait polysaccharidique total, **Pec :** Extrait pectique, **HemS :** Extrait hémicellulosique soluble.

#### III.1.4.2. Activités de piégeage du radical ABTS

Les activités de piégeage des extraits polysaccharidiques des deux plantes, de la catéchine et de l'acide gallique sur le radical libre ABTS• sont présentées dans la Figure 22. Bien que tous les extraits ont réduit le radical ABTS•, différents niveaux d'activités ont été notés en fonction de l'espèce végétal et des concentrations tests. Ainsi, les extraits Pec possèdent des pourcentages d'inhibition de  $16,53 \pm 0,99$  à  $38,44 \pm 0,14$  % pour *K. grandifoliola* et de  $36,09$

### Chapitre III : Résultats et Discussion

$\pm 1,53$  à  $76,05 \pm 1,75$  % pour *C. sanguinolenta*. Tandis que, les extraits HemS possèdent des pourcentages d'inhibition de  $11,77 \pm 0,14$  à  $64,47 \pm 0,54$  % pour *K. grandifoliola* (50 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ) et de  $50,45 \pm 0,99$  à  $73,24 \pm 1,02$  % pour *C. sanguinolenta* (50 - 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Les extraits PoS ont été les plus actifs avec des pourcentages d'inhibition variant de  $57,32 \pm 1,08$  à  $92,01 \pm 0,33$  % et de  $69,61 \pm 5,49$  à  $96,86 \pm 0,77$  % respectivement pour *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* de 50 à 300  $\mu\text{g/mL}$ . L'activité antiradicalaire ABTS de PoS<sub>CS</sub> à 300  $\mu\text{g/mL}$  est comparable à celles de l'acide gallique et de la catéchine à 10  $\mu\text{g/mL}$  avec des activités de piégeage de  $97,52 \pm 1,02$  % et  $97,45 \pm 0,33$  % respectivement.



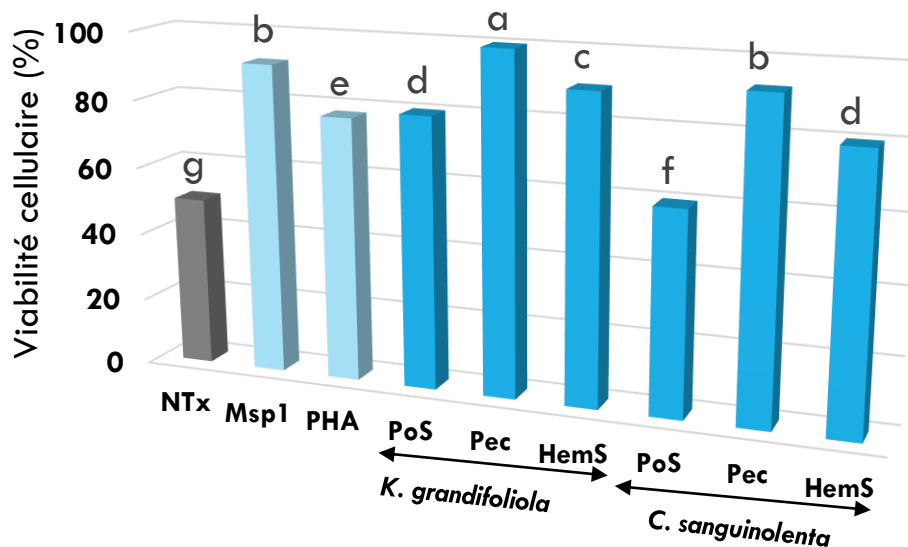
**Figure 22** : Activités antiradicalaires ABTS des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* (A) et des feuilles de *C. sanguinolenta* (B).

**PoS** : Extrait polysaccharidique total, **Pec** : Extrait pectique, **HemS** : Extrait hémicellulosique soluble.

III.1.1.5. Effet des extraits polysaccharidiques sur les PBMCs

III.1.5.1. Effet des extraits polysaccharidiques sur la viabilité cellulaire

Avant le début des expériences, l'effet des extraits PoS, Pec et HemS des deux plantes d'intérêts sur la viabilité cellulaire a été examiné après coloration au bleu trypan. Il en ressort qu'après 48 h d'incubation, la viabilité des PBMCs non exposées (NTx), a été réduite de 50 %. L'exposition de ces cellules aux différents extraits PoS, Pec et HemS à 200 µg/mL entraîne une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) en comparaison au groupe de cellules NTx, avec une viabilité cellulaire allant de 80 à 100 % (Figure 23). Ces résultats témoignent ainsi de l'effet stimulateur de la prolifération des cellules mononuclées humaines par les extraits polysaccharidiques à 200 µg/mL. L'activité proliférative des PBMCs en présence des extraits polysaccharidiques étaient comparables à l'activité du mitogène PHA et de l'antigène malarique MSP1. En effet, l'exposition des PBMCs à PHA (10 µg/mL) ou à MSP1 (20 µg/mL) non-cytotoxique, entraîne une augmentation ( $p \leq 0,05$ ) de la viabilité cellulaire de 50 à 77,78 (PHA) ou 91,55 % (MSP1).



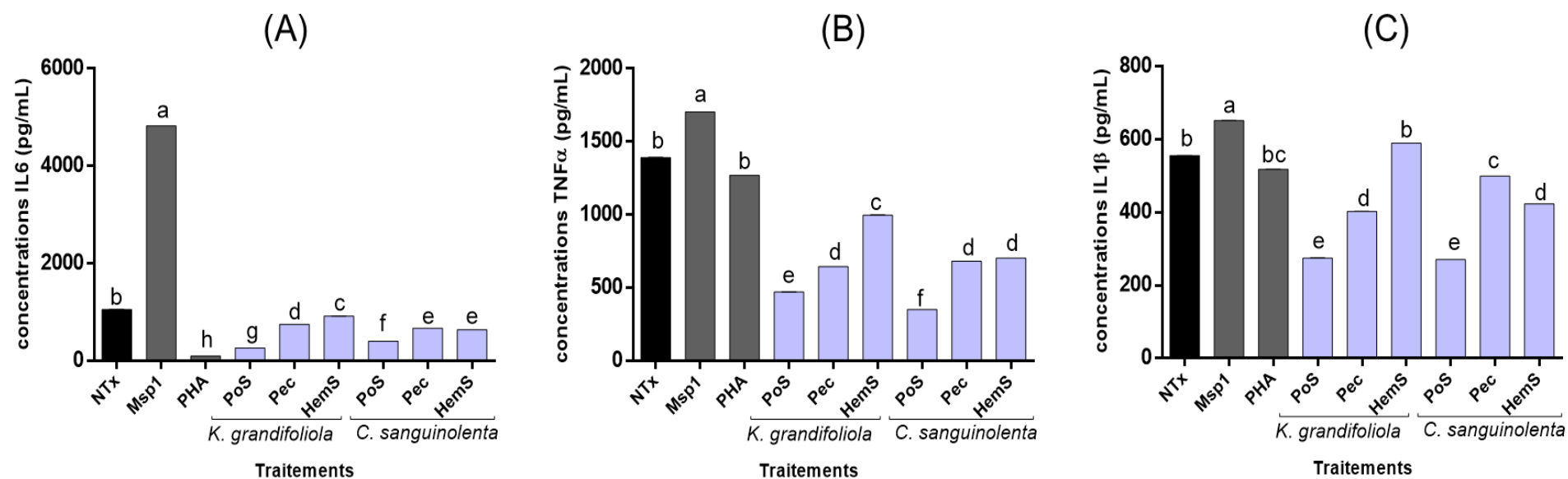
**Figure 23 :** Effet stimulateur de la prolifération des cellules mononuclées PBMCs par les extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*, de MSP1 et de PHA.

NTx = PBMCs non traitées; MSP1/PHA= PBMCs traitées avec MSP1 (20 µg/mL)/PHA (10 µg/mL) ; PoS, Pec, HemS = PBMCs traitées avec les extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. Sanguinolenta* (200 µg/mL). Différence significative  $p \leq 0,05$  ; a>b>c>d>e>f>g.

### **III.1.5.2. Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des cytokines pro-inflammatoires**

La technique Luminex a été utilisée dans cette étude pour analyser l'effet des extraits polysaccharidiques PoS, Pec et HemS (200 µg/mL) des deux plantes sur la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 par les cellules mononuclées humaines. L'effet de ces extraits a été comparé à celui de l'antigène malarique MSP1 et du mitogène PHA à 20 et 10 µg/mL respectivement.

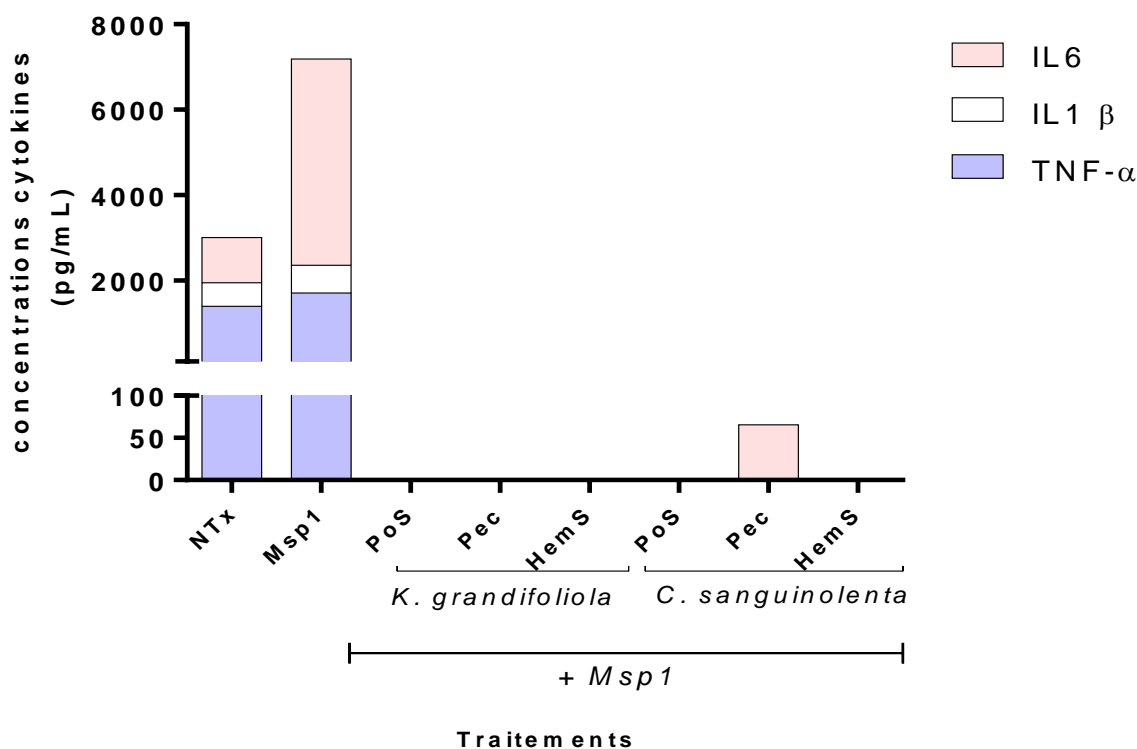
Les résultats illustrés par la Figure 24 démontrent que les PBMCs non traitées après 48 h d'incubation ont produit dans l'ordre décroissant le TNF- $\alpha$  ( $1393 \pm 0,58$  pg/mL), l'IL-6 ( $1055 \pm 0,5$  pg/mL) et l'IL-1 $\beta$  ( $556 \pm 0,57$  pg/mL). L'exposition des PBMCs à l'antigène malarique MSP1 entraîne une augmentation ( $p \leq 0,05$ ) de la production des trois cytokines, soient  $4826 \pm 0,6$  ;  $652 \pm 0,4$  et  $1704,22 \pm 0,53$  pg/mL respectivement pour TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ . Tandis qu'une exposition à PHA est sans effet significatif sur la production d'IL-1 $\beta$  ( $1270 \pm 0,2$  pg/mL) et de TNF- $\alpha$ , ( $518 \pm 0,58$  pg/mL), mais réduit la production d'IL-6 à  $103 \pm 0,57$  pg/mL ( $p \leq 0,05$ ). En outre, tous les extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* inhibent significativement ( $p \leq 0,05$ ) la production des trois cytokines d'intérêts. Les extraits PoS des deux plantes ont présenté de meilleures activités car ont réduit la production de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  à  $472 \pm 0,27$  ;  $103 \pm 0,21$  et  $275 \pm 0,58$  µg/mL pour PoS<sub>KG</sub> et  $271,03$  ;  $352,71$  et  $408,85$  µg/mL pour PoS<sub>CS</sub>.



**Figure 24 :** Effet inhibiteur des extraits polysaccharidiques, de PHA et de MSP1 de la production des cytokines pro-inflammatoires par les PBMCs; (A)- Production d'IL-6, (B)- Production de TNF- $\alpha$ , (C)- Production d'IL-1 $\beta$ .

**NTx** = PBMCs non traitées; **MSP1**= PBMCs traitées avec MSP1 (20  $\mu$ g/mL); **PHA**= PBMCs traitées avec PHA (10  $\mu$ g/mL) ; **PoS, Pec, HemS** = PBMCs traitées avec les extraits polysaccharidiques PoS, Pec et HemS de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* (200  $\mu$ g/mL).

Après traitement des PBMCs par les extraits polysaccharidiques des deux plantes, suivi de l'exposition à MSP1, aucune des trois cytokines d'intérêts n'a été détectée par le test Luminex ; excepté les PBMCs pré-traitées avec Pec<sub>CS</sub> qui ont faiblement produits IL-6 (inférieur à la production de NTx : témoin négatif) (Figure 25).



**Figure 25 :** Effet des extraits polysaccharidiques, des témoins positifs MSP1 et PHA sur la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  par les PBMCs.

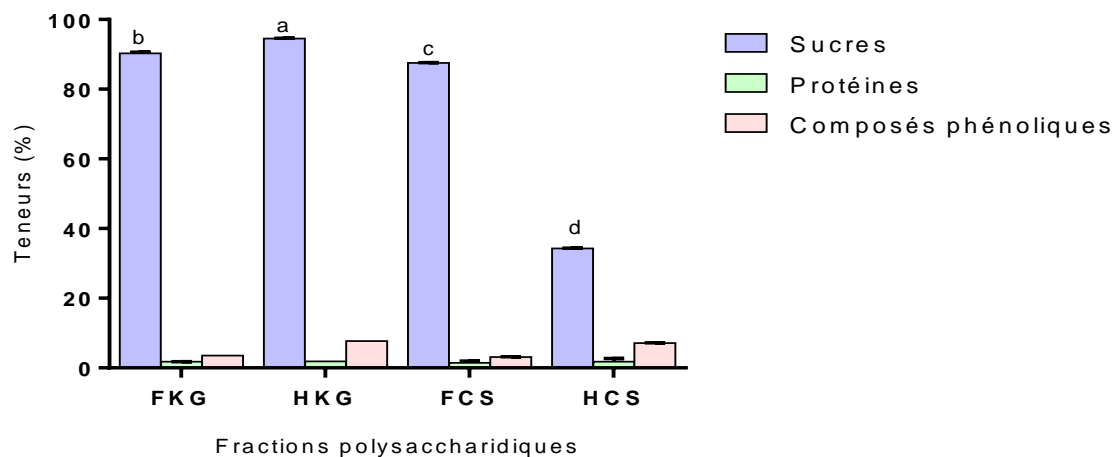
NTx = PBMCs non traitées; MSP1/PHA= PBMCs traitées avec MSP1 (20  $\mu$ g/mL) ou PHA (10  $\mu$ g/mL); PoS, Pec, HemS = PBMCs traitées avec extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* (200  $\mu$ g/mL).

### III.1.2. Effet inhibiteur de l'inflammation et de la cytotoxicité induites par LPS des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*

#### III.1.2.1. Analyse quantitative des sucres, protéines et polyphénols

La Figure 26 présente les différents pourcentages en sucres, protéines et composés phénoliques dans les fractions polysaccharidiques de faible (FKG, FCS) et haut poids moléculaires (HKG, HCS) de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* respectivement. Les

fractions de *K. grandifoliola* renferment les teneurs les plus élevées en sucre (soient  $90,30 \pm 0,35$  % et  $94,55 \pm 0,11$  % respectivement pour FKG et HKG) suivi de la fraction de faible poids moléculaire de *C. sanguinolenta* FCS ( $87,54 \pm 0,1$  %). Les teneurs des protéines et des composés phénoliques dans tous les extraits polysaccharidiques ont été inférieures à 8 %.



**Figure 26** : Teneurs en sucres, protéines et composés phénoliques totaux des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*.  $p \leq 0,05$  :  $a > b > c > d$ .

**FKG et HKG** : Fractions de faible et haut poids moléculaires des écorces de *K. grandifoliola*

**FCS et HCS** : Fractions de faible et haut poids moléculaires des feuilles de *C. sanguinolenta*.

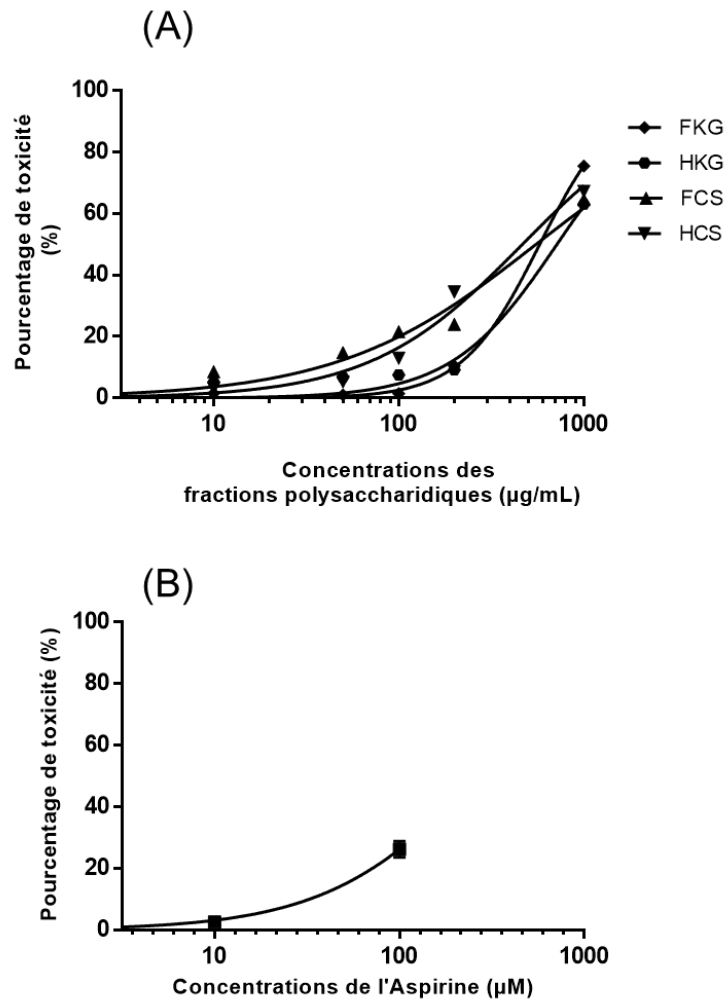
#### III.1.2.2. Effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur l'activité des macrophages Raw 264.7

##### III.2.2.1. Test de viabilité cellulaire au MTT

L'étude de la cytotoxicité des fractions polysaccharidiques sur les macrophages par le test MTT indique que ces dernières à des concentrations inférieures ou égales à 100  $\mu\text{g/mL}$  n'affectent pas significativement la viabilité des cellules après 24 h d'incubation (Figure 27A) excepté FCS. Néanmoins, les effets cytotoxiques des fractions polysaccharidiques augmentent de façon dose dépendante. A 1  $\text{mg/mL}$ , les pourcentages de cytotoxicité des fractions varient de  $63,1 \pm 7,4$  à  $75,6 \pm 0,3$  %. Par ailleurs, l'aspirine utilisé comme témoin positif pour cette étude a été non-toxique sur les macrophages jusqu'à 10  $\mu\text{M}$  (Figure 27B). En plus, l'effet des fractions polysaccharidiques à 100  $\mu\text{g/mL}$  et de l'aspirine à 1  $\mu\text{g/mL}$  sur la viabilité des macrophages exposés au LPS 10  $\mu\text{g/mL}$  a été évalué. Il en ressort que les macrophages prétraités avec les fractions de *K. grandifoliola* et exposé au LPS présentent une viabilité

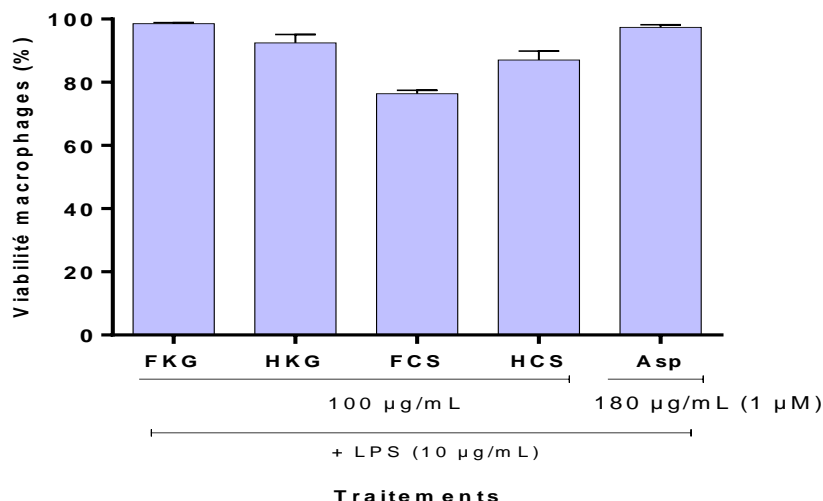


supérieure à 95 %. Tandis que ceux prétraités avec les fractions de *C. sanguinolenta* présentent une viabilité comprise de 80 à 90 % (Figure 28).



**Figure 27 :** Effet inhibiteur de la viabilité des des macrophages Raw 264.7 par les fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*

Les cellules Raw 264.7 ( $5.10^5$ cell/mL) ont été incubées pendant 24 h avec les concentrations indiquées des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta* (A) et de d'aspirine (B), le pourcentage de toxicité (1-[Pourcentage de viabilité cellulaire]).

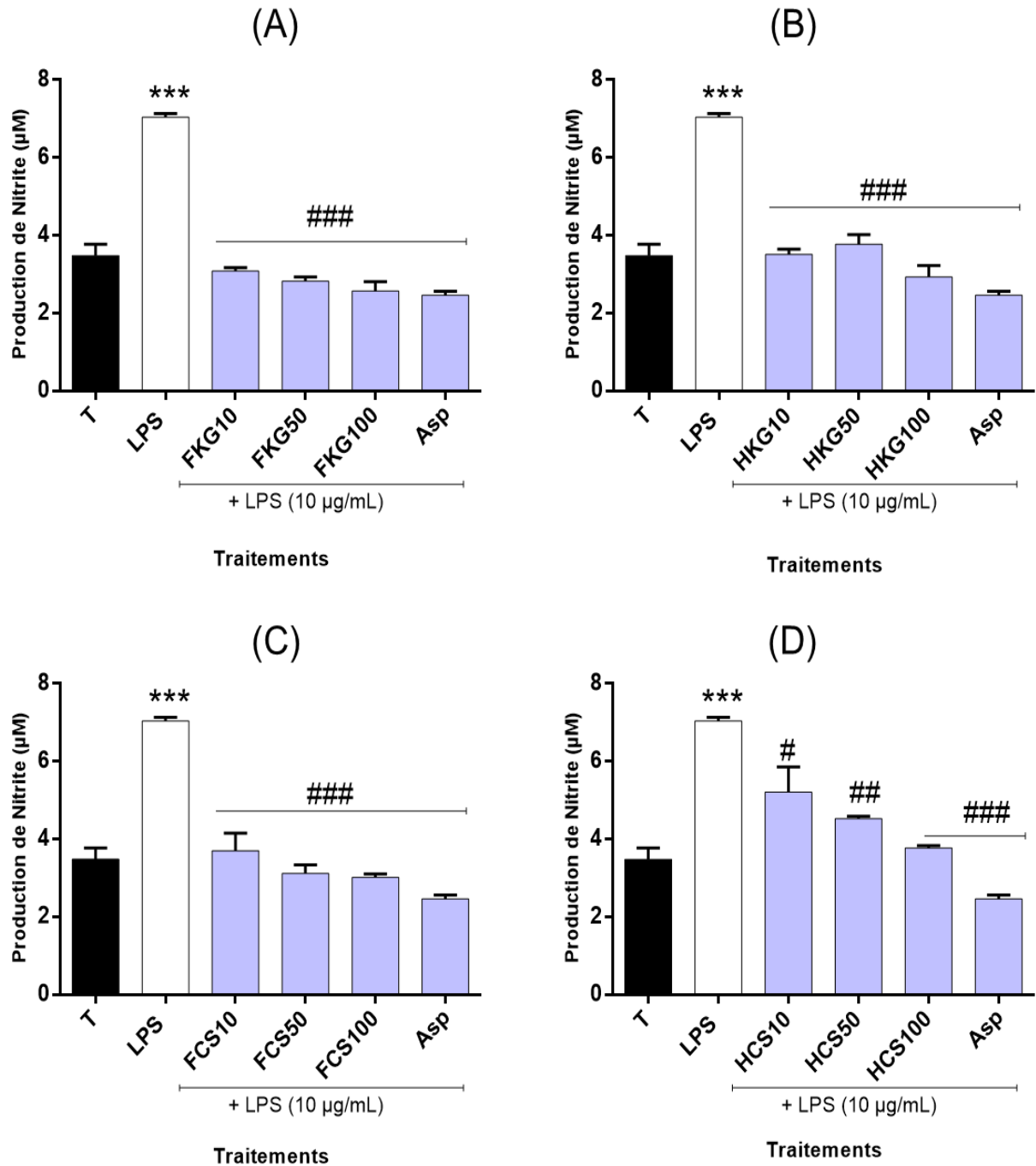


**Figure 28 :** Effet inhibiteur de la viabilité des macrophages Raw 264.7 par la co-exposition à LPS et aux fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*.

Les cellules Raw 264.7 ( $5.10^5$  cell/mL) ont été incubées pendant 24 h en présence fractions polysaccharidiques (100 µg/mL) de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* ou d'aspirine (1 µM), puis exposées à LPS (10 µg/mL).

### III.2.2.2. Effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur la production de NO

Après 24 h d'exposition des macrophages Raw 264.7 à 10 µg/mL de LPS, la concentration de nitrite dans le milieu de culture a doublé ( $p < 0.001$ ) soit ( $7,05 \pm 0,09$  µM) en comparaison à la production dans le milieu de culture des macrophages non exposés ( $3,5 \pm 0,3$  µM). Lorsque les cellules Raw 264.7 sont traitées avec les fractions polysaccharidiques une heure avant exposition à LPS, une inhibition significative ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ) est observée à partir de 10 µg/mL (Figure 29). Les concentrations en nitrites produits par les cellules traitées avec les fractions à 100 µg/mL et exposés à LPS (10 µg/mL) sont de  $2,52 \pm 0,25$  ;  $2,29 \pm 0,29$  ;  $3,01 \pm 0,09$  et  $3.75 \pm 0,06$  µM respectivement pour FKG, HKG, FCS et HCS. Au regard des pourcentages d'inhibition récapitulés dans le Tableau VIX, les fractions de faible poids moléculaire (PM) de chaque plante ont été plus actives que les fractions de haut PM. Toutefois, seule l'activité de FKG à 100 µg/mL a été comparable à celle de l'aspirine à 1 µM (180 µg/mL) soit  $64,85 \pm 1,44$  %.



**Figure 29** : Inhibition de la production de NO induite par LPS par l'aspirine (Asp) et les fractions polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta*. (A) & (B) : faible (FKG) et haut (HKG) PM de *K. grandifoliola* ; (C) & (D) : faible (FCS) et haut (HCS) PM de *C. sanguinolenta*.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$  en comparaison au groupe non traité ou témoin négatif (T). #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  et ###  $p < 0.001$  en comparaison avec le groupe traité au LPS (LPS).

**Tableau IX** : Effet inhibiteur des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* de la production de NO par les macrophages RAW 264.7 induite par LPS.

Traitements	Concentration (µg/mL)	Inhibition de NO (%)
<b>FKG</b>	10	55,97 ± 1,27 <sup>a</sup>
	50	59,64 ± 1,5 <sup>a</sup>
	100	63,32 ± 3,5 <sup>a</sup>
<b>HKG</b>	10	49,80 ± 1,94 <sup>a</sup>
	50	46,07 ± 3,5 <sup>a</sup>
	100	58,16 ± 4,18 <sup>a</sup>
<b>FCS</b>	10	47,09 ± 6,45 <sup>ab</sup>
	50	55,46 ± 3,09 <sup>b</sup>
	100	56,88 ± 1,27 <sup>a</sup>
<b>HCS</b>	10	25,56 ± 9,22 <sup>c</sup>
	50	35,30 ± 0,88 <sup>c</sup>
	100	46,07 ± 0,91 <sup>b</sup>
<b>Asp</b>	180 (1 µM)	64,85 ± 1,44 <sup>a</sup>

Macrophages Raw 264.7 traités avec les fractions de faible et haut PM de *K. grandifoliola* (FKG & HKG), de *C. sanguinolenta* (FCS & HCS) ou avec l'Aspirine (Asp), puis exposées à LPS 10 µg/mL (Différence significative  $p \leq 0.001$  ;  $a > b > c$ ).

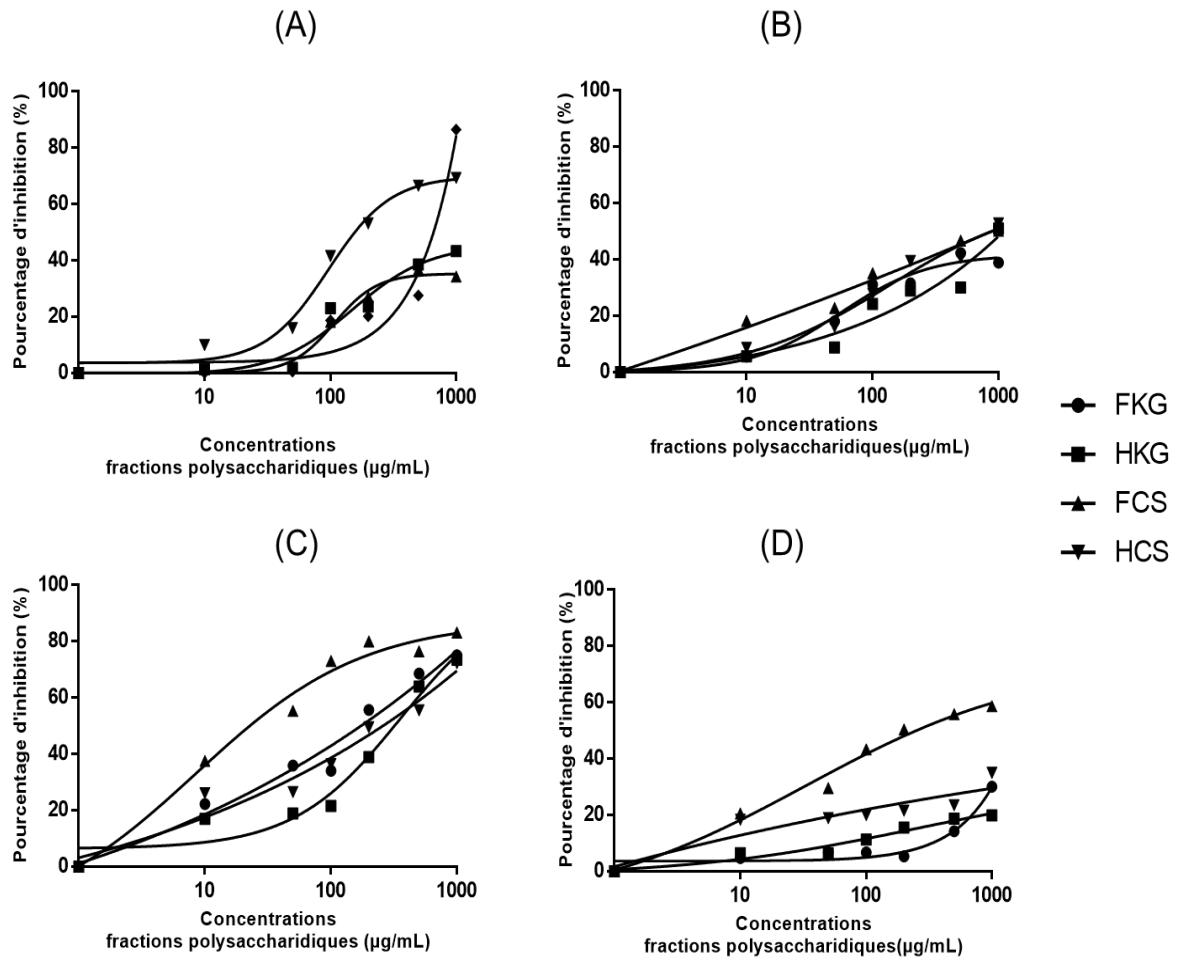
### III.1.2.3. Effet des fractions polysaccharidiques sur l'activité des cellules U87

#### III.1.2.3.1. Test de viabilité cellulaire au MTT

L'étude de la cytotoxicité des fractions polysaccharidiques de faible et haut PM de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* sur les cellules U87 s'est faite en utilisant le test de viabilité cellulaire au MTT. Il ressort de ce test que les fractions testées, à 100 µg/mL, n'affectent pas significativement la viabilité des cellules U87 après 48 h d'incubation excepté la fraction FCS (Figure 30A). Les effets cytotoxiques des fractions polysaccharidiques des deux plantes augmentent de façon dose dépendante et la viabilité cellulaire diminue avec des concentrations croissantes de fraction. A 1 mg/mL, les pourcentages de cytotoxicité des fractions varient de  $34,3 \pm 3,85$  % à  $86,5 \pm 1,3$  %. Les CI50 des fractions de *C. sanguinolenta* ont été de 216,9 (FCS) et 583,9 µg/mL (HCS). Tandis que les fractions de *K. grandifoliola* ont présenté une plus faible toxicité (CI50 > 1000 µg/mL). Les tests de cytotoxicité supplémentaires effectués sur

### Chapitre III : Résultats et Discussion

les lignées cellulaires (IMR32, A549 et MDA-MB 32) (Figures 30B, C & D) confirment effectivement que les fractions polysaccharidiques de *C. sanguinolenta* présentent une cytotoxicité plus élevée. Le Tableau X récapitule les valeurs des CI50 des différentes fractions.



**Figure 30 :** Cytotoxicité des fractions polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* et feuilles de *C. sanguinolenta* sur les lignées cellulaires U87 (A), IMR 32 (B), A549 (C) et MDA-MB 231 (D).

**Tableau X** : CI50 des différentes fractions polysaccharidiques.

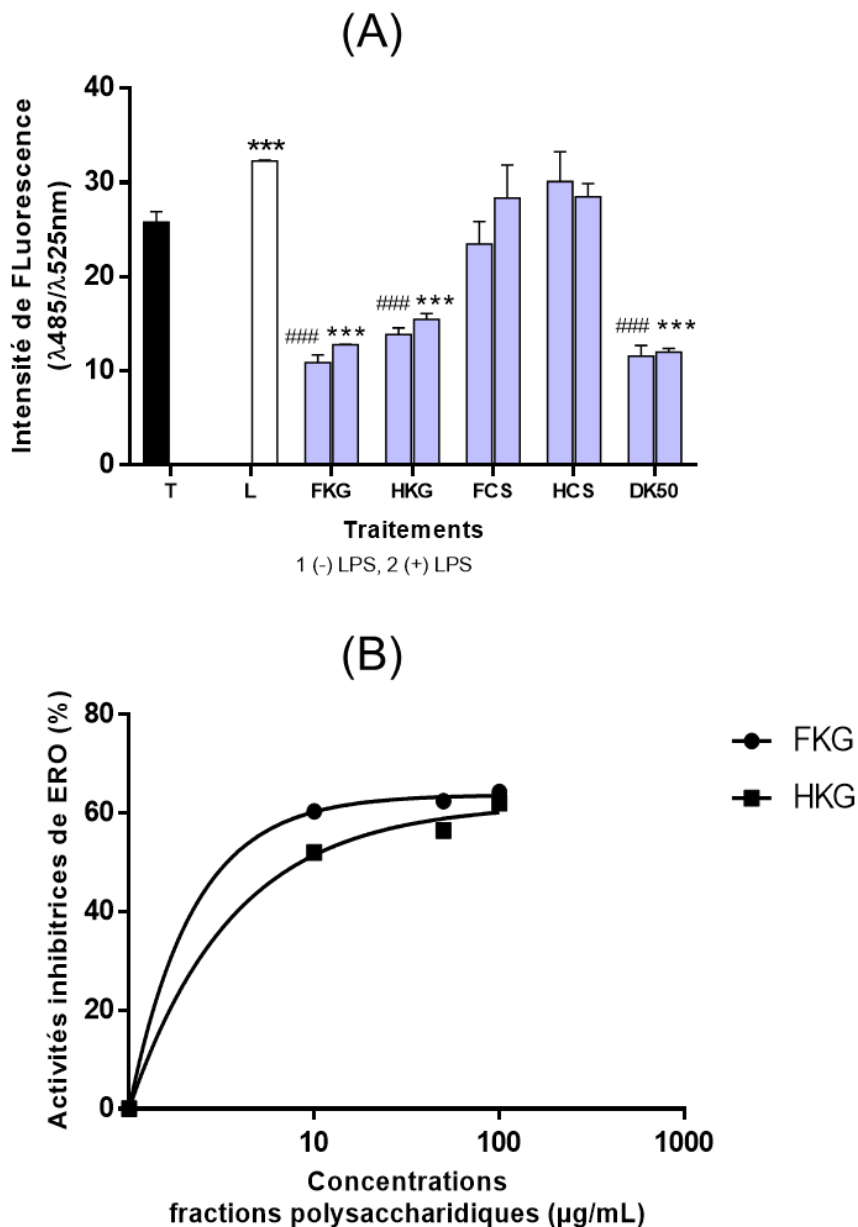
	Valeurs CI50 (µg/mL)			
	<i>K. grandifoliola</i>		<i>C. sanguinolenta</i>	
	FKG	HKG	FCS	HCS
<b>IMR32</b>	>1000	>1000	835,5	780,9
<b>A549</b>	155,7	307,3	24,14	236,6
<b>MDA-MB 231</b>	>1000	>1000	309,8	>1000

**FKG** : Fraction de faible poids moléculaire de *K. grandifoliola* ; **HKG** : Fraction de haut poids moléculaire de *K. grandifoliola* ; **FCS**: Fraction de faible poids moléculaire de *C. sanguinolenta* ; **HCS** : Fraction de haut poids moléculaire de *C. sanguinolenta*

**IMR 32** : cellules de neuroblastome humain, **A549** & **MDA-MB 231** : cellules d'adénocarcinome alvéolaire et mammaire.

### III.1.2.3.2. Effets des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur la production des ERO intracellulaires

Comme indiqué dans la Figure 31A, les cellules U87 non traitées ont produits les ERO, correspondant à une intensité de fluorescence (IF) de  $25,82 \pm 1,1$ . Le LPS (10 µg/mL) entraîne une augmentation significative de cette production, traduit par une IF de  $32,28 \pm 0,11$  ( $p \leq 0,001$ ). Seules les fractions de *K. grandifoliola* à la concentration test de 10 µg/mL réduisent significativement la production intracellulaire d'ERO en absence ou en présence de LPS. En effet, les IF de  $12,78 \pm 0,03$  et  $15,49 \pm 0,62$  ont été enregistré après 24 h d'incubation des cellules avec les fractions FKG et HKG respectivement. Ces activités sont comparables à celle du Diclofénac de potassium testé à 50 µg/mL. La Figure 31B présente les pourcentages d'inhibition des ERO des fractions FKG et HKG (10, 50, 100 µg/mL).



**Figure 31** : Production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) par les cellules U87 mesurée par le DCFH induit par le LPS ajouté dans le milieu de culture.

(A) T (Témoin)-Cellules non-traitées; L-Cellules exposées à LPS (10 μg/mL), FKG, HKG, FCS et HCS-Cellules traitées par les fractions polysaccharidiques des écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta* à 10 μg/mL, puis exposées à LPS 10 μg/mL ; DK50-Cellules traitées par le Diclofénac de potassium à 50 μg/mL, puis exposées à 10 μg/mL. (B) Effet des fractions de *K. grandifoliola* (10 à 100 μg/mL) sur la production de ERO par les cellules U87 incubées pendant 24 h en présence de LPS 10 μg/mL. \*, \*\*, \*\*\* p<0.05, p<0.01 & p<0.001 en comparaison au groupe Témoin (T). #, ##, ### p<0.05, p<0.01 & p<0.001 en comparaison au groupe LPS (L).



### III.1.2.3.3. Effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur la toxicité de LPS induite chez les cellules U87

La mort cellulaire induite par la toxine LPS a préalablement été évaluée par le test MTT. Il en résulte que la viabilité cellulaire diminue avec des concentrations croissantes de LPS (Figure 32). Les résultats présentés montrent que le traitement des cellules U87 par LPS (100 µg/mL) entraîne une réduction de la viabilité cellulaire à  $52,3 \pm 3,1$  %. Ainsi, la valeur CI50 (100 µg/mL) de LPS a été utilisée comme concentration toxique dans le test de cytoprotection utilisant le MTT. Les fractions polysaccharidiques *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* inhibent significativement la cytotoxicité de LPS de par leur capacité à stimuler la prolifération des cellules en présence de concentration toxique de LPS (Figure 33). En effet, le co-traitement des cellules U87 avec LPS et les fractions FKG, HKG, FCS et HCS a entraîné la réduction de l'action toxique de LPS ceci a été traduit par l'augmentation de la viabilité cellulaire comparativement au groupe de cellules traitées uniquement avec le LPS. Selon les concentrations tests (10 à 100 µg/mL), la fraction FKG a présenté la meilleure activité protectrice à 10 µg/mL avec une viabilité cellulaire de  $83,3 \pm 0,2$  % ( $p \leq 0,001$ ), tandis que HKG a été plus active à 100 µg/mL (viabilité cellulaire de  $90,03 \pm 2,41$  %,  $p \leq 0,001$ ). Les fractions FCS et HCS quant à elles ont été plus actives à 50 ( $p \leq 0,01$ ) et 10 µg/mL ( $p \leq 0,001$ ) respectivement. Cependant, contrairement aux polysaccharides de *K. grandifoliola*, les polysaccharides de *C. sanguinolenta* (100 µg/mL) malgré leurs activités cytoprotectrices ont entraîné une réduction significative de la viabilité cellulaire par comparaison au groupe non traité. Le Diclofénac de potassium non cytotoxique à 50 µg/mL a présenté de meilleures activités protectrices (viabilité cellulaire de 100 %) en comparaison à celle des fractions.

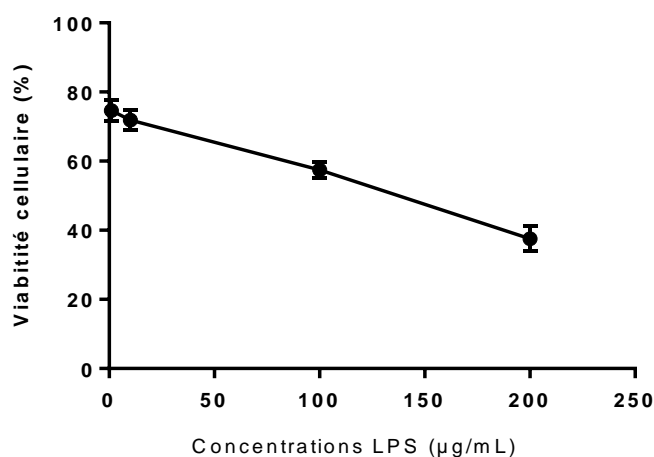
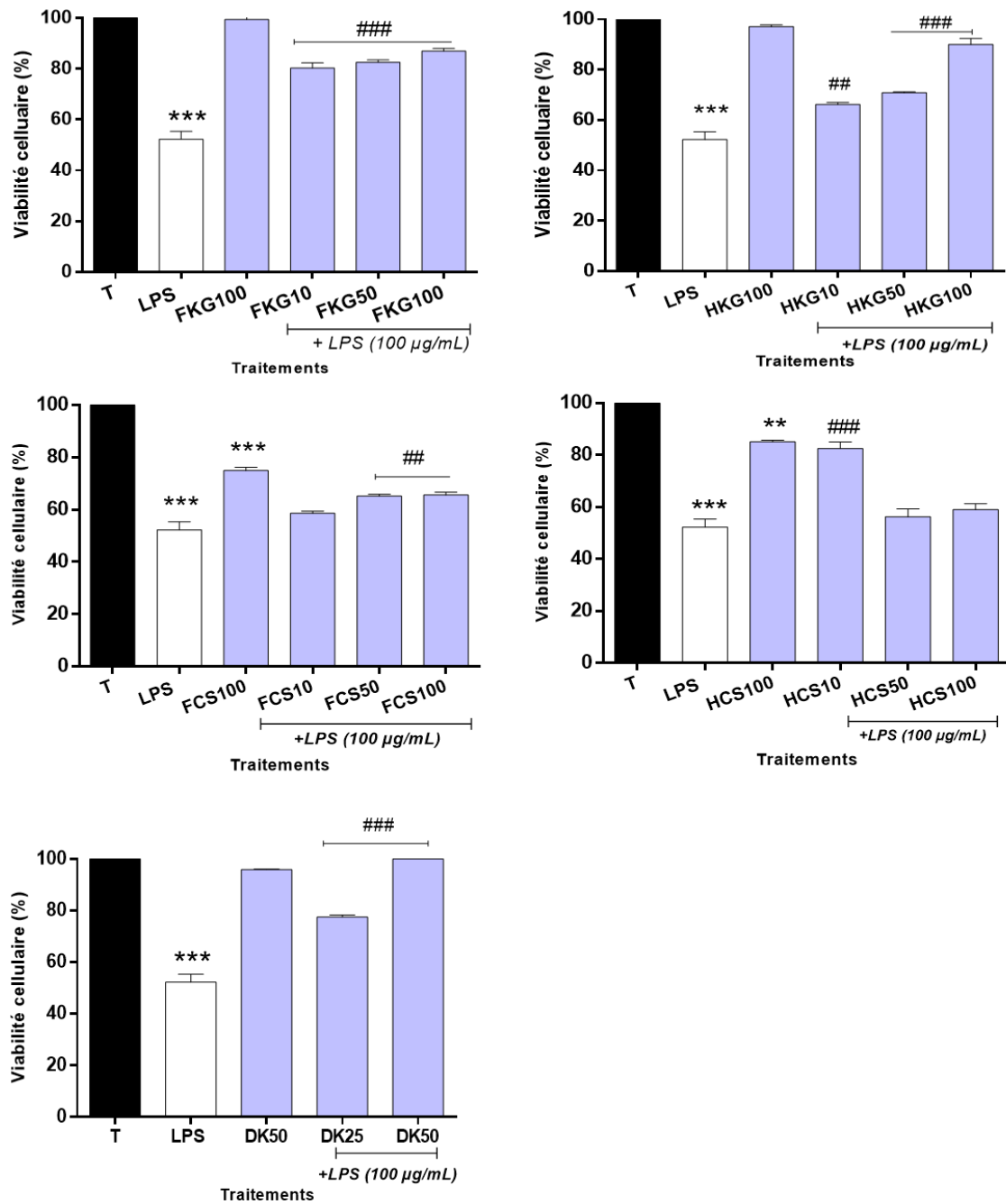


Figure 32 : Cytotoxicité de LPS sur les cellules U87 évaluée par le test MTT

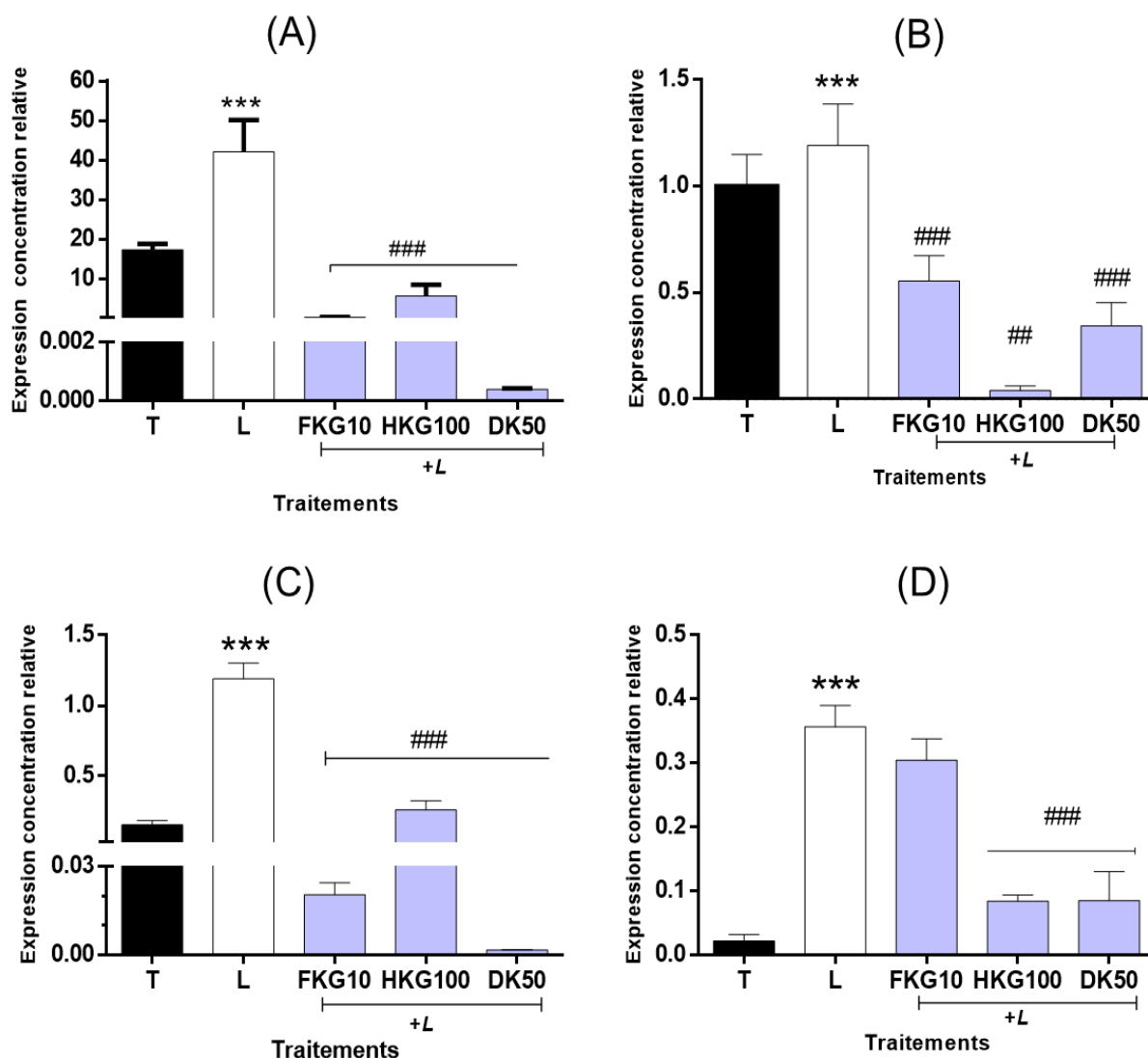


**Figure 33 :** Effet inhibiteur du Diclofénac de potassium et des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* de la mort cellulaire induite par LPS

T (Témoin)-U87 non-traitées; LPS-U87 traitées par LPS (100 µg/mL); DK 25, DK50- DK testés à 25 et 50 µg/mL. FKG & HKG-U87 traitées par les fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola*, FCS & HCS-U87 traitées par les fractions polysaccharidiques de *C. sanguinolenta*. \*, \*\*, \*\*\* p<0.05, p<0.01 & p<0.001 en comparaison au groupe Témoin (T). #, ##, ### p<0.05, p<0.01 & p<0.001 en comparaison au groupe LPS.

**III.1.2.3.4. Effet des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur la transcription génique du facteur NF- $\kappa$ B, et des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6**

Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 34. Il en ressort que le LPS a entraîné l'augmentation de la transcription génique de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , de NF- $\kappa$ B et d'IL-6 de 20, 8, 2,5 et 1,5 fois respectivement ( $p < 0.001$ ) en comparaison à la transcription des gènes cibles dans les cellules non traitées (Témoin). Cette augmentation induite par l'exposition à LPS a été inhibée par un traitement préalable avec les fractions FKG (10  $\mu$ g/mL) et HKG (100  $\mu$ g/mL) ( $p < 0.001$  ;  $p < 0.01$ ). De ces résultats, il en résulte que le traitement par les fractions protège les cellules U87 de l'intoxication à LPS tout en régulant l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 via l'inhibition de la transcription génique du facteur NF- $\kappa$ B. La différence d'effets entre les deux fractions est significative, FKG ayant été plus actif à inhiber la transcription de IL-1 $\beta$  et de NF- $\kappa$ B ; Tandis que HKG a été plus actif à inhiber la transcription d'IL-6. Toutefois, le Diclofénac de potassium à 50  $\mu$ g/mL a été plus actif que toutes les deux fractions excepté pour l'expression de la cytokine IL-6.



**Figure 34 :** Effet du prétraitement des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur la transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoires NF-κB (A), IL-6 (B), IL-1β (C) et TNF-α (D), induite par 100 µg/mL de LPS.

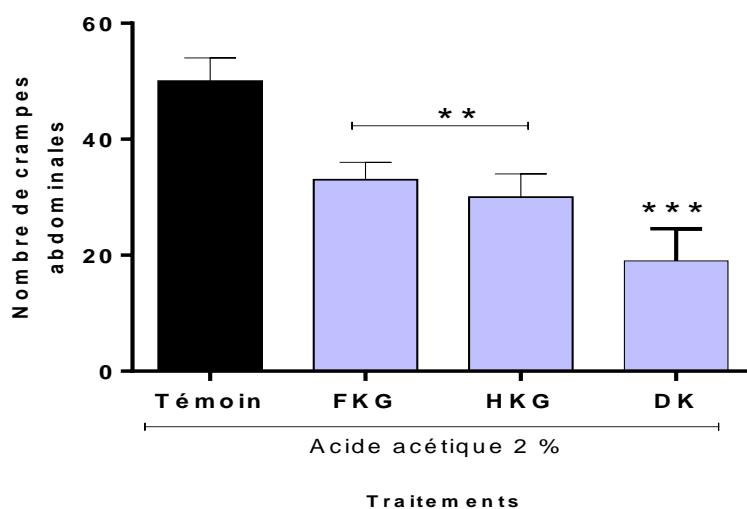
T (Témoin)-U87 non traitées; L (LPS)- (U87 exposées à LPS 100 µg/mL), FKG10, HKG 100 (U87 traitées par les fractions FKG et HKG respectivement à 10 et 100 µg/mL, puis exposées à LPS 100 µg/mL). DK50 (U87 traitées par le Diclofénac de potassium à 50 µg/mL, puis exposées à LPS 100 µg/mL). \*, \*\*, \*\*\* p<0.05, p<0.01 & p<0.001 en comparaison au groupe non traité (Témoin). #, ##, ### p<0.05, p<0.01 & p<0.001 en comparaison au groupe LPS.

### III.1.3. Effets antalgiques et anti-neuroinflammatoires *in vivo* des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola*

#### III.3.1.1. Effets antalgiques *in vivo* des fractions polysaccharidiques

##### III.3.1.1.1. Effet des fractions polysaccharidiques sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique

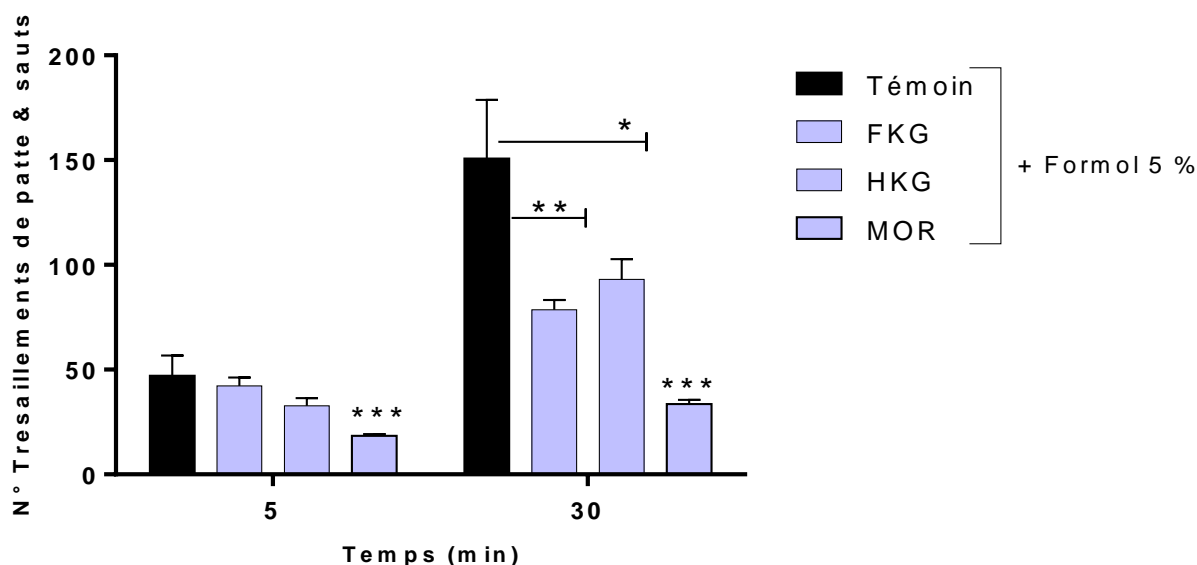
Les résultats présentés dans la Figure 35 démontrent que l'administration orale des fractions polysaccharidiques FKG et HKG à la dose de 100 mg/Kg chez les souris BALB/c cause la réduction du nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique ( $p < 0.01$ ). Les pourcentages d'inhibition en comparaison au groupe Témoin (solution saline + acide acétique) ont été de  $33,60 \pm 5,43$  % pour FKG et  $39,90 \pm 6,47$  % pour HKG. L'effet inhibiteur a été exprimé plus intensément lorsque le Diclofénac de potassium à la dose de 50 mg/kg a été administré (*a.o.*) indiquant un pourcentage d'inhibition de  $62,52 \pm 3,90$  ( $p < 0.001$ ) (Figure 35).



**Figure 35 :** Effet inhibiteur des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* du nombre de crampes abdominales induites par injection (*i.p*) d'acide acétique 2 % chez les souris BALB/c. La solution saline (Témoin), les fractions (FKG & HKG) à 100 mg/kg et le Diclofénac de potassium à 50 mg/kg (DK) ont été administrés 1 h avant le stimulus nociceptif. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  indique une différence significative en comparaison au groupe Témoin.

### III.3.1.1.2. Effet des fractions polysaccharidiques sur le nombre de tressaillements de la patte induits par le formol

Pour évaluer si les fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* présentent des effets anti-nociceptifs dans un autre modèle d'analgésie, elles ont été testées dans le modèle utilisant le Formol. Les fractions FKG et HKG (100 mg/kg, *a.o*) administrées 1 h avant injection de Formol réduisent significativement le nombre de tressaillements/ lèchements de la patte postérieure ou sauts des souris des groupes tests en comparaison aux souris du groupe Témoin (solution saline + Formol). Cet effet anti-nociceptif est observé à la seconde phase (Figure 36) avec des pourcentages d'inhibition de  $44,81 \pm 8,01$  % (FKG) et  $35,51 \pm 9,18$  % (HKG) en comparaison au groupe témoin ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Cependant, la morphine (5 mg/kg, sous cutanée) a significativement réduit la réponse au formol dans les deux phases. Les effets inhibiteurs de la morphine variaient de  $57,48 \pm 9,12$  % de réduction du nombre de tressaillements dans la première phase à  $76,36 \pm 4,19$  % de réduction dans la seconde phase ( $p < 0.001$ ).



**Figure 36 :** Effet inhibiteur des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* du nombre de lèchements/tressaillements de patte ou sauts induits par le formol chez les souris BALB/c. La solution saline (Témoin), les fractions (FKG & HKG) à 100 mg/kg et la morphine à 5 mg/kg, *s.c* (MOR) ont été administrés 1 h avant le stimulus nociceptif. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  indique une différence significative en comparaison au groupe Témoin.

### III.3.1.2. Effets des fractions polysaccharidiques sur la neuro-inflammation induite par LPS chez les souris BALB/c

#### III.3.1.2.1. Influence des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur la performance, la coordination motrice et l'activité locomotrice

Dans ce test, les fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* (100 mg/kg, *a.o*) réduisent modérément le temps de latence à tomber des souris de la barre rotative. Les résultats sont présentés dans le Tableau XI. De plus, 1 h après administration orale de FKG et HKG (100 mg/kg), l'activité locomotrice a été réduite de  $394,33 \pm 20,67$  à  $250,67 \pm 44,2$  et  $190,33 \pm 40$  à  $147,33 \pm 15,38$  respectivement (Tableau XII). Ces réductions ne sont cependant pas significatives en comparaison au groupe Témoin (solution saline) ( $p < 0,001$ ).

**Tableau XI :** Effet des fractions polysaccharidiques de faible et haut poids moléculaire de *K. grandifoliola* sur la performance et coordination motrice utilisant le *Rota-rod*

Groupes (n=6)	Temps de latence moyen (s)		Réduction du temps de latence (%)
	0 min	60 min	60 min
Témoin	$297 \pm 0,00$	$297 \pm 0,00$	$0 \pm 0$
FKG	$297 \pm 0,00$	$290 \pm 0,58$	$2,36 \pm 1,3$
HKG	$267,33 \pm 8,68$	$239 \pm 2,87$	$10,46 \pm 6,04$

Les fractions tests ont été administrées oralement 60 min avant le test. Les valeurs ont été représentées en Moyenne  $\pm$  ESM (n=6). Aucune différence significative entre les groupes tests et le groupe Témoin ( $p < 0,001$ ).

**Tableau XII :** Effet des fractions polysaccharidiques de faible et haut poids moléculaire de *K. grandifoliola* sur l'activité locomotrice utilisant l'*Actophotometer*.

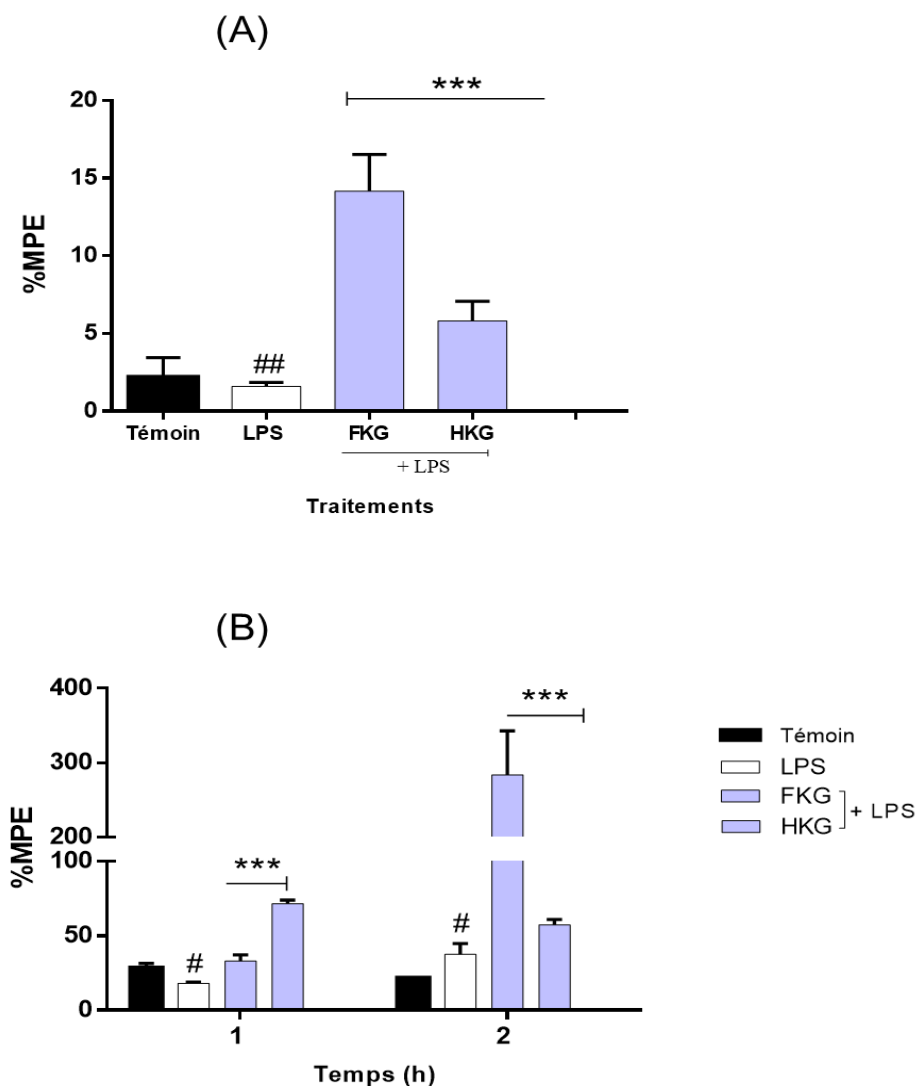
Groupes (n=6)	Score d'activité moyen		Réduction du Score d'activité (%)
	0 min	60 min	60 min
Témoin	$337,67 \pm 10,67$	$295,33 \pm 17,33$	$18,62 \pm 2,48$
FKG	$310,33 \pm 75,80$	$241,66 \pm 44,2$	$18,58 \pm 7,45$
HKG	$190,33 \pm 40$	$147,33 \pm 15,38$	$18,04 \pm 11,70$

Les fractions tests ont été administrées oralement 60 min avant le test. Les valeurs ont été représentées en Moyenne  $\pm$  ESM (n=6). Aucune différence significative entre les groupes tests et le groupe Témoin ( $p < 0,001$ ).



### III.3.1.2.2. Activités antinociceptives des fractions polysaccharidiques

La Figure 37 présente les effets de l'exposition systémique à LPS sur le temps de latence par le test d'immersion de la queue (test tail-flick) et le test de la plaque chauffante (test hot plate) chez les souris en présence ou absence des fractions de *K. grandifoliola*. L'augmentation du temps de latence a été considéré pour évaluer l'activité anti nociceptive (**Patel et al., 2017**). Les souris du groupe LPS (solution saline + LPS) ont montré une diminution significative de la latence moyenne par rapport aux souris du groupe Témoin (solution saline) avec les deux différentes stimulations thermiques. La réduction du pourcentage de l'effet maximum possible (% MPE) a été observée après 1 h d'injection par les deux tests *hot plate* ( $p < 0,01$ ) et *tail flick* ( $p < 0,05$ ). Cette diminution (une réponse amplifiée aux stimuli) est caractéristique d'une hyperalgésie chez les souris. Le traitement par les fractions FKG et HKG prévient efficacement cette hypersensibilité systémique induite par LPS chez les souris BALB/*c* testées ( $p < 0,001$ ) (Figure 37A & 37B).

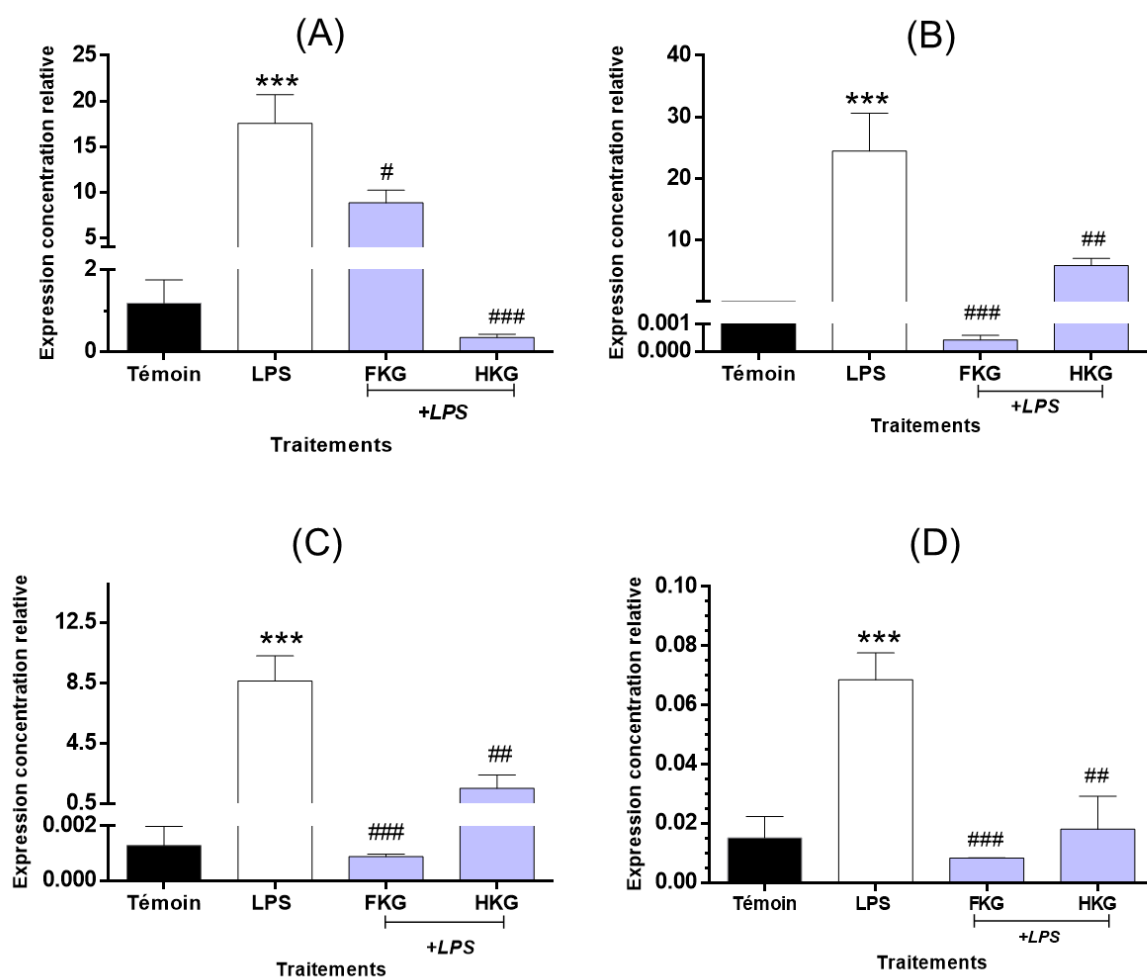


**Figure 37** : Effet stimulateur des fractions polysaccharidiques du seuil de résistance à la douleur induite par LPS par le test de la plaque chauffante (A) et le test d'immersion de la queue (B). #, ##, ### p<0,05, 0,01, 0,001, indique une différence significative en comparaison au groupe Témoin et \*, \*\*, \*\*\* p <0,05, 0,01, 0,001 en comparaison au groupe LPS.

### III.3.1.2.3. Effet des fractions polysaccharidiques sur la transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoires cérébraux

Afin d'évaluer si les fractions de *K. grandifoliola* exercent un effet suppresseur de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 dans le cerveau des souris BALB/c ayant reçu une injection de LPS (5 mg/kg, *i.p*). L'injection de LPS s'est faite une heure après administration orale des fractions. Puis l'ARN total a été isolé après 3h et le niveau de transcription des gènes NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 a été évalué par la PCR

quantitative. Comme indiqué dans la Figure 38, 5 mg/mL de LPS accroissent significativement la transcription des gènes codants pour NF- $\kappa$ B et les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 dans le cerveau des souris BALB/c ( $p < 0,001$ ). FKG et HKG à 100 mg/Kg (a.o) inhibent de façon significative la transcription de ces gènes induit par LPS. FKG a été plus actif à inhiber la transcription de NF- $\kappa$ B, d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) que celle d'IL-6 ( $p < 0,05$ ). Tandis que HKG a plus faiblement inhibé la transcription de NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), mais a été plus actif concernant IL-6.



**Figure 38 :** Effet des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur la transcription génique des médiateurs pro-inflammatoires cérébraux IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B), NF- $\kappa$ B (C) et TNF- $\alpha$  (D) induite par LPS chez les souris BALB/c.

Témoin-(solution saline), LPS (Solution saline + LPS 5 mg/kg ; *i.p*); FKG & HKG-(Solution saline + FKG & HKG 100 mg/kg ; *a.o* + LPS 5 mg/kg ; *i.p*). \*, \*\*, \*\*\*  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  &  $p < 0,001$  en comparaison au groupe Témoin. #, ##, ###  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  &  $p < 0,001$  en comparaison au groupe LPS.



### Chapitre III : Résultats et Discussion

d'autres composés tels que les protéines, les lipides et les composés phénoliques (lignines, subérine...). En effet, les protéines présentes dans la paroi interagissent spécifiquement avec les hémicelluloses et pectines pour former des complexes qui permettront de relâcher le réseau cellulose/hémicellulose et favoriser l'élongation cellulaire. Plusieurs travaux ont fait état de l'extraction de ces composés non polysaccharidiques à des concentrations variées lors de l'extraction des polysaccharides par des méthodes chimiques et/ou enzymatiques (**Chen et al., 2008 ; Aboughe, 2010 ; Dehong et al., 2014 ; Mediesse et al., 2014 ; Boudjeko et al., 2015**). Ceci justifierait la présence des protéines et des polyphénols dans les extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta*. Toutefois, les extraits PoS<sub>KG</sub> et PoS<sub>CS</sub>, renferment les teneurs les plus élevées en protéines et en composés phénoliques respectivement. Néanmoins, la forte présence des protéines dans les extraits PoS<sub>KG</sub> confirme la présence des glycoprotéines à l'instar des AGPs dans les écorces de *K. grandifoliola*, ce qui expliquerait que PoS<sub>KG</sub> (86,39 eqBSA/mg) renferme doublement plus de protéines que PoS<sub>CS</sub> (44,38 eqBSA/mg).

Dans le métabolisme de la plupart des organismes, l'oxydation est un processus important pour l'apport en énergie et génère des ERO, indispensables au déroulement du processus inflammatoire. Toutefois, les ERO produits de façon non-contrôlée sont toxiques pour l'Homme (**Favier, 2003**). Selon des études antérieures, l'activité antioxydante des macromolécules biologiques peut impliquer plusieurs mécanismes tels que la prévention de l'initiation de la chaîne, la décomposition des peroxydes, le piégeage des radicaux libres ou la capacité de réduction ou de fixation des catalyseurs à ions métalliques (**Chen et al., 2008 ; Yang et Zhang, 2009; Leopoldini et al., 2011**). Les tests antiradicalaires DPPH et ABTS réalisés dans cette étude sont utilisés dans les systèmes solvants aqueux et organiques et peuvent aussi être un index pour refléter l'activité antioxydante d'un échantillon test. Les extraits polysaccharidiques (PoS, Pec et HemS) des deux plantes d'intérêts possèdent des activités de piégeage des radicaux DPPH et ABTS et peuvent être explorés comme potentiels antioxydants. Cependant, **Chanda et Dave (2009)** recommande l'utilisation de plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante d'un extrait de plante *in vitro* vu la nature complexe des composés phytochimiques et des mécanismes d'oxydation *in vivo*. Les activités antiradicalaires des extraits polysaccharidiques d'écorces de *K. grandifoliola* et des feuilles de *C. sanguinolenta* pourraient être attribuées à la composition et aux caractéristiques spéciales des polysaccharides présents. Selon **Chen et al. (2007)**, la bio activité des polysaccharides dépend principalement de leur environnement chimique et de leur combinaison avec d'autres

### *Chapitre III : Résultats et Discussion*

composés tels que les polyphénols. Les extraits qui présentent les plus fortes teneurs en composés phénoliques possèderaient les activités antioxydantes les plus élevées. Les polyphénols étant reconnus comme ayant des fortes propriétés antioxydantes (**Muanda, 2010**). C'est ainsi que les polysaccharides solubles isolés du thé vert *Camellia sinensis*, d'*Acanthopanax senticosu* et de *Panax ginseng* C.A. Meyer ont présenté des activités antioxydantes fortement corrélées à leur teneur élevée en polyphénols (**Chen et al., 2007 ; Chen et al., 2011a ; Jiao et al., 2014a**). Cependant, la présence d'autres molécules que les polyphénols dans ces extraits ou alors la nature des sucres présents pourraient être responsables des activités observées. Ces dernières années, de nombreuses études ont été réalisées pour élucider la relation entre la composition en oses, la structure et les effets biologiques des polysaccharides. Des preuves accumulées ont mis en exergue la relation étroite entre la composition en oses des polysaccharides et leurs activités biologiques, spécialement les activités antioxydantes (**Yang et Zhang, 2009 ; Sun, 2011**). De plus, il a été rapporté que le poids moléculaire des polysaccharides étaient également un important paramètre influençant l'activité antioxydante et les polysaccharides de faibles poids moléculaires sont doués d'activités antioxydantes élevées (**Wang et al., 2010**). Les travaux de **Zeng et al. (2014)** ont également montré que les polysaccharides de *Cedrus deodar* possédaient un faible poids moléculaire et une teneur élevée en glucose. Ces caractéristiques spéciales seraient propices à la formation de ponts hydrogènes et amélioreraient la capacité des polysaccharides à donner un atome d'hydrogène pour piéger les radicaux libres, ce qui pourrait améliorer leurs activités antioxydantes. De ce fait, la forte activité des extraits PoS de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* se justifierait par leur teneur élevée en Glucose, mais aussi à une potentielle présence majoritaire des polysaccharides de faibles poids moléculaires. Selon **Sun (2011)** et **Tu (2012)**, les propriétés structurales des polysaccharides ont également une importante influence sur leurs activités biologiques. Ainsi, il a été démontré que les propriétés structurales telles que la distribution des embranchements et le modèle de liaison des ponts peuvent affecter l'interaction complexe des monosaccharides dans la molécule polysaccharidique pour améliorer sa capacité à donner un atome d'hydrogène, qui jouent un rôle important pour son activité antioxydante (**Chen et al., 2011b; Tu, 2012 ; Zeng et al., 2014**). Cependant le mécanisme exact des activités antioxydantes des polysaccharides n'est toujours pas parfaitement élucidé.

L'utilisation d'immunomodulateurs dérivés des plantes est attrayante car ils permettent d'améliorer les mécanismes de défense de l'hôte sans impliquer l'utilisation de produits

thérapeutiques spécifiques aux microorganismes tels que les antibiotiques (**Inngjerdingen et al., 2007**). Selon certains rapports, une large gamme de polysaccharides isolés des plantes supérieures améliorerait diverses réponses immunitaires allant de l'activation et la fixation du complément, la stimulation des macrophages à la prolifération des lymphocytes (**Aboughe et al., 2011**). C'est ainsi que les propriétés immunomodulatoires des extraits polysaccharidiques de nombreuses plantes de la pharmacopée africaine ont déjà été démontrées (**Aboughe et al., 2010**). Concernant l'effet des extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* sur les PBMCs, les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'**Inngjerdingen et al. (2005)**, de **Grzanna et al. (2006)**, de **Zha et al. (2007)**, d'**Inngjerdingen et al. (2008)**, de **Togola et al. (2008)**, d'**Aboughe (2010)** et de **Boudjeko et al. (2015)**. Ces auteurs ont montré que les polysaccharides pectiques et hémicellulosiques de quelques plantes (*Glinus oppositifolius*, *Spirulina platensis*, *Dendrobium huoshanense*, *Biophytum petersianum*, *Opilia celtidifolia*, *Laportea aestuans*, *chromolaena odorata*, *Allanblackia floribunda*) stimulaient la prolifération des cellules mononuclées, de même qu'une forte production des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 et INF- $\gamma$ . L'activité inhibitrice de la production d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  par les extraits polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* à la concentration de 200  $\mu\text{g/mL}$  suggèrerait ainsi des propriétés immunosuppressives ou anti-inflammatoires. Ces résultats corroborent les travaux d'**He et al. (2011)** qui, ont démontré que les polysaccharides d'*Astragalus membranaceus* inhibaient la production de TNF  $\alpha$  et IL- 1 $\beta$  chez les cellules mononuclées lymphocytaires stimulés par le LPS. Selon la littérature, les activités immunostimulantes des polysaccharides pourraient être augmentées avec des teneurs élevées en Arabinose, Galactose, Mannose, et une faible teneur en glucose (**Kim et al., 2005**). Les résultats de l'étude de **Min-bo Lan et al. (2010)** menée sur la réponse immunitaire ainsi que la détermination de la composition et les rapports en monosaccharides des polysaccharides des feuilles d'*Artemisia argyi* confirme cette hypothèse. Ainsi, les faibles teneurs en glucose, les teneurs élevées en mannose, de même que les poids moléculaires élevés étaient cruciales pour les activités immunostimulatoires des polysaccharides de cette plante. Par conséquent, les fortes activités immunosuppressives ou anti-inflammatoires des extraits de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* pourraient plutôt être liées aux teneurs élevées de glucose, mais également à la présence de galactose. Par ailleurs, la forte production des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  suite à une exposition à MSP1 (20  $\mu\text{g/mL}$ ) témoigne de l'implication de ces cytokines dans le déroulement de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'agent infectieux du paludisme, *Plasmodium falciparum*. Le PHA (10  $\mu\text{g/mL}$ ) quant à lui, bien que stimulateur de la



### Chapitre III : Résultats et Discussion

prolifération des PBMCs, n'influence pas la production TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . Néanmoins, il est un stimulateur de la production d'autres cytokines de l'immunité innée à l'instar de l'INF $\gamma$  (Boudjeko *et al.*, 2015). Au regard des résultats obtenus, aucune des trois cytokines d'intérêts n'a été détectée au test Luminex suite à l'exposition des PBMCs aux extraits polysaccharidiques (200  $\mu$ g/mL) et à MSP1 (20  $\mu$ g/mL) successivement excepté les PBMCs prétraitées avec Pec<sub>CS</sub> qui ont faiblement produits IL-6 (inférieur à la production de NTx : Témoin négatif). Ces résultats suggèreraient que les activités immunosuppressives ou anti-inflammatoires des extraits polysaccharidiques sur les cellules PBMCs sont accentuées par la présence de l'antigène malarique. Les mécanismes d'action biochimiques et moléculaires des polysaccharides sont divers ce qui explique les différences observées au niveau de la production des cytokines. En effet, les polysaccharides peuvent agir en se fixant sur les récepteurs de l'antigène ce qui aurait pour conséquence la réduction de son immunocompétence ou ils peuvent réguler la production des cytokines en agissant sur les facteurs de transcription génétiques. Cette production pourrait également être comparé à celle des cellules mononuclées du sang veineux des participants n'ayant jamais été exposés à *P. falciparum* (second Témoin négatif) à l'exemple des personnes vivantes en Amérique du Nord.

Les résultats obtenus sur les polysaccharides hydrosolubles totaux (PoS) des deux plantes ont suscité un grand intérêt. En outre, l'activité des polysaccharides étant fortement corrélée à leurs poids moléculaires, une précipitation des polysaccharides par ajout d'alcool à gradient de concentration permet l'obtention des polysaccharides de différents poids moléculaires (Zou *et al.*, 2013 ; Sheng et Sun, 2014). Ce travail rapporte pour la première fois l'effet des polysaccharides de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta* sur les cellules Raw 264.7 et U87. La cellule Raw 264.7 a été utilisée comme modèle de macrophages, tandis que U87 a été utilisée comme modèle de cellules gliales plus particulièrement des astrocytes en considérant l'effet de LPS dans les maladies liées à la neuro-inflammation telles que les maladies neurodégénératives. Comme prérequis à une évaluation appropriée des propriétés biologiques des composés purs isolés et des mélanges de composés, la cytotoxicité associée à de longues périodes d'incubation des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur les cellules a été déterminée par le test MTT. Ces fractions à des concentrations inférieures ou égales à 100  $\mu$ g/mL n'ont présenté aucune cytotoxicité significative sur la viabilité des cellules excepté la fraction FCS. Ces concentrations ont par conséquent été utilisées pour l'évaluation *in vitro* des activités anti-inflammatoires. Les concentrations inhibitrices 50 (CI50) des fractions polysaccharidiques FKG, HKC, FCS et HCS vis-à-vis des cellules Raw 264.7 ont été

### Chapitre III : Résultats et Discussion

respectivement de 600,9, 716, 245 et 465  $\mu\text{g/mL}$  suggérant ainsi que de toutes les fractions testées, celles de *C. sanguinolenta* possédant les plus faibles CI50 sont plus cytotoxiques. La même observation a été faite avec le test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules U87 avec des CI50 supérieur à 1000  $\mu\text{g/mL}$  pour les fractions de *K. grandifoliola* tandis que celles de *C. sanguinolenta* sont de 216,9 (FCS) et 583,9  $\mu\text{g/mL}$  (HCS). Nous avons ensuite investigué l'effet des fractions polysaccharidiques des deux plantes sur le système immunitaire, spécialement au niveau cellulaire, et démontré qu'ils régulent la production de NO par les macrophages. Le NO joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation et des fonctions immunitaires, et est formé par l'action de la *Nitric Oxide synthase* inductible (iNOS). Cette enzyme est régulée par la production des cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, TNF) et catalyse la production de NO à partir de la L-arginine utilisant le NADPH et l'oxygène moléculaire. La production excessive de NO a été étroitement associée à la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires notamment le choc septique, les arthrites rhumatoïdes et le diabète. Parce que la concentration élevée de NO est toxique, l'inhibition de la surproduction de NO est une cible importante pour les maladies inflammatoires (**Hur et al., 2012**). Au regard des résultats obtenus, la production de NO par les macrophages Raw 264.7 est réduite par les traitements avec les fractions polysaccharidiques (10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ). **Pacheco-sanchez et al. (2007)** et **Hur et al. (2012)** ont également reporté que le traitement par les polysaccharides extraits de *Collybia dryophila* et *Russula virescens* montrait un effet régulateur à la baisse de la production de NO par les cellules Raw 264.7 activées par LPS. Selon la classification de **Kim et al. (1998)**, le pourcentage d'inhibition de NO d'un extrait de plante représente son potentiel anti-inflammatoire. Ainsi, le traitement par les fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta* pourrait atténuer l'inflammation dans les macrophages Raw 264.7. Bien que les protéines et composés phénoliques ont été détectés en traces dans toutes les fractions polysaccharidiques (<8%), leurs activités biologiques pourraient être attribuées à la nature des sucres présents. En effet, plusieurs études ont suggéré que les activités biologiques des polysaccharides pourraient fortement dépendre de leur composition, leur structure, leur poids moléculaire et des branches glycosidiques. C'est ainsi que les polysaccharides types-glucanes ont démontré posséder des activités anti-inflammatoires (**Zhang et al., 2010**). Le mécanisme par lequel les fractions polysaccharidiques de ces plantes réduiraient l'inflammation dans les cellules Raw 264.7 n'est pas connu. Toutefois, l'explication possible de cet effet bénéfique serait que les polysaccharides de ces plantes piègeraient le NO produit qui est un radical libre. De plus, il a été rapporté que les polysaccharides de faible PM

### Chapitre III : Résultats et Discussion

montraient les meilleures activités anti radicalaires (**Wang et al., 2010**). Ce qui expliquerait qu'à 100 µg/mL, les fractions de faible PM des deux plantes (FKG et HKG) possèdent les meilleurs pourcentages d'inhibition de NO. D'autre part, les polysaccharides sont également capables d'inhiber la production de NO à travers la suppression de l'expression du gène iNOS dans les macrophages Raw 264.7 activées par LPS (**Hwang et al., 2011 ; Hur et al., 2012**). La capacité des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* et de *C. sanguinolenta* à moduler la production intracellulaire d'ERO a été également évaluée en utilisant les cellules U87. Mais, seules les fractions de *K. grandifoliola* à la concentration test de 10 µg/mL réduisent significativement la production intracellulaire d'ERO en absence ou en présence de LPS.

La neuroinflammation chronique endommage les cellules cérébrales et est éventuellement impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies telles que les maladies neurodégénératives. Par conséquent, il est important de rechercher des médicaments efficaces pour le traitement de ces maladies par inhibition des liaisons inflammatoires. Dans cette étude, le LPS a été utilisé pour induire les lésions inflammatoires dans les cellules U87 afin de simuler une inflammation des cellules gliales *in vitro*. Nos résultats démontrent qu'après 48 h d'exposition, le LPS à 100 µg/mL inhibe significativement la viabilité cellulaire, augmente l'apoptose et conduit à la surexpression des médiateurs pro-inflammatoires (ERO, NF-κB et cytokines TNF-α, IL-1β et IL-6) au niveau transcriptionnel dans les cellules U87. Ceci indique que dans cette étude le modèle de la neuro-inflammation utilisant le LPS a été établi avec succès. Par ailleurs, l'effet des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur la production des ERO, la cytotoxicité et la transcription de NF-κB, de TNF-α, d'IL-1β et d'IL-6, induites par LPS dans les cellules U87 a été évaluée. Les fractions FKG 10 µg/mL et HKG 100 µg/mL inhibent la production et l'expression des molécules pro-inflammatoires et cytotoxiques (ERO, NF-κB et cytokines TNF-α, IL-1β et IL-6) induites par LPS sur les cellules U87. Des résultats similaires ont été obtenus par **Xie et al. (2018)** démontrant que la stimulation par LPS a induit des dommages cellulaires dans les cellules PC12 par réduction de la viabilité cellulaire, de même que l'apoptose et l'augmentation du niveau d'expression d'IL-1β, IL-6 et TNF-α. Cependant le prétraitement par les polysaccharides d'une plante de la pharmacopée chinoise *Angelica sinensis*, a montré un effet protecteur des cellules PC12 contre les dommages cellulaires induits par LPS et inhibiteur de l'expression des cytokines d'intérêts (**Xie et al., 2018**). Les travaux de **Ren et al. (2018)** ont également démontré que les polysaccharides d'*Astagalus membranaceus* pourrait atténuer les lésions inflammatoires induites par LPS en augmentant la viabilité cellulaire, réduisant l'apoptose et inhibant la libération des cytokines

### Chapitre III : Résultats et Discussion

inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ) dans les cardiomyoblastes H9c2. Les effets des polysaccharides ont été associés à plusieurs voies de signalisation révélant leur mécanisme potentiel à l'instar de la voie NF- $\kappa$ B, connue pour jouer d'importants rôles dans plusieurs fonctions physiologiques incluant la prolifération cellulaire, la transformation maligne des tumeurs et l'inflammation (Li *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2015). L'inhibition de cette voie pourrait augmenter la viabilité cellulaire, diminuer l'apoptose et par conséquent les liaisons inflammatoires. Bien que le mécanisme moléculaire par lequel les polysaccharides de *K. grandifoliola* agiraient n'ait pas encore été élucidé, les résultats obtenus indiquent que par similitude aux polysaccharides d'*Astagalus membranaceus* (Ren *et al.*, 2018), les fractions FKG et HKG pourraient exercer leurs effets inhibiteurs des lésions inflammatoires induites par LPS à travers l'inhibition la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les astrocytes. Les résultats de la cytotoxicité obtenus, indiquent ainsi que les effets anti-inflammatoires des polysaccharides de *K. grandifoliola* sur les cellules U87 ou Raw 264.7 observés ne sont pas due à une cytotoxicité. Par ailleurs, les données obtenues des études *in vitro* déjà menées sur les écorces de *K. grandifoliola* suggèrent que les fractions et sous fractions au méthanol/chlorure de méthylène de *K. grandifoliola* possèdent un effet inhibiteur prometteur de l'expression des médiateurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le NO dans les macrophages Raw 264.7 et microglies N9. En effet, la fraction F25 riche en polyphénols de cette plante a été plus active à inhiber les mRNAs des cytokines pro-inflammatoires testées et de l'iNOS, de même que l'activité p38 MAPKinase et JNK3 (de l'ordre de près de 90 % et 60 % respectivement) (Owona *et al.*, 2015). Les polysaccharides étant reconnu comme adjuvants et utilisés dans la formulation des médicaments et des vaccins, une étude de l'effet combiné des fractions FKG/HKG et des polyphénols de la fraction F25 serait d'un apport pour le développement d'une formulation thérapeutique pour plusieurs maladies liées à l'inflammation ou la neuro-inflammation.

Considérant que l'utilisation des médicaments antalgiques et anti-inflammatoires (opioïdes et médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens) présente une large gamme d'effets secondaires, il existe actuellement un fort intérêt pour le développement d'agents thérapeutiques à partir des produits naturels (Vanderlei *et al.*, 2010). Une seule dose (100 mg/kg, *a.o*) des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* a été utilisée comme étude préliminaire pour investiguer leurs effets antalgiques et anti-inflammatoires *in vivo*. Cette étude montre que les fractions FKG et HKG, produisent des effets antalgiques dans les deux modèles utilisés. Le test de crampe abdominale induit par l'acide acétique chez la souris est largement utilisé comme outil de screening pour l'évaluation des propriétés antalgiques et anti-

### *Chapitre III : Résultats et Discussion*

inflammatoires de nouveaux composés, et a été décrit comme modèle typique de la douleur inflammatoire viscérale (**Le Bars et al., 2001**). Les effets de l'acide acétique sont attribués à la libération de plusieurs médiateurs tels que l'histamine, la sérotonine, les cytokines, les cyclooxygénases et leurs métabolites ; avec une augmentation des niveaux de liquide péritonéal de ces médiateurs. Ces derniers activent des nocicepteurs chimio sensibles qui contribuent au développement de la douleur inflammatoire (**Ribeiro et al., 2000**). Dans cette étude, FKG et HKG ont présenté un effet anti-nociceptif après traitement à l'acide acétique, suggérant que l'action de ces fractions polysaccharidiques pourrait être liée à l'inhibition de la production de ces médiateurs. Un effet similaire a été obtenu avec les polysaccharides des algues *Agardhiella ramosissima* et *Gracilaria cornea* (**Coura et al., 2012 ; Batista et al., 2014**). En outre, l'injection du formol (5 %) dans la patte induit une réponse biphasique (tressaillements/ léchage de la patte ou saut) chez la souris. La première phase est caractérisée par la douleur neurogène causée par une stimulation chimique directe des nocicepteurs. Cette phase est sensible aux médicaments qui interagissent avec les systèmes opioïdes. La seconde phase correspond à la douleur inflammatoire et est inhibée par les opioïdes et les médicaments anti-inflammatoires. Les substances qui agissent principalement comme antalgiques centrales (analgésiques) inhibent les deux phases de cette réponse à l'exemple de la morphine. Tandis que les médicaments agissants au niveau périphérique (antalgiques périphériques et anti-inflammatoires non-stéroïdiens) inhibent seulement la deuxième phase suggérant que leurs effets anti-nociceptifs peuvent être le résultat de l'inhibition des médiateurs inflammatoires libérés dans le tissu affecté (**Coura et al., 2012 ; Batista et al., 2014**). De nos résultats, les fractions FKG et HKG inhibent seulement dans la seconde phase suggérant que l'effet anti-nociceptif observé de ces polymères est lié à l'inhibition de la douleur périphérique inflammatoire provoquée par les stimuli chimiques. La fraction de faible poids moléculaire FKG a présenté la meilleure activité ( $p < 0,01$ ). De même, les polysaccharides d'*Agardhiella ramosissima* ont présenté un effet antalgique seulement à la deuxième phase (**Batista et al., 2014**). Par contre, les polysaccharides de *Gracilaria cornea*, et la morphine un analgésique de référence (**Coura et al., 2012**) ont été actifs au cours des deux phases.

L'une des étapes importantes dans l'évaluation de l'action d'un extrait ou composé sur le SNC est d'effectuer au préalable un test de neurotoxicité. Pour cette étude, les tests au *Rota Rod* et à l'*Actophotometer* ont été utilisés afin d'évaluer l'effet dépressif (effet sur la coordination motrice et l'activité locomotrice) des fractions chez les souris BALB/c utilisées. Ces tests mesurent le seuil d'excitabilité du SNC et une diminution de la performance /

### *Chapitre III : Résultats et Discussion*

coordination motrice et de l'activité locomotrice des souris résultent de la dépression du SNC (**Kondawar et al. 2011 ; Parvathi et Ravishankar, 2013**). Les polysaccharides de *K. grandifoliola* à 100 mg/kg *a.o.*, n'ont pas entraîné un effet déprimeur du SNC dans l'*Actophotometer* et sur la barre *Rotarod* en comparaison au groupe témoin (Solution saline). Cette dose a par conséquent été utilisée pour évaluer l'effet des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* sur les souris BALB/c injectées avec LPS.

Nos résultats ont montré que l'injection systémique de LPS (5 mg/kg ; *i.p*) induit premièrement une hyperalgésie thermique chez les souris BALB/c. Le test à la plaque chauffante réalisé est une méthode appropriée pour évaluer les effets d'un analgésique à action centrale mais pas périphérique. Tandis que le test d'immersion de la queue est basé sur un réflex aigü à médiation spinale aux stimuli thermiques nocifs. Les médicaments ayant une activité analgésique entraînent une augmentation du temps de latence des souris (**Patel et al., 2017**). Nombreux médicaments traditionnels utilisés pour le traitement des maladies inflammatoires ont montré une forte capacité de tolérance au stress dans ces deux modèles de nociception (**Batista et al., 2014**). Comme mentionné dans la littérature, dans notre étude, les fractions FKG et HKG prolongent la capacité de résistance à la douleur chez les souris dans le test à la plaque chauffante et d'immersion de la queue, ce qui indique que les activités anti-nociceptives des fractions polysaccharidiques de *K. grandifoliola* pourraient résulter d'un mécanisme à action central et périphérique en présence de LPS. Ces résultats suggèrent que le traitement par FKG et HKG (100 mg/kg) pour une courte période (1-2 h) pourrait prévenir l'hyperalgésie suite à l'exposition systémique à LPS. Selon **Patel et al. (2017)**, le mécanisme anti nociceptif à action centrale pourrait être dû à l'inhibition de la transmission nociceptive c'est-à-dire inhibition des voies ascendantes et descendantes de la douleur en agissant sur un récepteur opioïde et l'inhibition de la neurotransmission.

Enfin, les résultats de cette étude confirment qu'une injection (*i.p*) de LPS, mime une infection systémique type bactérienne comme cela se produit souvent chez les souris et provoque des modifications neuroinflammatoires durables. Bien que la neuro-inflammation induite par LPS ait été associée de manière déterminante à l'activation des microglies (**Qin et al., 2007 ; Owona, 2015**), les astrocytes jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cérébrale et dans la protection des neurones environnants des dommages causés par les agents infectieux. (**Volterra et Meldolesi, 2005**). Le mécanisme de ce dysfonctionnement prolongé du SNC implique la libération des cytokines pro-inflammatoires et partiellement l'activation du facteur NF- $\kappa$ B dans les astrocytes. Le mécanisme par lequel les



### *Chapitre III : Résultats et Discussion*

cytokines et les autres médiateurs pro-inflammatoires affectent le cerveau et les fonctions du SNC, reste largement inexploré. Selon **Fu et al. (2014)**, après injection systémique de LPS, l'expression de TNF- $\alpha$  dans le sérum précède la régulation à la hausse d'IL-1 $\beta$  suggérant que l'activation du système immunitaire innée et la libération des cytokines pro-inflammatoires dans la circulation systémique affectent négativement les fonctions du SNC. TNF- $\alpha$  a déjà été signalé comme marqueur précoce de la médiation du déclin cognitif après une lésion périphérique contribuant à l'ouverture de la Barrière Hémato-Encéphalique durant l'inflammation systémique et à la neurodégénérescence (**Sayed et al., 2010**). LPS a également la capacité de perturber l'interaction immuno-endothéliale au niveau de la BHE et permettre ainsi aux cellules immunitaires d'infiltrer directement le SNC ; de même LPS engage la voie de signalisation NF- $\kappa$ B comme mécanisme pour la libération des cytokines et contribue à la neuroinflammation. Les résultats obtenus suggèreraient qu'un prétraitement des souris par FKG et HKG inhiberait la transcription des cytokines TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  et TNF- $\alpha$  dépendante de l'inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B.



# *Conclusion et Perspectives*

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

### 1. Conclusion Générale

L'objectif général de la présente étude était d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les activités anti-inflammatoires des extraits et fractions polysaccharidiques des écorces de *Khaya grandifoliola* et des feuilles de *Cryptolepis sanguinolenta*. A partir des différents résultats obtenus, les conclusions suivantes ont été tirées :

- ✓ L'extrait PoS<sub>KG</sub> est riche en Arabinose, Glucose et Galactose ; et PoS<sub>CS</sub> en Arabinose et Glucose uniquement. Les Pectines des deux plantes seraient majoritairement de nature Rhamnogalacturonane de type I et les Hemicelluloses des Arabinoxylanes ou des Xyloglucanes. Les extraits PoS des deux plantes, fortement conjugués aux protéines et aux composés phénoliques, possèdent les meilleures activités de piégeage des radicaux libres, de stimulation de la prolifération des cellules mononuclées humaines PBMCs et d'inhibition de leur production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ).
- ✓ Les fractions de faible et haut poids moléculaire de *K. grandifoliola* (FKG et HKG) sont moins cytotoxiques que celles de *C. sanguinolenta* (FCS et HCS) et présentent les meilleures activités inhibitrices de la production de NO par les macrophages RAW 264.7 induite par LPS. De plus, FKG 10  $\mu$ g/mL et HKG 100  $\mu$ g/mL inhibent la production des ERO, inhibent la mort cellulaire et la transcription génique d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  dans les cellules gliales U87 exposées à LPS via l'inhibition de la transcription de NF- $\kappa$ B.
- ✓ FKG et HKG (100 mg/kg, *a.o.*) sont sans influence sur l'activité locomotrice, la performance et la coordination motrice des souris BALB/*c*. De plus, ils augmentent leur seuil de résistance à la douleur (induite par l'acide acétique, le formol et la chaleur) et inhibent la transcription génique des cytokines pro-inflammatoires cérébrales IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  induite par LPS également via l'inhibition de la transcription de NF- $\kappa$ B.

### 2. Perspectives :

Comme perspectives à cette étude, nous proposons d' :

- Optimiser les conditions d'extraction de FKG et HKG, puis évaluer *in vitro* et *in vivo* leurs effets sur les médiateurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) et sur d'autres médiateurs antioxydants telles que les enzymes antioxydantes;

- Elucider la structure des polysaccharides présents dans les fractions FKG et HKG et identifier leur mécanisme d'action anti-inflammatoire et inhibiteur de la toxicité induite par LPS ;
- Evaluer la toxicité aiguë, subaiguë et neurologique.

# *Références*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aboughe A. S. (2010). Extraction des polysaccharides hémicellulosiques de la paroi des feuilles de *Laportea aestuans* (*Fleurya aestuans*) et activité immunostimulante. *Science Sud* N°3. ISSN: 1998-0612.
2. Aboughe A. S., Nguema-Ona E., Boudjeko T., Driouich A. (2011). Review: Plant cell wall polysaccharides: Immunomodulators of the immune system and source of natural fibers. *Current topics in Phytochemistry*. 10: 17.
3. Aboughe A. S., Nguema-Ona E., Driouich A. (2010). La thérapie par les plantes en Afrique : Activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale. *Phytothérapie*. 8: 223-230.
4. Agbedahunsi J. M., Umeevuruo I. F., Elufioye T. O., Adepiti A. O. (2013). *In vivo* Interaction between Extracts of *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC (Meliaceae) and Artemisinin in a Murine Malarial Model. *European Journal of Medicinal Plants*. 3: 552-560.
5. Ajayi A., Akhigbe R., Adewumi O., Olaleye S. (2012) Haematological evaluation of *Cryptolepis sanguinolenta* stem ethanolic extract in rats. *International Journal of Medicine and Biomedical Research*. 1: 56-61.
6. Alban S., Classen B., Brunner G., Blaschek W. (2002) Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. *Planta Medica*. 68: 1118-1124.
7. Aldjia T. C. (2012). Evaluation *in vivo* de l'activité antiinflammatoire de l'extrait éthanolique d'écorce de *Fraxinus angustifolia* (Oleaceae). *Mémoire de Master en Génétique Appliquée, Université Abderrahmane MIRA –Bejaia*. 63p.
8. Ameyaw Y. (2012). Morpho-histological characters for the identification of *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schtr. *International Journal of Science and Nature*. 3: 331-339.
9. Ansah C. and Mensah K. B. (2013). A review of the anticancer potential of the antimalarial herbal *cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Ghana Medical Journal*. 47: 137-147.
10. Ansah C., Khan A., Gooderham N. J. (2005). *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Toxicology*. 208: 141-147.

11. Arai H., Furuya T., Yasuda T., Miura M., Mizuno Y., Mochizuki H. (2004). Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 beta, and expression of caspase-11 in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 51647-51653.
12. Ayoub F. Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. *Mémoire de Master en Biochimie, UNIVERSITE FERHAT Abbas –SETIF*. 90p.
13. Balaji S. P., Shanmuganathan M. V., Ramanathan M. (2015). Telmisartan attenuated LPS-induced neuroinflammation in human IMR-32 neuronal cell line via SARM in AT1R independent mechanism. *Life Sciences*. pp.1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.03.005>.
14. Barbé B., Blesson S., Jacobs J. (2011). Numération manuel des globules blancs dans le sang total : Sahli pipette. *Médecine Tropicale de Laboratoire, Unité: Médecine Tropicale de Laboratoire*. 6p.
15. Barton G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*. 118: 413-420.
16. Batista J. A., Dias E. G. N., Brito T. V., Prudêncio R. S., Silva R. O., Ribeiro R. A., Souza M. H. L. P., De Paula R. C. M., Feitosa J. P. A., Chaves L. S., Melo M. R. S., Freitas A. L. P., Medeiros J.-V. R., Barbosa A. L. R. (2014). Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. *Carbohydrate Polymers*. 99: 59-67.
17. Bi H., Han H., Li Z., Ni W., Chen Y., Zhu J., Gao T., Hao M., Zhou Y. (2011). A Water-Soluble Polysaccharide from the Fruit Bodies of *Bulgaria inquinans* (Fries) and Its Anti-Malarial Activity. doi:10.1093/ecam/neq 070. 12 p.
18. Bickii J., Nijifurie N., Foyere J. A., Basco L. K., Ringwald P. (2000). *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 69: 27-33.
19. Block L. (2014). Inflammation and Pain. .Department of Anaesthesiology and Intensive Care Institute of Clinical Sciences, Sahlgrenska Academy. University of Gothenburg. 70p.
20. Boakye-Yiadom K. (1979). "Antimicrobial properties of some west African medicinal plants II. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *cryptolepis sanguinolenta* (lindl.) schlechter." *Pharmaceutical Biology*. 17: 78-80.

21. Boudjeko T., Megnekou R., Woguia A. L., Mediesse K. F., Kanemoto W. E. J., Nounga T. C. D., Koum O. (2015). "Antioxidant and immunomodulatory properties of cell wall polysaccharides isolated from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L) King and *H.E. Robins* leaves". *BMC Research Notes*. (8)759.
22. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Analytical Chemistry*. 72: 248-254.
23. Bugyei K. A., Boye G. L., Addy M. E. (2010). Clinical efficacy of a tea-bag formulation of *Cryptolepis sanguinolenta* root in the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria. *Ghana Medical Journal*. 44: 3-9.
24. Bumah V. V. and Agbedahunsi J. M. (2009). Toxicological studies of the stem bark extract of *Khaya grandifoliola* in rats. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*. 13: ISSN: 1118-6267.
25. Bumah V. V., Essien E. U., Agbedahunsi J. M., Eka O. U. (2005a). Effects of *Khaya grandifoliola* on red blood cells and bone mineral content in rats. *Phytotherapy Research*. 19: 928-931.
26. Bumah V. V., Essien E. U., Agbedahunsi J. M., Eka O. U. (2005b). Effect of *Khaya grandifoliola* (Melianaceae) on some biochemical parameters in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 102: 446-449.
27. Callahan G. N. and Yates R. M. (2014). *Basic Veterinary Immunology*. University Press of Colorado, 1392p, Chapter 3 Inflammation and repair p.67-109.
28. Calvo M., Dawes J. M., Bennett D. L. (2012). The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet neurology*. 11: 629-642.
29. Chanda S. and Dave R. (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of microbiology research*. 3: 981-996.
30. Cheenpracha S., Park E.-J., Rostama B., Pezzuto J. M., Chang L. C. (2010). Inhibition of Nitric Oxide (NO) Production in Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Murine Macrophage RAW 264.7 Cells by the Norsesquiterpene Peroxide, Epimuquibilin A. *Marine Drugs*. 8, 429-437.
31. Chen H., Zhang M., Qu Z., Xie B. (2007). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*. 106: 559-63.



32. Chen R. Z., Liu Z. Q., Zhao J. M., Chen R. P., Meng F. L., Zhang M. (2011a). Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*. *Food Chemistry*. 127: 434-440.
33. Chen Y. F., Roan H. Y., Lii C. K., Huang, Y. C., Wang T. S. (2011b). Relationship between antioxidant and antiglycation ability of saponins, polyphenols, and polysaccharides in Chinese herbal medicines used to treat diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 2322-2331.
34. Chen Y., Xie M. Y., Nie S. P., Li C., Wang Y. X. (2008). Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*. 107: 231-241.
35. Cheng H., Feng S., Shen S., Zhang L., Yang R., Zhou Y., Ding C. (2013). Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch Polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 96: 101-108.
36. Chi D. S. and Harris N. S. (1978). Enhancement of human amniotic cell growth by Ficoll-Plaque blood lymphocytes. *Immunological Methods*. 19: 169-172.
37. Cimanga K., Li Y., De Bruyne T. (2000). "Inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions from *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter (Periplocaceae)." *Pharmacy and Pharmacology Communications*. 6: 321-325.
38. Claude K., Lydia B., Paul W. (2012). Efficacy of *Cryptolepis sanguinolenta* root extract on slow-growing rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*." *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 1140-1146.
39. Coura C. O., de Araffljo I. W. F., Vanderlei E. S. O., Rodrigues J. A. G., Quinder A. L. G., Fontes B. P., de Queiroz I. N. L., de Menezes D. B., Bezerra M. M., e Silva A. A. R., Chaves H. A. V., Jorge R. J. B., Evangelista J. S. A. M., Benevides N. M. B.. (2012). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea* *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 110: 335-341.
40. Da Silva C. J. Soldau K. Christen U., Tobias P. S., Ulevitch R. J. (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *Journal of Biology and chemistry*. 276: 21129-21135.
41. De Miranda G. F. B., Vilar J. C., Nunes Alves I. A., Cavalcanti S. C. H., Antonioli A. R. (2001). Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of

- Tabebuia avellendae* lor. Ex griseb. Inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*. 1, 6.
42. Dehong H., Zhang D., Huang B., Yi P., Yan C. (2014). Structural characterization and DPPH radical scavenging activity of a polysaccharide from *Guara* fruits. *Carbohydrate Polymers*. 103: 143–147.
  43. Diallo D., Berit S. P., Torun H. A. L., Terje E. M. (2003). The Malian medicinal plant *Trichilia emetica*, studies on polysaccharides with complement fixing ability. *Journal of Ethnopharmacology*. 84: 279–287.
  44. Disabato D., Quan N., Godbout J. P. (2016). Neuro-inflammation: The devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*. 139: 136-153.
  45. Donkor A. F. (2016). Efficacy, pharmacokinetics and safety evaluation of cryptolepine-artemisinin based combinations in the management of uncomplicated malaria. Ph.D. thesis, Kwame Nkrumah University of Science and Technology.
  46. Dorward D. A., Lucas C. D., Rossi A. G., Haslett C., Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics*. 135: 182-199
  47. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
  48. El souda S. S., Aboutabl E. A., Maamoun A. A., Hashem F. A. (2016). Volatile Constituents and Cytotoxic Activity of *Khaya grandifoliola* and *Khaya senegalensis* Flower extracts. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 22: 183-189.
  49. Eruslanov E. and Kusmartsev S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry." *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology*. 594: 57-72.
  50. Essama M. D. S., Mezui C., Nkwengoua Z. E., Enow-Orock E. G., Tan P. V. and Nyasse B. (2016). Cytoprotective and Antioxidant Properties of the Stem Bark Aqueous extract of *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) in Rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 9: 1-11.
  51. Fan J., Wu Z., Zhao T., Sun Y., Ye H., Xu R., Zeng X. (2014). Characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb. *Carbohydrate Polymers*. 101: 990-997.

52. Farina C., Aloisi F. and Meinl E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunology*. 28: 138-145.
53. Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. Laboratoire Lésions des acides nucléiques, Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble. 08p.
54. Frederich M., Tits M. and Angenot L. (2008). Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102: 11-19.
55. Fu H. Q., Yang T., Xiao W., Fan L., Wu Y. Terrando N. and Wang T. L. (2014). Prolonged Neuroinflammation after Lipopolysaccharide Exposure in Aged Rats. *PLoS ONE*. 9(8).
56. Galani B., Sahuc M. E., Sass G., Njayou F., Loscher C., Mkounga P., Deloison G., Brodin P., Rouillé Y., Tiegs G., Séro K., Moundipa P. (2016). *Khaya grandifoliola* C.DC: a potential source of active ingredients against hepatitis C virus *in vitro*. *Virology*. 161: 1169-1181.
57. Ge Q., Mao J. W., Guo X. Q., Zhou Y. F., Gong J. Y., Mao S. R. (2013). Composition and antioxidant activities of four polysaccharides extracted from *Herba Lophatheri*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 60: 437-441.
58. Grandin M. (2013). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. Thèse de Pharmacie. Université d'Angers. 116p.
59. Grellier P, Ramiamananana L., Millerioux V., Deharo E., Schrével J., Frappier F., Trigalo F., Bodo B., Pousset J-L. (1996). Antimalarial activity of cryptolepine and isocryptolepine, alkaloids isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Phytotherapy Research*. 10: 317-321.
60. Grzanna R., Polotsky A., Phan P. V., Pugh N., Pasco D., Frondoza C. G. (2006). Immolina, a High-Molecular-Weight Polysaccharide Fraction of Spirulina, Enhances Chemokine Expression in Human Monocytic THP-1 Cells. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 12: 429-435
61. Gudivaka V. R. (2014). Synthesis, analysis and biological evaluation of novel indoloquinoline cryptolepine analogues as potential antitumour agents [Ph.D. thesis], Kingston University.

62. Hashem F. A., Aboutabl E. A., El-Souda S. S., Selim A., Shaker K., Maamoun A. A. (2014). Composition of lipoidal matter and evaluation of hepatoprotective, cytotoxic, and antioxidant activities of *Khaya grandifoliola* C.DC. Growing in Egypt. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 13: 13-20.
63. Hawthorne W. (1998). *Khaya grandifoliola* description. IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
64. Hayat T. (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*. *Thèse de Doctorat en Biologie, Université Ferhat Abbas Sétif*. 147p.
65. He X., Shu J., Xu L., Lu C., Lu A. (2011). Inhibitory Effect of *Astragalus* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF  $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in THP-1 Cells. *Molecules*. 17: 3155-3164.
66. Hendra R., Ahmad S., Oskoueian E., Sukari A., Shukor M. Y. (2011). Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11:110.
67. Hosseini N. K., Jose S., Vidyadaran S., Nordin S. A. (2014). Optimization of cell density and LPS concentration for the evaluation of nitric oxide production on BV-2 cells in a Griess assay. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 10: 1-8.
68. Huang X., Li Q., Li H., Guo L. (2009). Neuroprotective and Antioxidative Effect of Cactus Polysaccharides *In Vivo* and *In Vitro*. *Cell Molecular Neurobiology*. 29:1211-1221.
69. Hur S. J., Choi S. Y., Lim B. O. (2012). *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity of *Russula virescens* in the Macrophage like Cell Line RAW 264.7 Activated by Lipopolysaccharide. *Journal of Nutrition and Food Science*. 2:142. Doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000142>.
70. Hutchinson J. and Dalziel J. M. (1978). Flora of West Tropical Africa, part 1. Crown Agents for Overseas Government and Administration, Millbank, London SW1, 2nd Ed. 345-520.
71. Hwang P. -A., Chien S.-Y., Chan Y.-L., Lu M. -K., Wu C. -H., Kong Z. -L., Wu C. -J. (2011). Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses by *Sargassum hemiphyllum* Sulfated Polysaccharide Extract in RAW 264.7 Macrophage Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 2062-2068.

72. Ijarotimi S. O., Agbedahunsi J. M., Onyeji C. O., Adewunmi C. O. (2010). Chemotherapeutic interaction between *Khaya grandifoliola* (welw) CDC stem bark extract and two anti-malarial drugs in mice. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*. 7: 370-376.
73. Inngjerdingen K. T., Debes S. C., Inngjerdingen M., Hokputsa S., Harding S. E., Rolstad B., Michaelsen T. E., Diallo D., Paulsen B. S. (2005). Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 204-214.
74. Inngjerdingen K. T., Patel T. R., Chen X., Kenne L., Allen S., Morris G. A. Harding S. E., Matsumoto T., Diallo D., Yamada H., Michaelsen T. E., Inngjerdingen M., Paulsen B. S. (2007). Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology*. 17: 1299-310.
75. Inngjerdingen M., Inngjerdingen K. T., Patel T. R., Allen S., Chen X., Bent R., Morris G. A., Harding S. E., Michaelsen T. E., Diallo D., Paulsen B. S. (2008). Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells. *Glycobiology*. 18: 1074-1084.
76. Jager W., Velthuis H., Prakken B. J., Kuis W., Rijkers G. T. (2003). Simultaneous Detection of 15 Human Cytokines in a Single Sample of Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10: 133-139.
77. Jansen P. C. M. and Schmelzer G. H. (2010). *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr. *Plant Resources of Tropical Africa (Prota)*. [http://uses.plantnet-project.org/en/Cryptolepis sanguinolenta](http://uses.plantnet-project.org/en/Cryptolepis_sanguinolenta) (PROTA).
78. Ji S., Li F., Liu Y., Ren H., Gong G., Wang Y., Wu S. (2013). Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. *International Journal of Biological Macromolecules*. 62: 66-69.
79. Jiao L., Li B., Wang M., Liu Z., Zhang X., Liu S. (2014a). Antioxidant activities of the oligosaccharides from the roots, flowers and leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Carbohydrate Polymers*. 106: 293-298.
80. Jiao L., Zhang X., Li B., Liu Z., Wang M., Liu S. (2014b). Anti-tumour and immunomodulatory activities of oligosaccharides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 65: 229-233.

81. Jin L., Guan X, Liu W., Zhang X., Yan W., Yao W., Gao X. (2012a). Characterization and antioxidant activity of a polysaccharide extracted from *Sarcandra glabra*. *Carbohydrate Polymers*. 90: 524-532.
82. Jin M. L., Zhao K., Huang Q. S., Xu C. L., Shang P. (2012b). Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: a review. *Carbohydrate Polymers*. 89: 713-722.
83. Kang C.-H., Choi Y. H., Choi I.-W., Lee J.-D., Kim G.-Y. (2011). Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced iNOS, COX-2, and TNF- $\alpha$  Expression by Aqueous Extract of *Orixa Japonica* in RAW 264.7 Cells via Suppression of NF- $\kappa$ B Activity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 10 (2): 161-168.
84. Katalinić V., Milos M., Modun D., Musi I., Boban M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) -catechin. *Food Chemistry*. 86: 595-600.
85. Kim O., Murakami A., Nakamura Y. and Ohigashi H. (1998). Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Letters*. 125:199-207.
86. Kim Y. O., Han S. B., Lee H. W., Ahn H. J., Yoon Y. D., Jung J. K. M., Kim H. M., Shin C. S. (2005). Immuno stimulating effect of the endo-polysaccharides produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences*. 77: 2438-2456.
87. Kirby G. C., Paine A., Warhurst D. C., Noamese B. K., Phillipson J. D. (1995). *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant-derived indoloquinoline. *Phytotherapy Research*. 9: 359-363.
88. Komlaga G., Agyare C., Dickson R. A. (2015). "Medicinal plants and finished marketed herbal products used in the treatment of malaria in the Ashanti region, Ghana." *Journal of Ethnopharmacology*. 172: 333-346.
89. Kondawar M. S., Kamble K. G., Khandare M. M., Maharshi K. H., Awale V. B. (2011). Evaluation of the locomotor and diuretic activities of ethanolic extract of leaves of *Capparis divaricata* lam. (capparidaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 265-267.
90. Kuete V. and Efferth. T. (2010). Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Frontiers in pharmacology and ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.3329/fphar.2010.00123>.
91. Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. (2001). Évaluation de la douleur aiguë chez l'animal d'expérience. Première partie. *Ann Fr Anesth Réanim* : 20 : 347-65.



92. Lei W., Browning Jr. J., Eichen P. A., Lu C. H., Mossine V. V., Rottinghaus G. E., Folk W. R., Sun G. Y., Lubahn D. B., Fritsche K. L. (2015). Immuno-stimulatory activity of a polysaccharide-enriched fraction of *Sutherlandia frutescens* occurs by the toll-like receptor-4 signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 172: 247–253.
93. Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125: 288-306.
94. Li P. and Wang F. (2015). Polysaccharides: Candidates of promising vaccine adjuvants, Review. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 9: 88-93.
95. Li Q. and Verma I. M. (2002). NF-kappa-B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2: 725-734.
96. Li Y. J., Wu S. L., Lu S. M. (2015). (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits nasopharyngeal cancer stem cell self-renewal and migration and reverses the epithelial-mesenchymal transition via NF- $\alpha$ B p65 inactivation. *Tumour Biology*. 36: 2747-2761.
97. Liang F., Hu C., He Z., Pan Z. (2014). An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium* : Structural and bioactivity studies. *Carbohydrate Research*. 387: 37-41.
98. Liu B., Gao H. M., Wang J. Y., Jeohn G. H., Cooper C. L., Hong J. S. (2002). Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 962: 318–331.
99. Liu D., Sheng J., Li Z., Qi H., Sun Y., Duan Y., Zhang W. (2013). Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. *International Journal of Biological Macromolecules*. 56: 1-5.
100. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation: Review. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2, e17023; doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
101. Lu X., Zhao Y., Sun Y., Yang S., Yang X. (2013). Characterization of polysaccharides from green tea of *Huangshan Maofeng* with antioxidant and hepatoprotective effects. *Food Chemistry*. 141: 3415-3423.
102. Mansour S. (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium L*, *Artemisia herba alba Asso* et *Hypericum scarboides*- Etude *in vivo*-. *Thèse de Doctorat en Biologie, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF*. 155p.



103. Mata E., Salvador A., Igartua M., Hernández R. M., Pedraz J. L. (2013). Malaria Vaccine Adjuvants: Latest Update and Challenges in Preclinical and Clinical Research. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/282913>. 19 p.
104. Mediesse K. F., Woguia A. L., Fogue S. P., Atogho T. B., Simo G., Boudjeko T. (2014). “Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of *Stevia rebaudiana* leaves”. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2: 962-969.
105. Mills-Robertson F. C., Aboagye F. A., Duker-Eshun G., Kaminta S., Agbeve S. (2009). “*In vitro* antimicrobial activity of *Cryptolepis sanguinolenta* (periplocaceae).” *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3: 476-480.
106. Mimche P. N., Taramelli D., Vivas L. (2011). The plant-based immunomodulator curcumin as potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. *Malaria Journal*. 10(Suppl 1):S10.
107. Min-Bo Lan, Zhang Y. H., Y. Zheng H. H., Yuan H. L. Zhao, Gao F. (2010). Antioxidant and Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from Moxa (*Artemisia argyi*) Leaf. *Food Science and Biotechnology*. 19: 1463-1469.
108. Moine C., 2005. Extraction, caractérisation structurale et valorisation d’une famille d’hémicelluloses du bois. Université de Limoges. Thesis de Doctorat, Université de Limoge, 240 p.
109. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65: 55-63.
110. Moss D. W. and Bates T. E. (2001). Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *European Journal of Neurosciences*. 13: 529-538.
111. Mouchel-Vielh E. (2012). Utilisation de la Q-PCR pour analyser des données de ChIP ou de MeDIP. Atelier Epigénétique. 23p.
112. Moundipa P. F., Kamini G. M. F., Bilong Bilong C. F., Bruchhaus I. (2005). *In vitro* amoebicidal activity of some medicinal plants of the Bamun region (Cameroon). *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*. 2: 113-121.
113. Moundipa P. F., Njayou F. N., Yanditoum S., Sonké, B. and Tchouanguép F. M. (2002). Medicinal plants used in the Bamun region of the Western province of Cameroon against jaundice and other liver disorders. *Cameroon Journal of Biological and Biochemical Sciences*. 2: 39-46.

114. Muanda F. N. (2010). Identification des polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine Metz. pp 27-32.
115. Musa H., Adeyinka A. T., Tayo A. A., Taiye M. A. (2013). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* and *Lophira alata* against some selected clinical bacterial isolates. *Wudpecker Journal of Medicinal Plants*. 2: 007 - 015.
116. Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*. 420 : 846-852.
117. Néant R. (2017). Effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens et automédication : quel est l'impact dans le temps d'un outil d'information écrite sur les connaissances des patients ? Étude prospective auprès de 223 patients consultant en médecine générale au sein d'une maison de santé rurale bourguignonne. Thèse de Doctorat de Médecine. Université de Bourgogne. 76p.
118. Neuwinger H. D. (2000). African traditional medicine. A dictionary of plant use and applications. *Medpharm Scientific Publishers*. Germany. p. 589.
119. Nile S. H. and Park S. W. (2013). Optimized Methods for *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Inflammatory Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 13: 95-100.
120. Njajou F. N., Aboudi E. C. E., Tandjang M. K., Tchana A. K., Ngadjui B. T., Moundipa P. F. (2013). Hepatoprotective and antioxidant activities of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC and *Entada africana* Guill. et Perr. *Journal of Natural Products*. 6: 73-80.
121. Njajou F. N., Amougou A. M., Tsayem R. F., Manjia J. N., Rudraiah S., Bradley B., Manautou J. E., Moundipa P. F. (2015). Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C.D.C. and *Entada africana* Guill. et Perr. induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress and Chaperones*. 20: 991-1000.
122. Njajou N. F., Kouam A. F., Simo B. F. N., Tchana A. N., Moundipa P. F. (2016). Active chemical fractions of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* C.DC and *Entada africana* Guill. et Perr. Synergistically protect primary rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:190 DOI 10.1186/s12906-016-1169-y.
123. Njifutie N and Njikam N. (2006). Curative dose of *K. grandifoliola* stem bark for the treatment of gastric ulcers using Wistar rats. *Pharmaceutical Biology*. 44: 152-155.

124. Norden D. M. and Godbout J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: Primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 39: 19-34.
125. Nurain I. O., Bewaji C. O. (2017). Effects of Aqueous Bark Extracts of *Khaya grandifoliola* and *Enantia chlorantha* on Some Biochemical Parameters in Swiss Mice. *Iranian Journal of Toxicology*. 11: 13-21.
126. Nurain I. O., Bewaji C. O., Abubakar A. A., Mustapha A., Ajani O. E., Sabiu S., Usman L. A., Abdulhameed H. T., Ahmed S. B. (2018). Antimalarial and Reno-protective Potentials of Combined Stem Bark Extracts of *Khaya grandifoliola* and *Enantia chlorantha* in *Plasmodium Infected Mice*. *Iranian Journal of Toxicology*. 12: 29-37.
127. Odoh U. E., Ezugwu C. O., Adimegwu J. U. (2012). "Phytochemical and anti-inflammatory activity of methanol root extract of *Cryptolepis sanguinolenta* (Periplocaceae)." *Journal of Pharmaceutical and Allied Sciences*. 9: 1580-1586.
128. Odoh U.E. and Akwuaka C.I. (2012). Pharmacognostic profile of root of *Cryptolepis sanguinolenta* (lindl.) Schlechter. *Pharmacognosy Journal*. 4: 40-44.
129. Odugbemi T. O., Akinsulire O. R., Aibinu I. E., Fabeku P. O. (2007). Medicinal Plants useful for Malaria Therapy in Okeigbo, Ondo State, Southwest Nigeria. *African journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* .4: 191-198.
130. Ojokuku S. A., Okunowo W. O., Apena A. (2010). Evaluation of the chemical composition of *Khaya grandifoliola* and *Ficus capensis*. *Journal of medicinal plant research*. 4: 1126-1129.
131. Olajide O. A., Pinheiro de Oliveira A., Unekwe J., Wright C., Fiebich B. (2010) "Cryptolepis sanguinolenta (Lindl.) Schltr. root extract inhibits prostaglandin production in IL-1b stimulated SK-N-SH neuronal cells." *Planta Medica*. 76(12). DOI: 10.1055/s-0030-1264899.
132. Olajide O. A., Bhatia H. S., De Oliveira A. C. P., Wright C. W., Fiebich B. L. (2013). "Anti-neuroinflammatory properties of synthetic cryptolepine in human neuroblastoma cells: possible involvement of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK inhibition." *European Journal of Medicinal Chemistry*. 63: 333-339.
133. Olowokudejo J. D., Kadiri A. B., Travih V. A. (2008). An Ethnobotanical Survey of Herbal Markets and Medicinal Plants in Lagos State of Nigeria. *Ethnobotanical Leaflets*. 12: 851-65.

134. OMS. (2002). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relative à la médecine traditionnelle. *WHO/EDM/TRM 2002*. 70 p.
135. Onyeibor O., Croft S. L., Dodson H. I. (2005). Synthesis of some cryptolepine analogues, assessment of their antimalarial and cytotoxic activities, and consideration of their antimalarial mode of action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48: 2701-2709.
136. Osafo N., Mensah K. B., Yeboah O. K. (2017). Phytochemical and Pharmacological Review of *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter. *Advances in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1155/2017/3026370>. 13p.
137. Owona B. A. (2015). Etude des activités immunomodulatoires et anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* de *Khaya grandifoliola* (Méliaceae), *Entada africana* (Fabaceae), et de la Baicalin : Cas de la maladie d'Alzheimer. Thèse de Doctorat, Université de Yaoundé I. 209p.
138. Oyewale O. B., Kayode O. A., Oluyemisi O. A. (2016). Antimicrobial, free radical scavenging and cytotoxic activities of *Khaya grandifoliola* C.D.C extracts. *Malaysian Journal of Microbiology*. 12: 233-238.
139. Pacheco-Sánchez M., Boutin Y., Angers P., Gosselin A., Tweddell R. J. (2007). Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *European Journal of Pharmacology*. 555: 61-66.
140. Pal H. C. and Katiyar S. K. (2016). Cryptolepine, a plant alkaloid, inhibits the growth of non-melanoma skin cancer cells through inhibition of topoisomerase and induction of DNA damage. *Molecules*. 21: 1758.
141. Parvathi M. and Ravishankar K. (2013). Evaluation of Antidepressant, Motor Coordination and Locomotor Activities of Ethanolic Root Extract of *Clitoria Ternatea*. *Journal of Natural Remedies*. 13:19-24.
142. Patel P. K., Sahu J., Chandel S. S. (2017). A detailed review on nociceptive models for the screening of analgesic activity in experimental animals. *International Journal of Neurologic Physical therapy*. 2: 44-50.
143. Qin L., Wu X., Block M. L., Liu Y., Breese G. R., Hong J. S., Knapp D. J., Crews F. T. (2007) Systemic LPS Causes Chronic Neuro-inflammation and Progressive Neurodegeneration. *Glia*. 1: 55: 453-462.

144. Rajendra V., Lakshni K. S. (2008). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of leaves of *symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp Laurina. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 3: 121-124.
145. Rankin J. A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*. 15: 3-17.
146. Ray B., Loutier-Bourhis C., Condamine E., Driouich A., Lerouge P. (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterization of novel xyloglucan motif. *Carbohydrates Research*. 339: 201-208.
147. Re R., Pellegrini A. A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical of Biological Medicine*. 26: 1231-1237.
148. Ren Q., Zhao S., Ren C., Ma Z. (2018). Astragalus polysaccharide alleviates LPS induced inflammation injury by regulating miR-127 in H9c2 cardiomyoblasts. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 31: 1-11.
149. Ribeiro R. A., Vale M. L., Thomazzi S. M., Paschoalato A. B., Poole S., Ferreira S. H. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*. 387: 111-118.
150. Rousselet M. C., Vignaud J. M., Hofman P. (2005). Inflammation et pathologies inflammatoires. Faculté de medecine de la tinone. <http://medidacte.timone.univmrs>. 75p.
151. Sali W. (2014). Physico-chimie des lipopolysaccharides et réponse inflammatoire : rôle des lipoprotéines. These Science de la vie, Université de Bourgogne. 305p.
152. Sarveswaran R., Jayasuriya W. J. A. B. N., Suresh T.S. (2017). *In Vitro* Assays to Investigate the Anti-Inflammatory Activity of herbal extracts: A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 6: 131-141.
153. Sawada M., Kondo N., Suzumura A., Marunouchi T. (1989). Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Research*. 491: 394-397.
154. Sayed B. A., Christy A. L., Walker M. E., Brown M. A. (2010). Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment. *Journal of immunology*. 184: 6891-6900.

155. Schofield L. and Grau G. E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Review Immunology*. 5: 722–735.
156. Schwartz K. (2011). Inflammations et maladies: clés de compréhension. *Inserm*. 74p.
157. Sergey A. N., Robert A. F., Iben D. (2011). Approaches to chemical synthesis of pectic oligosaccharides. *Annual Plant Reviews*. 41: 65–92.
158. Sheng J. and Sun Y. (2014). Antioxidant properties of different molecular weight polysaccharides from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. *Carbohydrate Polymers*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.011>
159. Singh A. V. (2011). Biopolymers in Drug Delivery: A Review. *Pharmacology online*. 1: 666-674.
160. Singleton V. L and Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal Enology and Viticulture*. 37: 144-158.
161. Sofowora L. A. (2008). Medicinal plants and traditional medicine in Africa. *Spectrum books*. 2: 289.
162. Stephen U. A., Abiodun F., Osahon O., Ewaen E. (2009). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* Stem Bark. *Journal of Biological Sciences*. 9: 63-67.
163. Sugamura K. and Keaney J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 51: 978-992.
164. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. (2003). Measurement of Nitric Oxide production in biological system by using Griess reaction assay. *Sensors*. 3: 276-284.
165. Sun Y. X. (2011). Structure and biological activities of the polysaccharides from the leaves, roots and fruits of *Panax ginseng* C.A. Meyer: an overview. *Carbohydrate Polymers*. 85: 490-499.
166. Tamara S., Viktoria D., Inna K., Irina Y. (2013). Marine compounds with therapeutic potential in Gram-Negative sepsis. *Marine drugs*. ISSN: 1660-3397.
167. Tempesta M. (2010). The clinical efficacy of *Cryptolepis sanguinolenta* in the treatment of malaria. *Ghana Medical Journal*. 44: 1-2.
168. Tenorio G., Kulkarni A., Kerr B. J. (2013). Resident glial cell activation in response to perispinal inflammation leads to acute changes in nociceptive sensitivity: implications for the generation of neuropathic pain. *Pain*. 154:71-81.



169. Thangam R., Sathuvan M., Poongodi A., Suresh V., Pazhanichamy K., Sivasubramanian S., Kanipandian N., Ganesan N., Rengasamy R., Thirumurugan R., Kannan S. (2014). Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon citratus* polysaccharide fractions. *Carbohydrate Polymers*. 107: 138-150.
170. Thornell C. (2004). Wild plant names in the Mpiemo language. *Africa and Asia*. 4: 57-58.
171. Tinamri M. et Lagmi I. (2014). Optimisation des conditions d'extraction des polysaccharides issus d'*Astragalus gombo* bunge (Fabaceae) récolté au Sahara septentrional Est algérien. Mémoire de fin d'étude. 58p.
172. Toby L. (2009). The Nuclear Factor NF-kB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1:a001651.
173. Togola A., Inngjerdingen M., Diallo D., Barsett H., Rolstad B., Michaelsen T. E., Paulsen B. S. (2008). Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation. *Journal of Ethnopharmacology*. 115: 423-31.
174. Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K., Vlietinck A. J. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 61: 57-65.
175. Tosun A, Khan S., Kim Y. S., Calín-Sánchez Á., Hysenaj X., Carbonell-Barrachina Á. A. (2014). Essential Oil Composition and Anti-Inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L (Lamiaceae) in Murin Macrophages. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13 (6): 937-942.
176. Tu P. F. (2012). Chemistry of natural polysaccharides. Beijing: Chemistry Industry 436 Press.
177. Vanderlei E. S. O., Patoilo K. K. N. R., Lima N. A., Lima A. P. S., Rodrigues J. A. G., Silva L. M. C. M. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International Immunopharmacology Journal*. 10:1113–1118.
178. Venter H. J. T. and Verhoeven R. L. (1997). A tribal classification of the Periplocoideae (Apocynaceae). *International Association for Plant Taxonomy*. 46: 705-720.
179. Volterra A. and Meldolesi J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature reviews Neuroscience*. 6: 626-640.



180. Wang J. L., Zhang J., Zhao B. T., Wang X. F., Wu Y. Q., Yao J. (2010). A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserine* L. polysaccharides with conventional method: molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers*. 80: 84-93.
181. Wang N., Switalska M., Wu M.-Y. (2014). Synthesis and *in vitro* cytotoxic effect of 6-amino-substituted 11H- and 11 Meindolo [3,2-c]quinolones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 78: 314-323.
182. Wang Y., Mao F., Wei X (2012). Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from leaves, flowers and seeds of green tea. *Carbohydrate Polymers*. 88: 146-153.
183. Weill B. et Batteux F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. 1<sup>re</sup> édition. *Bruxelles: De Boeck*. ISBN-13/9782804141776. 312p.
184. Xiaojuan H., Xuyan N., Jian L., Shaohua X., Aiping L. (2012). Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides: A Review. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2: 15-27.
185. Xie Y., Zhang H., Zhang Y., Wang C., Duan D., Wang Z. (2018). Chinese Angelica Polysaccharide (CAP) Alleviates LPS-Induced Inflammation and Apoptosis by Down-Regulating COX-1 in PC12 Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 49:1380-1388.
186. Xiong Q., Li X., Zhou R., Hao H., Li S., Jing Y., Zhu C., Zhang Q., Shi Y. (2014). Extraction, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *E. Corneum Gigeriae Galli*. *Carbohydrate Polymers*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.068>.
187. Yakubu C. B. (2006). NIBIMA, A Wonder Plant for Malaria Treatment. *African Media and Malaria Research Network*, 3rd edition, <http://www.eyesonmalaria.org/content/editorial>.
188. Yang L. Q. and Zhang L. M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*. 76: 349-361.
189. Yang Q., Chen H., Zhou X., Zhang J. (2013). Optimum extraction of polysaccharides from *Opuntia dillenii* and evaluation of its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*. 97: 736-742.

190. York W. S., Darvill A. G., McNeil M., Stevenson T. T., Albersheim P. (1985). Methods in enzymology, vol. 3. 118<sup>th</sup> ed. San Diego: *Academic Press*. 118: 3.
191. Zang H., Odeku O. A., Wang X. N., Yue J. M. (2008). Limonoïdes from the stem Bark of *Khaya grandifoliola*. *Phytochemistry*. 69: 271-275
192. Zeng W. C., Zhang Z., Jia L. R. (2014). Antioxidant activity and characterization of antioxidant polysaccharides from pine needle (*Cedrus deodara*). *Carbohydrates polymers*. doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.022.
193. Zha X. Q., Luo J. P., Luo S. Z., Jiang S. T. (2007). Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*. *Carbohydrate Polymers*. 69:86-93.
194. Zhang H., Ye L., Wang K. (2010). Structural characterization and anti-inflammatory activity of two water-soluble polysaccharides from *Bellamyia purificata*. *Carbohydrate Polymers*. 81: 953-960.
195. Zhang J., Wang H., Xue Y., Zheng Q. (2013). Cardioprotective and antioxidant activities of a polysaccharide from the root bark of *Aralia elata* (Miq.) Seem. *Carbohydrate Polymers*. 93: 442-448.
196. Zhu H. and Gooderham N. J. (2006). Mechanisms of induction of cell cycle arrest and cell death by cryptolepine in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Toxicological Sciences*. 91: 132-139.
197. Zhu X., Pan Y., Zheng L., Cui L., Cao Y. (2012). Polysaccharides from the Chinese medicinal herb *Achyranthes bidentata* enhance anti-malarial immunity during *Plasmodium yoelii* 17XL infection in mice. *Malaria Journal*. 11: 49.
198. Zou P., Yang X., Huang W. W., Zhao H. T., Wang J., Xu R. B., Hu X. L., Shen S. Y., Qin D. (2013). Characterization and Bioactivity of Polysaccharides obtained from Pine Cones of *Pinus koraiensis* by Graded Ethanol Precipitation. *Molecules*. 18: 9933-9948.

## Webographie :

- 1) <http://www.rndsistemas.com>. Consulté le 30 Mai 2015
- 2) TestBookhaematology4medical-scientist.blogspot.SG/. Consulté le 06 Juillet 2014.

# *Annexes*

## **Annexe 1 : Préparation des solutions**

### **1. Préparation du Réactif de Bradford**

Le Réactif de Bradford a été préparé par dissolution de 50 mg de Bleu de Coomassie G250 dans 25 mL d'éthanol 95 %. Après 30 min d'agitation, 50 mL d'acide orthophosphorique 85 % ont été ajoutés au mélange. Ce dernier est ensuite agité pendant 10 min puis le volume de la solution a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée, puis filtré et conservé à 4 °C.

### **2. Préparation du Réactif DPPH**

Le Réactif DPPH 400 µM a été préparé par dissolution de 3,95 mg de DPPH dans 25 mL de méthanol 65 °C.

### **3. Préparation du Réactif ABTS**

Le Réactif ABTS a été préparé en mélangeant 20 mL d'une solution d'ABTS 7 mM à 20 mL d'une solution de permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>) 4,9 mM. Le mélange a ensuite été conservé à l'obscurité pendant 15 h afin de favoriser l'oxydation de l'ABTS. Pour son utilisation, la solution est diluée 10 fois dans de l'eau distillée.

### **4. Le réactif de Griess**

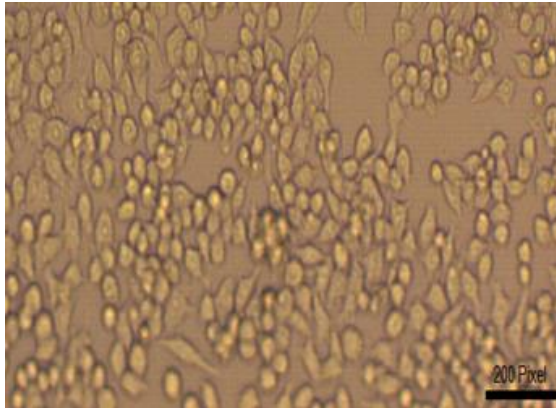
Le Réactif de Griess a été reconstitué par ajout de 250 mL d'eau distillée stérile dans la bouteille contenant le Réactif sous forme de poudre (1x Griess Reagent, Sigma Aldrich, Catalog Number G4410-10G). Le réactif a ensuite été conservé à température ambiante.

## Annexe 2 : Culture cellulaire

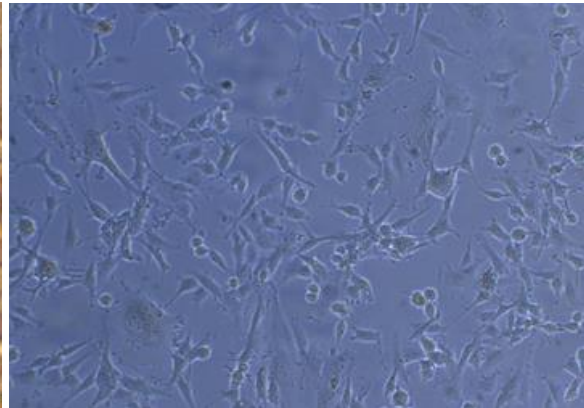
Les lignées cellulaires U87, IMR 32, MDA-MB 231, A549 et les macrophages Raw 264.7 ; obtenues du NCCS sont maintenues congelées dans l'azote liquide à -196 °C en présence d'un cryoprotecteur (DMSO 10 %). La décongélation des cellules s'est rapidement effectuée après leur sortie de l'azote liquide. En effet, les cryotubes contenant les cellules ont été laissés 1 à 2 min à TA puis 1 min dans un bain marie à 37 °C. Une fois la décongélation terminée, sous une hotte de biosécurité de type II, les cellules présentes dans les cryotubes ont été transférées dans des tubes de 15 mL. Ensuite, 10 mL de milieu de culture (correspondant pour chaque lignée) supplémenté de 5 % de FBS (Fœtal Bovin Serum, *Invitrogen, USA*) et de solution antibiotique (Himedia : L-Glutamine 200 mM, streptomycine 200 µg/mL et de pénicilline 200 U/mL). Après centrifugation (3000 rpm ; 5 min ; 25 °C), le surnageant a été éliminé et 2 mL de milieu de culture complet ajouté. La suspension cellulaire a été transférée dans des flasques de culture cellulaire stériles (25 cm<sup>2</sup>) contenant 10 mL de milieu de culture complet. Les cellules ont ainsi été cultivées en monocouche dans les flasques de culture cellulaire maintenues dans un incubateur humide à 37°C, avec 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence des cellules. En outre, le passage des cellules dans de nouvelles flasques de cultures étaient effectué après 24 h (Raw 264.7) ou 48 h (U87, IMR 32, MDA-MB 231, A549). En effet, lorsque la confluence était atteinte, le passage des cellules Raw 264.7 s'effectuait dans les flasques de 75 cm<sup>2</sup>. Pour cela, le milieu de culture était éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette stérile, puis 3 mL de trypsine étaient ajoutés. La flasque de 25 cm<sup>2</sup> contenant la trypsine était incubée (37 °C ; 5% de CO<sub>2</sub>, 95% d'humidité) pendant 3 à 5 min, puis observée sous un microscope optique pour confirmer le détachement des cellules de leur support. L'effet de la trypsine a été stoppé en rajoutant un volume égal de milieu de culture dans les flasques. La suspension cellulaire contenant la trypsine et le milieu de culture a été transférée dans des tubes de 15 mL et centrifugée (1100 rpm ; 5 min). Après élimination du surnageant, le culot contenant les cellules a été suspendu dans 2 mL de milieu de culture pour l'obtention d'une suspension cellulaire homogène. Cette dernière pouvait directement être utilisée pour les expérimentations ou était reparti dans des flasques de culture de 75 cm<sup>2</sup> et incubée dans les conditions précédentes.

Photo des lignées cellulaires cultivées dans leurs milieux respectifs

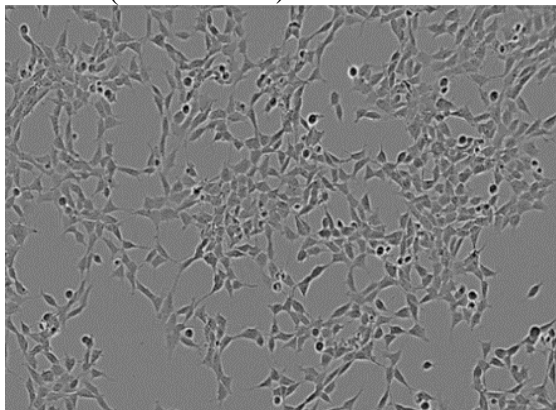
**Macrophages Raw 264.7**  
(Milieu RPMI 1640)



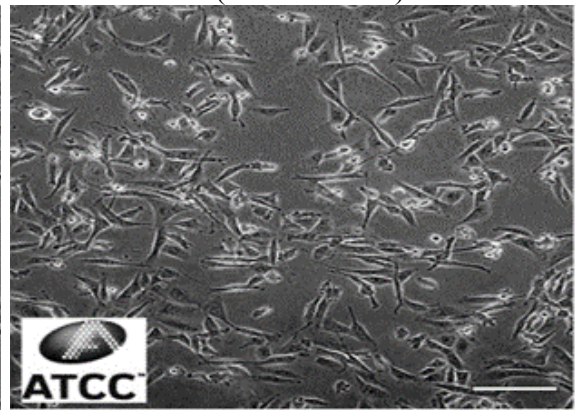
**U87**  
(Milieu MEM)



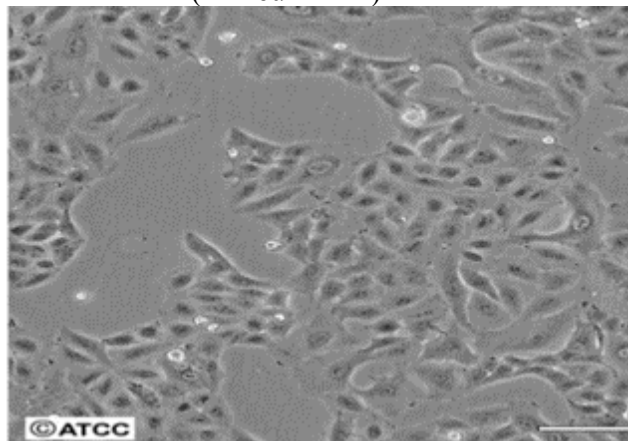
**IMR32**  
(DMEM/F12)



**A549**  
(Milieu MEM)

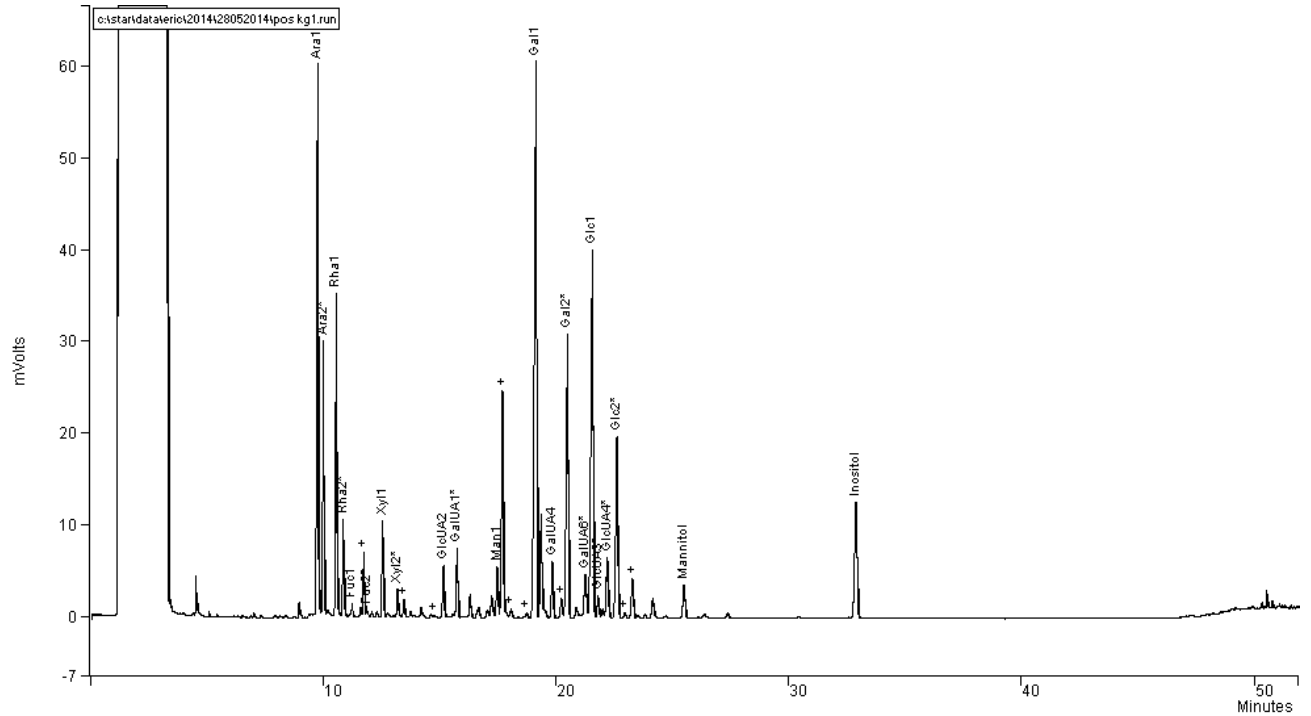


**MDA-MB 231**  
(Milieu MEM)

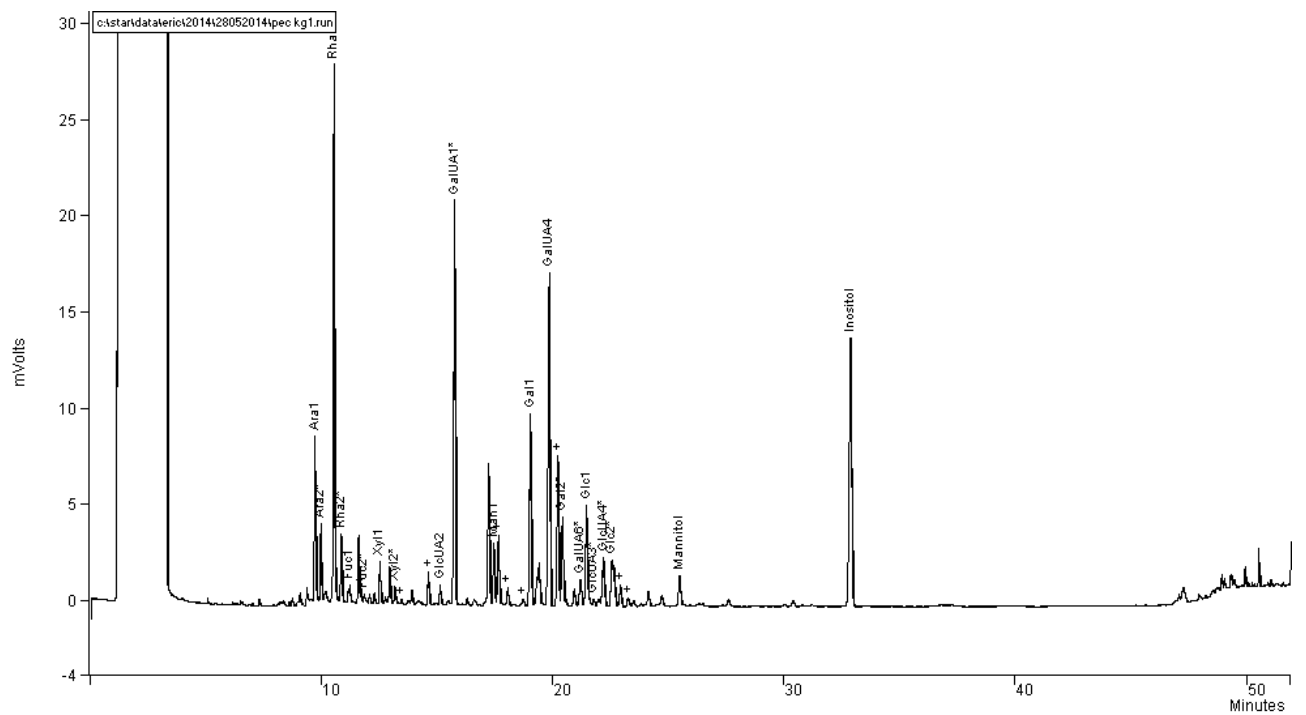


## Annexe 3 : Chromatogramme des sucres présents dans les extraits polysaccharidiques des deux plantes

### 1) Chromatogramme polysaccharides solubles totaux (PoS) de *K. grandifoliola*

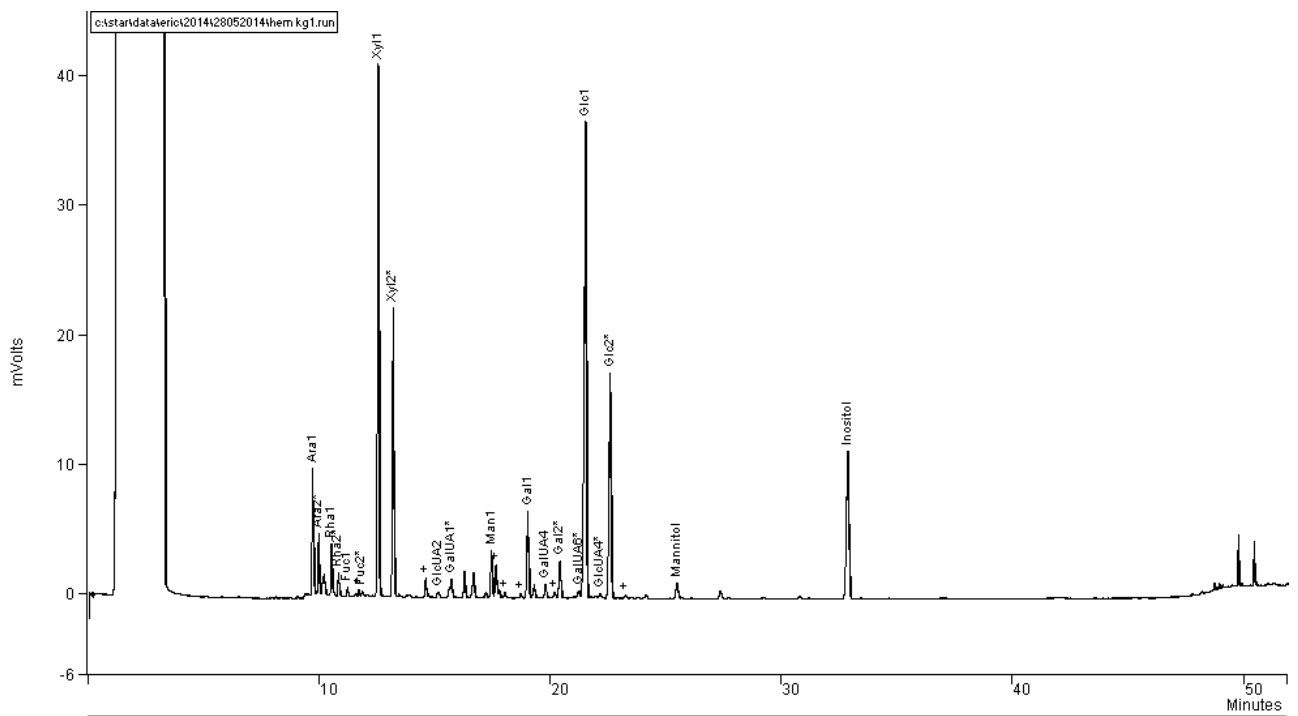


### 2) Chromatogramme de l'extrait pectique (Pec) de *K. grandifoliola*

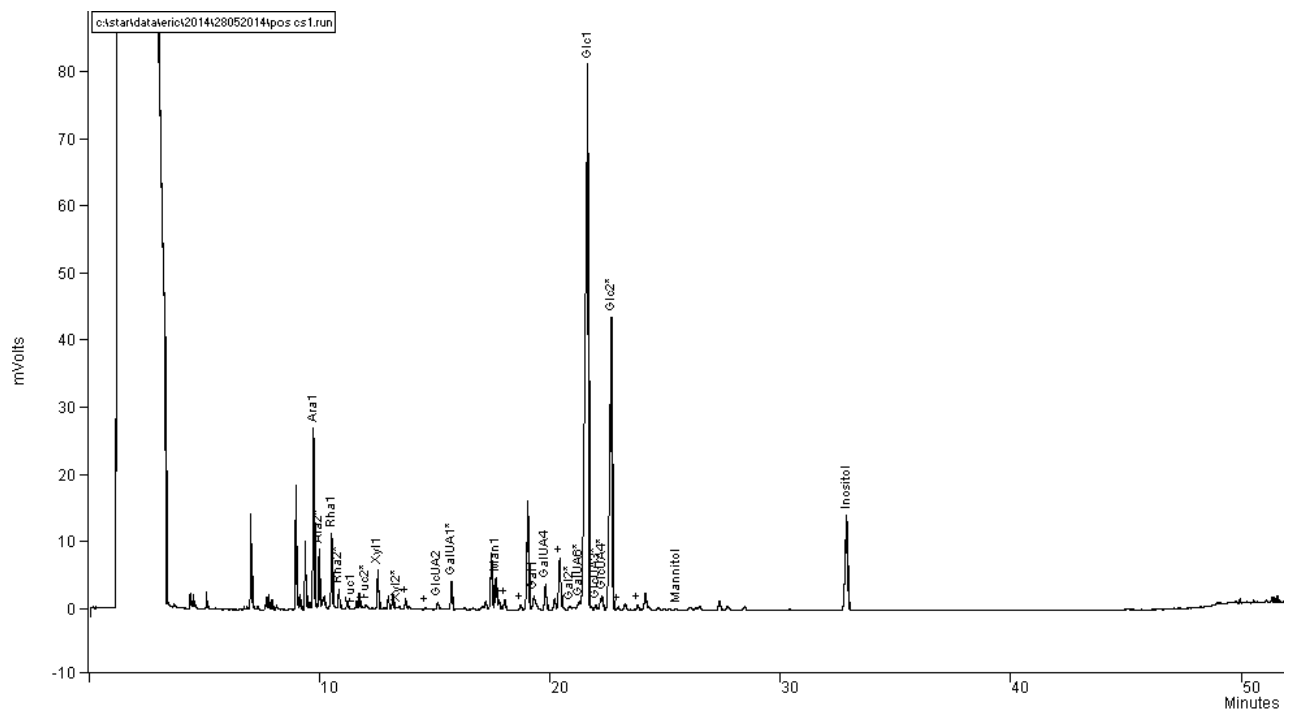




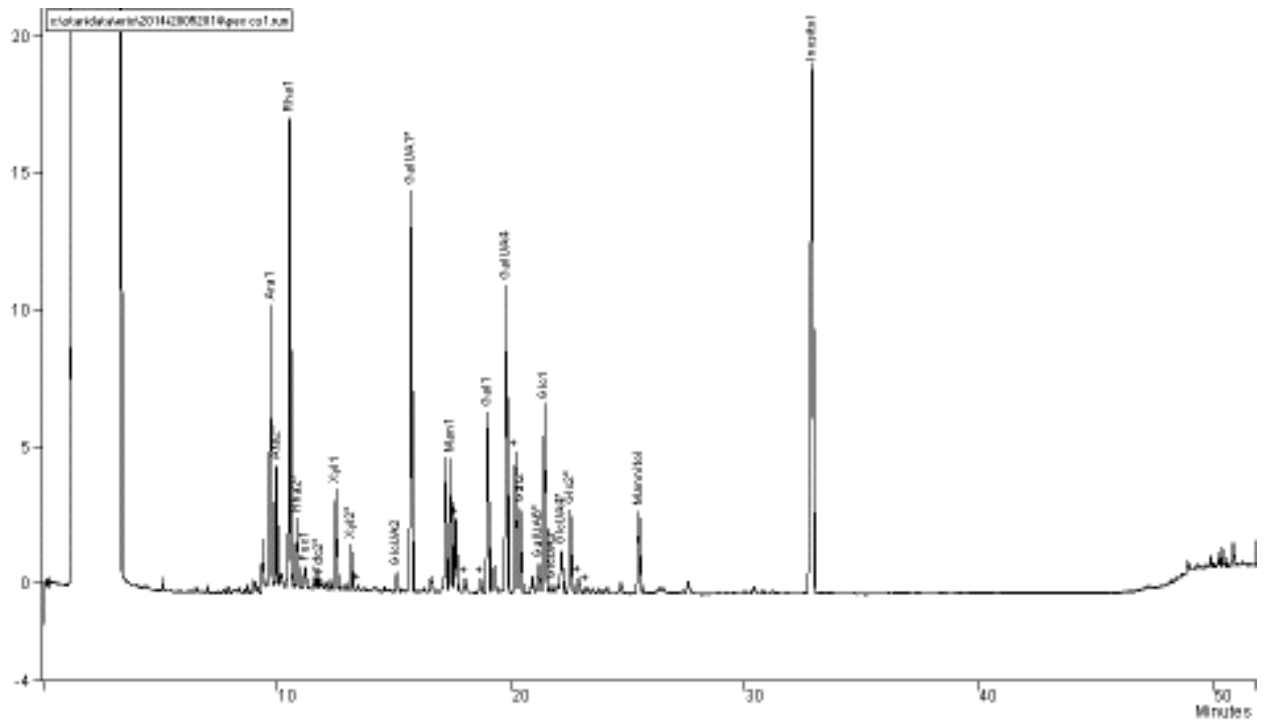
### 3) Chromatogramme de l'extrait hémicellulosique soluble (HemsS) de *K. grandifoliola*



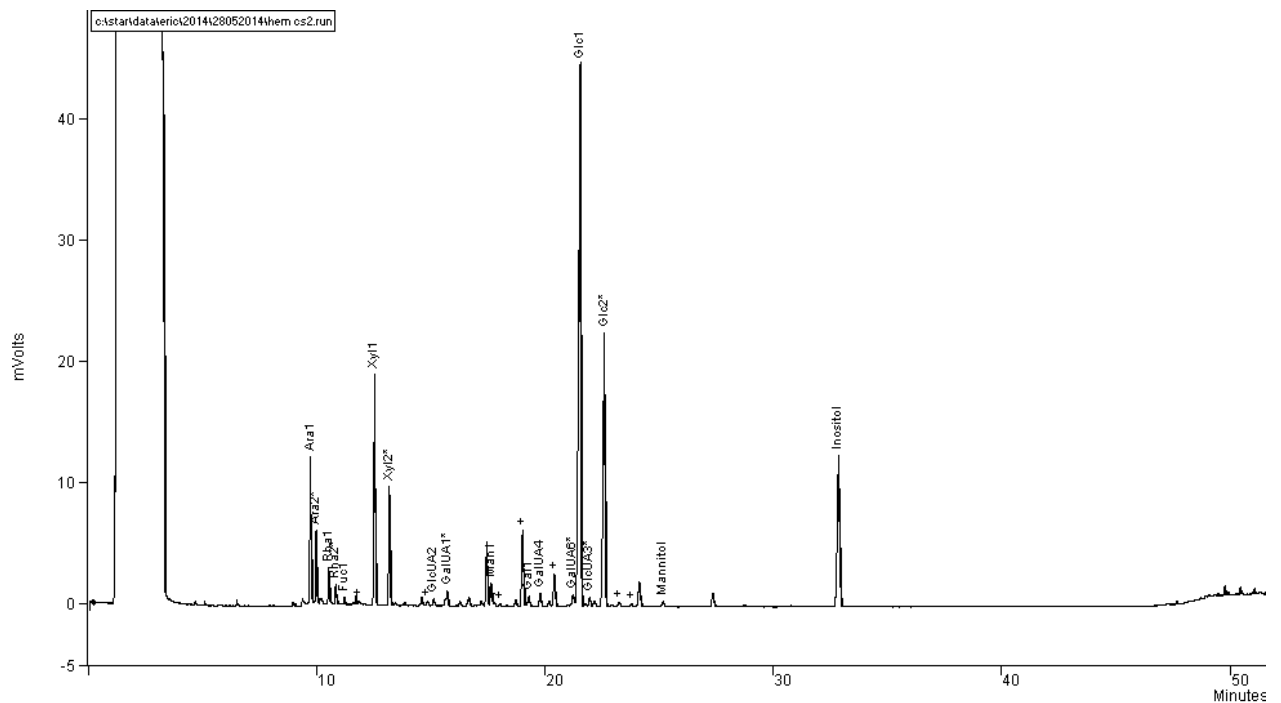
### 4) Chromatogramme de PoS de *C. sanguinolenta*



5) Chromatogramme de l'extrait Pec de *C. sanguinolenta*



6) Chromatogramme de l'extrait HemS de *C. sanguinolenta*



**Annexe 4 : Tableaux récapitulatifs de la composition en ose, teneurs en protéines et composés phénoliques des extraits polysaccharidiques des deux plantes**

**1) Tableaux récapitulatif de la composition en ose des extraits PoS, Pec et HemS**

<i>Pourcentage molaire (%)</i>						
<i>K. grandifoliola</i>			<i>C. sanguinolenta</i>			
	<b>PoS</b>	<b>Pec</b>	<b>HemS</b>	<b>PoS</b>	<b>Pec</b>	<b>HemS</b>
<b>Ara</b>	17,57 ± 1,34	10,29 ± 0,37	8,53 ± 0,15	10,36 ± 0,33	16,16 ± 1,81	10,08 ± 0,19
<b>rha</b>	10,74 ± 0,56	28,81 ± 0,21	3,04 ± 0,14	4,72 ± 0,08	24,83 ± 3,96	2,39 ± 0,05
<b>Fuc</b>	0,77 ± 0,00	1,21 ± 0,28	0,57 ± 0,00	0,40 ± 0,32	1,15 ± 0,16	0,50 ± 0,00
<b>Xyl</b>	3,86 ± 0,44	3,02 ± 0,56	32,69 ± 1,19	2,58 ± 0,09	5,60 ± 0,42	16,58 ± 0,05
<b>Man</b>	2,37 ± 0,16	3,93 ± 0,87	3,32 ± 0,17	4,29 ± 0,14	9,14 ± 1,27	1,85 ± 0,38
<b>Gal</b>	30,53 ± 4,19	14,51 ± 0,95	6,70 ± 0,05	8,46 ± 0,04	7,37 ± 6,78	1,01 ± 0,20
<b>Glc</b>	28,89 ± 9,47	8,07 ± 0,59	43,38 ± 1,38	66,51 ± 0,79	7,32 ± 9,53	65,51 ± 0,19
<b>GalUA</b>	3,04 ± 0,44	28,85 ± 2,26	1,17 ± 0,04	2,04 ± 0,11	26,88 ± 8,34	1,39 ± 0,12
<b>GlcUA</b>	2,24 ± 0,23	1,29 ± 0,10	0,60 ± 0,07	0,63 ± 0,02	1,56 ± 0,34	0,69 ± 0,02

**2) Tableau récapitulatif des teneurs en protéines et composés phénoliques des extraits polysaccharidiques des deux plantes d'intérêts**

<i>K. grandifoliola</i>			<i>C. sanguinolenta</i>		
<b>PoS</b>	<b>Pec</b>	<b>HemS</b>	<b>PoS</b>	<b>Pec</b>	<b>HemS</b>
<b>Teneurs en Protéines (µeqBSA/mg)</b>					
86,39 ± 0,65 <sup>a</sup>	30,58 ± 0,12 <sup>d</sup>	44,20 ± 0,21 <sup>c</sup>	44,39 ± 0,52 <sup>c</sup>	67,66 ± 1,19 <sup>b</sup>	43,90 ± 2,27 <sup>c</sup>
<b>Teneurs en Composés phénoliques (µEAG/mg)</b>					
1,29 ± 0,004 <sup>d</sup>	0,09 ± 0,008 <sup>f</sup>	0,23 ± 0,009 <sup>e</sup>	15,54 ± 0,78 <sup>a</sup>	11,57 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,27 ± 0,08 <sup>c</sup>

*Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à P < 0,05, a>b>c>d>e>f*

**Annexe 5 : Tableau récapitulatif des activités anti-radicalaires des extraits des deux plantes d'intérêts**

1) Tableau récapitulatif des activités anti-radicalaires DPPH

% DPPH réduit						
(µg/mL)	<i>K. grandifoliola</i>			<i>C. sanguinolenta</i>		
	PoS	Pec	HemS	PoS	Pec	HemS
<b>50</b>	84,99 ± 0,18 <sup>a</sup>	76,52 ± 0,40 <sup>b</sup>	76,32 ± 0,44 <sup>b</sup>	17,35 ± 1,13 <sup>a</sup>	19,41 ± 1,06 <sup>a</sup>	14,08 ± 0,81 <sup>a</sup>
<b>100</b>	85,15 ± 0,07 <sup>a</sup>	78,20 ± 0,91 <sup>b</sup>	77,94 ± 0,35 <sup>b</sup>	21,27 ± 1,32 <sup>a</sup>	24,37 ± 0,90 <sup>a</sup>	18,96 ± 2,04 <sup>a</sup>
<b>200</b>	82,87 ± 0,86 <sup>a</sup>	76,7 ± 0,77 <sup>c</sup>	79,55 ± 0,46 <sup>b</sup>	28,98 ± 3,88 <sup>b</sup>	49,98 ± 0,77 <sup>a</sup>	19,19 ± 1,32 <sup>c</sup>
<b>300</b>	79,96 ± 0,04 <sup>a</sup>	75,09 ± 0,07 <sup>a</sup>	82,25 ± 0,25 <sup>b</sup>	38,41 ± 3,21 <sup>b</sup>	53,41 ± 0,78 <sup>a</sup>	27,26 ± 0,95 <sup>c</sup>

*Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à P < 0,05, a > b > c.*

2) Tableau récapitulatif des activités anti-radicalaires ABTS

% ABTS réduit						
(µg/mL)	<i>K. grandifoliola</i>			<i>C. sanguinolenta</i>		
	PoS	Pec	HemS	PoS	Pec	HemS
<b>50</b>	57,79 ± 0,78 <sup>a</sup>	16,53 ± 0,99 <sup>b</sup>	11,77 ± 0,14 <sup>c</sup>	69,61 ± 3,17 <sup>a</sup>	36,09 ± 1,53 <sup>c</sup>	50,45 ± 0,99 <sup>b</sup>
<b>100</b>	79,36 ± 1,15 <sup>a</sup>	27,17 ± 0,86 <sup>b</sup>	21,70 ± 0,37 <sup>c</sup>	89,82 ± 0,26 <sup>a</sup>	59,79 ± 0,47 <sup>b</sup>	64,13 ± 0,87 <sup>b</sup>
<b>200</b>	92,07 ± 0,2 <sup>a</sup>	38,16 ± 0,26 <sup>c</sup>	59,43 ± 0,19 <sup>b</sup>	90,24 ± 0,33 <sup>a</sup>	79,10 ± 0,15 <sup>b</sup>	73,24 ± 1,02 <sup>c</sup>
<b>300</b>	90,79 ± 0,15 <sup>a</sup>	38,44 ± 0,14 <sup>c</sup>	64,47 ± 0,54 <sup>b</sup>	96,86 ± 0,44 <sup>a</sup>	76,05 ± 1,75 <sup>b</sup>	56,26 ± 0,59 <sup>c</sup>

*Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à P < 0,05, a > b > c.*

**Annexe 6 : Tableau récapitulatif des pourcentages d'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires par les fractions polysaccharidiques des deux plantes**

Pourcentage de toxicité (%)				
<i>Raw 264.7</i>				
( $\mu\text{g/mL}$ )	FKG	HKG	FCS	HCS
<b>10</b>	1,54 $\pm$ 0,39	5,20 $\pm$ 0,07	8,59 $\pm$ 0,6	3,11 $\pm$ 1,47
<b>50</b>	1,00 $\pm$ 0,01	6,78 $\pm$ 1,96	14,82 $\pm$ 1,28	5,25 $\pm$ 2,13
<b>100</b>	1,44 $\pm$ 0,29	7,5 $\pm$ 2,66	23,66 $\pm$ 1,08	12,93 $\pm$ 2,77
<b>200</b>	8,14 $\pm$ 4,90	9,18 $\pm$ 3,63	24,08 $\pm$ 0,78	34,53 $\pm$ 1,23
<b>1000</b>	75,56 $\pm$ 0,27	63,09 $\pm$ 7,40	64,64 $\pm$ 7,6	67,26 $\pm$ 2,9
<i>U87</i>				
<b>10</b>	1,46 $\pm$ 0,26	1,46 $\pm$ 0,27	10 $\pm$ 0,58	0,2 $\pm$ 0,06
<b>50</b>	1,99 $\pm$ 0,00	2,29 $\pm$ 0,00	16 $\pm$ 0,57	0,6 $\pm$ 0,02
<b>100</b>	23,16 $\pm$ 2,28	18,30 $\pm$ 2,60	41,62 $\pm$ 0,54	18,78 $\pm$ 4,47
<b>200</b>	23,70 $\pm$ 2,15	27,13 $\pm$ 0,94	53,23 $\pm$ 2,51	20,26 $\pm$ 5,91
<b>500</b>	38,62 $\pm$ 2,60	36,85 $\pm$ 1,54	66,64 $\pm$ 2,78	27,63 $\pm$ 3,36
<b>1000</b>	43,39 $\pm$ 4,19	34,34 $\pm$ 3,85	69,40 $\pm$ 0,65	86,51 $\pm$ 1,28
<i>IMR32</i>				
<b>10</b>	5,60 $\pm$ 0,01	5,74 $\pm$ 4,79	14,62 $\pm$ 5,45	8,31 $\pm$ 4,26
<b>50</b>	18,08 $\pm$ 0,55	8,83 $\pm$ 2,35	22,84 $\pm$ 1,48	20,0 $\pm$ 0,01
<b>100</b>	31,18 $\pm$ 2,05	24,27 $\pm$ 2,98	31,84 $\pm$ 8,73	27,97 $\pm$ 0,76
<b>200</b>	31,67 $\pm$ 2,85	29,02 $\pm$ 2,5	35 $\pm$ 0,02	39,55 $\pm$ 2,77
<b>500</b>	39,07 $\pm$ 9,19	30,11 $\pm$ 4,81	46,75 $\pm$ 0,73	40,68 $\pm$ 4,54
<b>1000</b>	38,98 $\pm$ 3,23	51 $\pm$ 0,58	50,28 $\pm$ 1,84	52,84 $\pm$ 1,22
<i>A549</i>				
<b>10</b>	22,26 $\pm$ 1,41	17 $\pm$ 1,0	37,62 $\pm$ 7,23	26,13 $\pm$ 5,85
<b>50</b>	35,93 $\pm$ 1,63	18,98 $\pm$ 2,6	55,40 $\pm$ 2,94	26,50 $\pm$ 7,61
<b>100</b>	34,16 $\pm$ 1,31	21,62 $\pm$ 0,5	73,11 $\pm$ 2,66	36,48 $\pm$ 4,30
<b>200</b>	55,71 $\pm$ 2,73	38,93 $\pm$ 3,64	80,04 $\pm$ 1,61	48,58 $\pm$ 3,32
<b>500</b>	68,65 $\pm$ 2,49	64 $\pm$ 0,58	76,57 $\pm$ 1,87	55,53 $\pm$ 2,73
<b>1000</b>	75,1 $\pm$ 1,69	73,57 $\pm$ 1,46	83,24 $\pm$ 1,55	72,25 $\pm$ 2,04
<i>MDA-MB 231</i>				
<b>10</b>	4,8 $\pm$ 1,96	6,54 $\pm$ 2,61	20,66 $\pm$ 0,67	18,33 $\pm$ 0,33
<b>50</b>	6,78 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 2,00	29,61 $\pm$ 3,54	16,16 $\pm$ 2,41
<b>100</b>	6,8 $\pm$ 0,01	11,41 $\pm$ 2,29	43,35 $\pm$ 1,66	20 $\pm$ 0,01
<b>200</b>	5,4 $\pm$ 1,38	15,63 $\pm$ 2,37	50,43 $\pm$ 1,74	21,67 $\pm$ 0,33
<b>500</b>	14,26 $\pm$ 3,76	18,82 $\pm$ 2,71	55,84 $\pm$ 1,17	23,51 $\pm$ 1,49
<b>1000</b>	30,11 $\pm$ 2,79	19,94 $\pm$ 2,43	58,66 $\pm$ 0,67	35,07 $\pm$ 2,55

FKG & HKG (faibles et haut poids moléculaires de *K. grandifoliola*) FCS & HCS (faibles et haut poids moléculaires de *C. sanguinolenta*)

## Annexe 7 : Design de la plaque d'analyse LUMINEX

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Bkg</b>	<b>Et2</b>	<b>Et5</b>	<b>CQ2</b>	<b>PHA</b>	<b>E2</b>	<b>E5</b>	<b>E1M</b>	<b>E4M</b>			
<b>B</b>	<b>Bkg</b>	<b>Et3</b>	<b>Et5</b>	<b>CQ2</b>	<b>Msp1</b>	<b>E2</b>	<b>E5</b>	<b>E2M</b>	<b>EM4</b>			
<b>C</b>	<b>Bkg</b>	<b>Et3</b>	<b>Et6</b>	<b>CQ2</b>	<b>Msp1</b>	<b>E3</b>	<b>E5</b>	<b>E2M</b>	<b>E5M</b>			
<b>D</b>	<b>Et1</b>	<b>Et3</b>	<b>Et6</b>	<b>NTx</b>	<b>Msp1</b>	<b>E3</b>	<b>E6</b>	<b>E2M</b>	<b>E5M</b>			
<b>E</b>	<b>Et1</b>	<b>Et4</b>	<b>Et6</b>	<b>NTx</b>	<b>E1</b>	<b>E3</b>	<b>E6</b>	<b>E3M</b>	<b>E5M</b>			
<b>F</b>	<b>Et1</b>	<b>Et4</b>	<b>CQ1</b>	<b>NTX</b>	<b>E1</b>	<b>E4</b>	<b>E6</b>	<b>E3M</b>	<b>E6M</b>			
<b>G</b>	<b>Et2</b>	<b>Et4</b>	<b>CQ1</b>	<b>PHA</b>	<b>E1</b>	<b>E4</b>	<b>E1M</b>	<b>E3M</b>	<b>E6M</b>			
<b>H</b>	<b>Et2</b>	<b>Et5</b>	<b>CQ1</b>	<b>PHA</b>	<b>E2</b>	<b>E4</b>	<b>E1M</b>	<b>E4M</b>	<b>E6M</b>			

Bkg= Background (étalon 0 pg/mL); Et 1 à 6= Standard 1 à 6; CQ1 et CQ2= Témoin 1 et 2; NTx= (PBMCs non traités); PHA= (PBMC exposés à phytohémagglutinine A), MSP1= (PBMCs exposés à *Merozoite Surface Protein*), E1 à E6= PBMCs traités par Extraits polysaccharidiques PoS, Pec et Hems de *K. grandifoliola* et *C. sanguinolenta*, E1M à E6M (PBMC traités à E1 à 6 et exposés à Msp1).

## Annexe 8 : Clairance éthique obtenue du Comité National d’Ethique du Cameroun

### COMITE NATIONAL D’ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d’éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2015/03/568/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 17 mars 2015

[Cnethique\\_minsante@yahoo.fr](mailto:Cnethique_minsante@yahoo.fr)

#### CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d’Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session ordinaire du 15 janvier 2015, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Characterisation and biological activities of polysaccharides isolate from three traditional Cameroonian herbal medicine**», soumis par Mme **MEDIASSE KENGNE Francine**, Investigateur Principal, Université de Yaoundé1.

Le projet est d’un grand intérêt scientifique et social. La procédure de l’étude est bien documentée et claire. Les risques liés au prélèvement sanguin sont précisés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. La notice d’information et le formulaire de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont précisées dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d’Ethique approuve pour une durée d’un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

L’étudiante **MEDIASSE KENGNE Francine** est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devrait y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. Les investigateurs sont appelés à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations susmentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

#### Ampliations

- MINSANTE

N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l’autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.





## **Annexe 9 : Consentement éclairé version française**

### **FICHE DE CONSENTEMENT ECLAIREE POUR LES PARTICIPANTS A L'ETUDE DE RECHERCHE**

**I. Investigateurs :** MEDIESSE K. Francine, MsC, Université de Yaoundé I, 674279076,  
BOUDJEKO Thaddée, PhD, Université de Yaoundé I, 675341754, boudjeko@yahoo.com

**II. L'étude de recherche :** « **Caractérisation et activités biologiques des polysaccharides isolés de quelques plantes de la pharmacopée camerounaise** »

**Pays : Cameroun**

#### **À propos du formulaire:**

Cher Monsieur/Madame, des scientifiques de l'Université de Yaoundé I entreprennent une étude de recherche sur le potentiel thérapeutique de nouveaux composés isolés de certaines plantes à savoir *Khaya grandifoliola*, et *Cryptolepis sanguinolenta*, *Cymbopogon citratus*. De façon plus spécifique, nous voulons savoir si les molécules appelées polysaccharides (sucres) présents dans les préparations traditionnelles possèdent des effets sur le système immunitaire humain. Veuillez lire attentivement le présent formulaire car il est important que vous compreniez pourquoi nous faisons cette étude de recherche et ce que nous attendons de vous si vous décidez de participer.

Nous voulons que vous compreniez que participer à cette étude de recherche est totalement volontaire. Si vous décidez de ne pas participer, ou si vous décidez de participer et puis changer d'avis, vous pouvez vous retirer à tout moment, vous n'en subirez aucunes représailles. Si vous acceptez de participer à cette étude nous vous demanderons de signer un formulaire de consentement.

#### **III. Le Consentement éclairé**

Le consentement éclairé qui vous est présenté fournit les informations sur notre étude de recherche. L'équipe de recherche vous renseignera également au sujet de l'étude de recherche. S'il y a quelque chose que vous ne comprenez pas, n'hésitez pas à nous demander de vous expliquer. Il est normal que vous preniez votre temps pour décider si vous voulez participer ou non. Vous pouvez en parler à votre famille, vos amis et votre habituel avant de vous décider. Si vous acceptez de participer à cette étude vous serez alors invitée à signer ce nous ce

formulaire de consentement, dans ce cas une copie du formulaire signée sera mise à votre disposition pour vos archives. Vous pouvez également donner votre consentement oral.

#### **IV. Objectifs de l'étude**

Vous êtes invité à participer à cette étude de recherche car vous êtes âgés entre 23 et 35 ans, n'ayant aucun symptôme de fièvre et/ou de paludisme et enfin n'ayant consommé aucun des différents anti-inflammatoires depuis au moins deux (02) semaines. Un total de 10 individus habitants le quartier Nkolbisson participera à cette étude de recherche.

L'étude sera menée avec des extraits polysaccharidiques (sucres) isolés de trois plantes camerounaises consommées par les populations pour le traitement de la fièvre, du Paludisme et d'autres problèmes hépatiques à savoir : *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, et *Cymbopogon citratus*. Le but est d'évaluer d'une part leur capacité à moduler la réponse immunitaire. La procédure consiste à faire un prélèvement de sang veineux, les données d'identification les concernant seront conservées uniquement sur la fiche d'enquête pendant la période de l'étude pour permettre la validation des données. Ainsi, 5 mL de sang seront prélevés, quantité correspondant à une cuillère à soupe. Les échantillons des participants sains seront utilisés au laboratoire pour isoler les cellules immunitaires (PBMCs) et/ou les globules rouges.

#### **Si vous acceptez de participer, voici ce que nous attendons de vous :**

- Nous vous poserons des questions sur votre état de santé actuel et votre médication pendant ces deux semaines précédentes;
- Nous vous prélèverons un échantillon de sang veineux si répondez aux différents critères d'inclusion.

#### **V. Risques**

Il y a très peu de risques relatifs à cette étude de recherche si vous décidez d'y participer, cependant nous souhaitons que vous les connaissiez. Nous vous demandons de donner 5mL de sang, les risques sont uniquement liés à une prise de sang normale. Cela peut inclure une faible douleur ou un bleu à l'endroit où le sang a été prélevé. Parfois il est possible qu'une personne se sente affaiblie ou puissent tomber dans les pommes lorsque le sang est prélevé. Le risque d'infection bactérienne est minime puisque le seul du matériel stérilisé et utilisable une seule fois sera utilisé.

De même le prélèvement sera effectué par un Technicien de Laboratoire compétant. Vous ne serez ni retardé, ni perturbé dans vos activités. Si vous le souhaitez, vous pourriez avoir accès aux résultats de l'étude.

## **VI. Problèmes liés à l'étude**

Dans le cas où une infection ou une lésion physique résulterait de la prise de sang, le projet payera pour les médicaments ainsi que pour tout autre traitement approprié.

## **VII. Bénéfices**

En participant à cette étude de recherche, vous ne recevrez pas d'avantage direct de par les résultats. Cependant, les populations souffrant de maladies liées à l'inflammation chronique cérébrales bénéficieront dans le futur des informations collectées lors de cette étude de recherche.

## **VIII. Compensation**

Vous ne recevrez pas d'argent si vous participez à l'étude. En cas d'accident physique (par exemple accident de route lorsque vous êtes sur le chemin du laboratoire pour participer à l'étude) des soins médicaux seront fournis, mais vous serez responsable de leur coût. Le sponsor de cette étude de recherche ne paiera pas pour son coût ou pour une perte de salaire.

## **IX. Garantie de la confidentialité de l'étude et des informations collectées**

Toutes vos informations personnelles incluant les informations relatives à votre état de santé seront maintenues confidentielles selon la réglementation en vigueur. Un code sera attribué à chaque participant, ainsi votre nom n'apparaîtra dans aucun rapport à moins que vous ne choisissiez d'apparaître dans la liste des remerciements.

Les informations collectées dans le cadre de cette étude de recherche pourront être publiées dans des revues scientifiques, cependant votre nom et informations d'identifications ne seront pas mentionnées. Les personnes qui pourront avoir accès à votre rapport sont: l'Université de Yaoundé I, le comité national d'éthique et les membres de l'équipe de recherche.

## **X. Questions**

Si vous avez quelques questions que ce soit, vous pouvez contacter :

- Dr. KAPTUE, Chef du Comité d'éthique, ministère de santé. Son numéro de téléphone est : 237 223 10 52
- Pr. BOUDJEKO Thaddée, ou Mlle MEDIESSE KENGNE Francine qui sont les responsables de l'étude de recherche. Leurs numéros de téléphone portable respectifs sont : 237 675 34 17 54 et 237 674 27 90 76

Vous êtes aussi la bienvenue si vous souhaitez nous rendre visite au Centre de Biotechnologie pour apprendre plus concernant le sujet de notre recherche.

### **XI. Déclaration du consentement**

J'ai lu les informations ci-dessus ou bien elles m'ont été lues. J'ai eu l'opportunité de discuter cette étude de recherche avec un membre de l'équipe de recherche, et toutes mes questions m'ont été répondues dans une langue que je comprends. Je décide de participer à cette étude de recherche selon ma propre volonté. Je comprends que je peux me retirer de l'étude de recherche à tout moment. Une copie de ce formulaire de consentement m'a été remise.

J'accepte de participer à cette étude de recherche:  OUI  NON

Nom de la participante (écrit)	Signature	Date
Age du participant :		
Sexe :		
Profession :		
Lieu de résidence:		
Origine ethnique:		
Situation matrimoniale:		
Téléphone :		
Nom de la personne ayant lu le consentement (Investigateur)	Signature	Date

### **Informations sur votre état de santé**

- Quel est votre état de Santé ? Avez-vous une maladie connue ? oui ? non ?  
Si oui la quelle ?.....
- Avez-vous de la fièvre  OUI  NON
- Avez-vous consommez un médicament anti-inflammatoire durant ces 2 semaines ?  
 OUI  NON

## **Annexe 10 : Consentement éclairé version anglaise**

### **RESEARCH PARTICIPANT INFORMED CONSENT**

**I. Investigators :** MEDIESSE K. Francine, MsC, University of Yaounde I, 674279076

BOUDJEKO Thaddée, PhD, University de Yaounde I, 675341754

**II. The Study :** « **Characterization and Biological activities of polysaccharides isolated from some traditional Cameroonian herbal medicine** »

**Country:** Cameroon

#### **In connection with the form:**

Dear Madam, scientists at the University of Yaoundé I are conducting a research study on the therapeutic potential of new compounds isolated from some plants used in traditional medicine by tradipraticians and local population for the treatment of fever and malaria, they are *Khaya grandifoliola*, et *Cryptolepis sanguinolenta*. Specifically, we want to know if molecules called polysaccharides or sugars presents in traditional preparations have effects on human immune system. Please read this form carefully because it is important for you to understand why we are doing the research study and what is expected of you if you decide to participate.

We want you to understand that taking part in this research study is completely up to you. If you decide not to participate, or if you decide to participate and then change your mind, you can withdraw from the research study at any time; you will not suffer any reprisals. If you agree to participate in this study, we will ask to you to sign a consent form. A copy of the signed form will be available to you

#### **III. Informed consent**

This informed consent provides you information about this research study. The research staff will also tell you about the research study. If there is anything you do not understand, please ask us to explain. It is OK to take your time in deciding to participate or not. You may talk to your family, friends or regular doctor before deciding. If you want to take part in this research study, you will be required to sign this consent form or give your oral consent.

#### **IV. Objectives of the study**

You are invited to participate to this research study because you are aged between 23 and 35, having no symptom of fever and or/malaria and finally having not used any of anti-

inflammatory drugs commercialize on Cameroonian market since two (2) weeks. A total of 10 people living at Nkolbisson will participate in this research study.

The study will be carried with polysaccharide extracts (sugar extract) isolated from these three medicinal plants (*Khaya grandifoliola*, *Cryptolepsis sanguinolenta* and *Cymbopogon citratus*) use by tradi-praticians or local population for the treatment of fever, malaria and hepatic disorders. The aim is to evaluate their capacity to modulate immune response. The procedure involves collecting venous blood sample, from the different participants. Data identified and collected will be conserved only on the investigation forms during the period of study to allow a proper evaluation of data.

Thus, 5 mL of blood will be drawn, a quantity corresponding to a teaspoon full of blood. The blood samples from the healthy participants will be used in the laboratory to isolate the mononuclear cells (PBMC) and/or the red blood cells.

**If you agree to participate, you will be required to do the following:**

- We will ask you questions about your current health status and your medication during the previous two weeks
- We will draw a blood sample if you meet the different inclusion's criteria.

## **V. Risks**

There are very little risks if you decide to participate in this research study, but we want you to know what these risks are. We are asking you to provide 5 mL of blood. The risks are minimal and are only those of having blood drawn. This might include mild pain or a bruise at the place where the blood is drawn. Occasionally, a person may faint or feel faint when blood is drawn. Risk of infection is slight since only sterile one-time equipment will be used. Also, the drawing of blood will be performed by a competent laboratory technician. You can also be assured that we would not delay you or disturb your activity. If you wish, you can have access to the results afterwards.

## **VI. Problems related to the study**

In the event that an infection or physical injury results from the blood drawn, the project will pay for drugs as well as any other appropriate treatment.

## **VII. Benefits**

By participating in this research study, you will not receive any direct benefits from the results. However, results from this research study may benefit other people suffering from inflammatory related diseases in the future from the information collected during the study.

### **VIII. Compensation**

You will not receive any money for participating in this research study. In the case of physical injury medical care will be provided, but you will be responsible for its cost. The sponsor of this research study will not pay for its cost or loss of wages

### **IX. Guarantee of the confidentiality of the study and information collected**

If you participate in this study, the data taken, including any information relating to your state of health will not be accessible to anyone except members of the research project. All the results will be stored in a secured location. No one except the members of this team of study will have access to the data. Your name will not be disclosed in any of the reports of evaluation whatsoever. You will also have to choose if your name should appear in the list of acknowledgements.

Information gathered in this research study will be published in a scientific magazine, however your name and other identifying information will not be revealed. Agencies with research oversight, who may review your records include: the University of Yaoundé I, members of National Ethical Committee and research team

### **X. Questions**

If you have any questions, you can contact:

- Dr. Kaptue, Head, Ethical Committee at the Ministry of Health: phone number is 237 223 1052
- Pr. BOUDJEKO Thaddée or Ms MEDIESSE KENGNE Francine who is in charge of this research study: cell phone number is +(237)-675 34 17 54 / 674 27 90 76

You are welcome to visit us at the Biotechnology Center to learn more about our research subject.

### **XI. Statement of Consent**

I have read the above information or it has been read to me. I have had the opportunity to discuss this research study with the staff, and I have had my questions answered by them in language I understand. I take part in this research study of my own free will. I understand that I may withdraw from my participation at any time. A copy of this consent form has been given to me.



I agree to take part in this research study:  YES  NO

Subject's name	Signature	Date
Age:		
Sex :		
Occupation :		
Place of residence		
Marital status:		
Phone number		
Name of the person who read the consent (Investigator)	Signature	Date

**Information about your health status**

- What is your health status? Do you have a known disease? Yes ? No ?

If yes, which one ?.....

- Do you have fever?  YES  NO

- Did you take an anti-inflammatory drugs during the previous two weeks?

YES  NO

## **Annexe 11 : Origines des lignées cellulaires utilisées**

Les lignées cellulaires immortelles utilisées pour notre étude sont:

- **La lignée Raw 264.7** : Ce sont des macrophages isolés du sang des souris BALB/c et immortalisés;
- **La lignée U87** : Anciennement appelée U87 pour Uppsala 87 Malignant Glioma a été établi en 1968 à l'Université d'Uppsala. Elle est issue d'une patiente atteinte d'un cancer de cerveau au stade IV. U87 sont des cellules cancéreuses de glioblastome (Cellules épithéliales dérivées des cellules gliales).
- **La Lignée IMR 32** : Cellules épithéliales isolées en 1967 d'un patient atteint de neuroblastome
- **La Lignée A549** : Ce sont des cellules épithéliales dérivés des Adénocarcinomes pulmonaires ;
- **La lignée MDA-MB 32** : Cellules épithéliales dérivés des du tissu mammaire d'une patiente atteinte du cancer des seins.

**Annexe 12 : Liste des Publications issues de la thèse**

**Mediesse K. F.**, Boudjeko T, Hasitha A., Gangadhar M., Mbacham W. F. and Yogeeswari P. (2018). Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory response by polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr and *Cymbopogon citratus* Stapf leaves in raw 264.7 macrophages and U87 glioblastoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2018) 18:86.

**Mediesse K. F.**, Sipping Kemegne M. T., Kouamo Mangoua M. F., Obadiah K, Tassi Yunga S, Mbacham F. W., Leke R. G F. and Boudjeko T. (2018). Evaluation of *in vitro* antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* C.D.C (Welw) stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr leaves. *African Journal of Biotechnology*. ISSN 1684-5315.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory response by polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr and *Cymbopogon citratus* Stapf leaves in raw 264.7 macrophages and U87 glioblastoma cells

Francine Kengne Mediesse<sup>1</sup>, Thaddée Boudjeko<sup>1,3\*</sup>, Anantharaju Hasitha<sup>2</sup>, Matharasala Gangadhar<sup>2</sup>, Wilfred Fon Mbacham<sup>3,4</sup> and Perumal Yogeeswari<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cymbopogon citratus* (Stapf) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr leaves are used in Cameroonian traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases. Several studies have been performed on the biological activities of secondary metabolites extracted from these plants. However, to the best of our knowledge, the anti-neuro inflammatory and protective roles of the polysaccharides of these three plants have not yet been elucidated. This study aimed at investigating potential use of *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharides in the prevention of chronic inflammation.

**Methods:** Firstly, the composition of polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark (KGF), *C. sanguinolenta* (CSF) and *C. citratus* (CCF) leaves was assessed. Secondly, the cytotoxicity was evaluated on Raw 264.7 macrophages and U87-MG glioblastoma cell lines by the MTT assay. This was followed by the in vitro evaluation of the ability of KGF, CSF and CCF to inhibit lipopolysaccharides (LPS) induced overproduction of various pro-inflammatory mediators (NO, ROS and IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, NF- $\kappa$ B cytokines). This was done in Raw 264.7 and U87-MG cells. Finally, the in vitro protective effect of KGF, CSF and CCF against LPS-induced toxicity in the U87-MG cells was evaluated.

**Results:** CCF was shown to mostly contain sugar and no polyphenol while KGF and CSP contained very few amounts of these metabolites ( $\leq 2\%$ ). The three polysaccharide fractions were non-toxic up to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . All the polysaccharides at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inhibited NO production, but only KGF and CCF at 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  down-regulated LPS-induced ROS overproduction. Finally, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS reduced 50% of U87 cell viability, and pre-treatment with the three polysaccharides significantly increased the proliferation.

(Continued on next page)

\* Correspondence: [boudjeko@yahoo.com](mailto:boudjeko@yahoo.com)

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Valorisation of Plant Resources, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 3851, Messa-Yaounde, Yaounde, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



(Continued from previous page)

**Conclusion:** These results suggest that the polysaccharides of *K. grandifoliola*, *C. citratus* and *C. sanguinolenta* could be beneficial in preventing/treating neurodegenerative diseases in which neuroinflammation is part of the pathophysiology.

**Keywords:** Plant polysaccharide, *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *Cymbopogon citratus*, Lipopolysaccharides, Anti-neuroinflammatory

## Background

Lipopolysaccharides (LPS) derived from gram-negative bacteria are considered to be the most potent activators of the production of various inflammatory mediators such as pro and anti-inflammatory cytokines, nitric oxide (NO) by macrophages [1–3]. LPS excreted during bacterial infection cause chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration [4, 5], therefore their stimulation is a good model for mimicking neuroinflammatory conditions [6]. Abrogation of the inflammatory mediator's production may be the potential target(s) for neuroinflammatory therapeutics.

Children under the age of five affected by malaria are at risk of developing complications including severe anaemia and cerebral malaria (CM). CM occurs in non-immunized individuals and those with failure of standard antimalarial treatment [7]. It is mostly characterized by hyper-parasitemia, excessive production of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12 etc....) followed by up-regulation of endothelial cell adhesion molecule expression, which contribute to the sequestration of parasitized erythrocytes in the brain microvasculature [8]. This sequestration reduces the microvascular flow, thereby causing disruption of blood brain barrier (BBB), cerebral oedema and tissue hypoxia. Increasing evidence suggests that oxidative damage to cell components has a relevant pathophysiological role in several types of human diseases, including malaria. The inflammation of the brain may also contribute to a wide variety of neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Multiples Sclerosis and psychiatric diseases [9, 10]. A lot of anti-inflammatory drugs are commercialised but due to their potential secondary effects (teratogenic, mutagenic, cancerigenic, gastric, metabolic, endocrinal, neuronal disorders), it is necessary to discover and develop much safer and new bioactive compounds [11].

According to Xie et al. [12], there is an increasing interest of pharmaceutical sectors and researchers in polysaccharides isolated from medicinal plants because of their biological activities that are antioxidant (inhibition of lipid peroxidation, free radicals scavenging activities, protection of DNA from breaks induced by ROS), anti-inflammatory, anticancer [13–15], as well as the stimulation of PBMC proliferation and INF $\gamma$  cytokine production [16, 17]. Moreover, most polysaccharides derived from higher plants are relatively non-toxic and do not cause significant side effects

as compared to immunomodulatory bacterial polysaccharides and synthetic compounds [18].

*Khaya grandifoliola* (Meliaceae family), *Cryptolepis sanguinolenta* (Periplocaceae family) and *Cymbopogon citratus* (Poaceae family) are three medicinal plants found in Cameroon and many African countries. Decoctions from *K. grandifoliola* stem bark and root, *C. sanguinolenta* leaves and of *C. citratus* leaves are used in the treatment of malaria and other infectious diseases that provoke fever, pain and inflammation [19–21]. Numerous studies have been conducted in order to justify the folkloric use of these plants in the treatment of inflammatory diseases [11, 21–23]. The present work aimed at exploring the anti-neuroinflammatory (down-regulation of NO, ROS and various pro-inflammatory cytokines) of polysaccharide fractions isolated from these plants of interest. In vitro system experiment was performed using various spectrophotometry, cell biology and molecular biology techniques including: MTT assay, Griess reactions and DCFH-DA assay, and Quantitative Real Time PCR.

## Methods

### Materials

The stem barks of *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Welw) (Meliaceae family), leaves of *Cymbopogon citratus* Stapf (Poaceae family) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr (Periplocaceae family) were collected from Mbalmayo forest, Emana and Ongot respectively, in the Centre Region of Cameroon. The plant species were identified and authenticated by Mr. Nana of the National Herbarium of Cameroon, Yaounde (Cameroon), (Voucher specimen no: 52658/SFR-Cam, N°14,243/HNC and 28,247/SRF-Cam respectively for *K. grandifoliola* stem bark, *C. citratus* and *C. sanguinolenta* leaves).

### Polysaccharide fraction preparation

The stem bark of *K. grandifoliola*, leaves of *C. citratus* and *C. sanguinolenta* were collected, shade-dried for one week at room temperature and powdered. Extraction of low molecular weight (LMW) polysaccharide fractions was performed as described by Thangam et al. [23] with slight modifications. Briefly, for the de-coloration and de-fatting process, 200 g of each powder was soaked in 60% methanol for 48 h in a shaker at 200 rpm. The resulting materials were boiled twice in 1 L of distilled water at 80 °C for 2 h and the

supernatants were pooled and precipitated overnight at 4 °C with 95° ethanol (1:2 (v/v)). The polysaccharides were collected by centrifugation, then dissolved in water and dialyzed against distilled water at room temperature. Each dialysate was then mixed with 4:1 (v/v) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ButOH solvent system and stirred for 15 min. After centrifugation, the upper polysaccharide solution was collected and deproteinized twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ButOH solvent until there were no proteins left. The absence of proteins in each fraction was confirmed by the Bradford (1976) [24] method. The deproteinized polysaccharide solutions were then subjected to lyophilization and LMW polysaccharide fractions were obtained and were named KGE, CSF and CCF for *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* respectively.

#### Quantification of total sugar and phenolic compounds

Total sugars were determined using phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as described by Dubois et al. [25], where neutral monosaccharides were heated in acid medium and transformed into dehydrated derivatives of furfural. Practically, 0.2 mL of sample were mixed with 0.2 mL of 5% phenol. Then, 1 mL of concentrated sulfuric acid was added quickly and stirred. The mixture was placed at 100 °C for 10 min until it developed a yellow colour. The absorbance was read at 485 nm. The amount and level of sugar present were calculated using glucose as standard and expressed as µg equivalent of glucose (GE) per mg of dry polysaccharides.

Phenolic compounds were estimated by the Folin-Ciocalteu method [15]. Briefly, 750 µL of extract solution (0.3 mg/mL) of polysaccharide fractions were added to 75 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min, 750 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) were added. The absorbance was measured at 760 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer after 30 min in the dark. Phenolic compound amounts were calculated using ferulic acid as standard and expressed as µg equivalent of ferulic acid equivalent (FAE)/mg of dry polysaccharide.

#### Toxicity of polysaccharide fractions on raw 264.7 macrophages and U87-MG cell lines

RAW 264.7 cells, the murine macrophage cell line and the U87-MG human glioblastoma cell line were obtained from the National Centre for Cell Science (NCCS) Pune, India. RAW 264.7 cells and U87-MG cells were cultured respectively in RPMI 1640 medium and Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), L-Glutamine (200 mM), streptomycin (200 µg/ml) and penicillin (200 U/ml) and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The assay was carried out on cells with 70% confluence. The cell viability was tested using Trypan Blue dye and at least 95% of viability was confirmed to carry out the assay.

RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^5$ ) were treated with 10 µg/mL LPS with or without different concentrations of

polysaccharide fractions (100–1000 µg/mL) for 24 h (polysaccharide samples were added 1 h before LPS). Non-treated cells were utilized as negative controls and cells treated with LPS alone were utilized as positive controls. Aspirin, a non-steroid anti-inflammatory compound (previously shown to be non-toxic for Raw 264.7 cells), was used 1 µM as positive control. After treatment, the cell culture supernatants were collected for nitrite assay and plated cells used for cell proliferation assessment by MTT assay.

Otherwise, U87-MG ( $5 \times 10^3$ ) cells were treated with different concentrations of polysaccharide fractions (100–1000 µg/mL) for 48 h and the cell proliferation was evaluated by MTT assay.

#### Cell proliferation assay

Proliferation of cells after treatment was determined by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) colorimetric assay [26]. After incubation, the medium was discarded, MTT (0.5 mg/mL in PBS 1X) was added to the treated cells and the plate was incubated for an additional 4 h. The medium was discarded once more and Formazan Blue, which was formed in the cells, was dissolved with 100 µL of Dimethylsulphoxide (DMSO). The optical density (OD) was measured at 590 nm against a background at 620 nm using a microplate reader (Molecular Device Spectra M4, USA). The cell viability was determined as  $(\text{Mean A1}_{(590-620\text{nm})} / \text{Mean A0}_{(590-620\text{nm})}) * 100$  where A0 and A1 are respectively the absorbance in untreated and treated wells. The toxicity or growth inhibitory percentage of polysaccharide fractions were determined by the formula:  $1 - [(\text{Mean A1}_{(590-620\text{nm})} / \text{Mean A0}_{(590-620\text{nm})})] * 100$ .

#### In vitro evaluation of inhibitory effect of LPS-induced brain toxicity

An U87-MG glioblastoma cell line was used in this assay to mimic in vitro brain toxicity. For optimization of LPS dose, U87 cells were treated with LPS (1–200 µg/mL) and growth inhibitory percentage determined by MTT assay as previously described. The inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) value was calculated using GraphPad Prism 6.01. The protective effect of polysaccharide fractions at non-toxic concentrations (12.5–100 µg/mL) on U87-MG was assessed by their co-incubation with LPS (100 µg/mL) for 48 h (polysaccharide samples were added 1 h before LPS). Diclofenac potassium at 50 µg/mL (previously shown to be non-toxic for U87-MG cells) was used as positive control. The medium was changed after 48 h and 100 µL of MTT (0.5 mg/ml stock solution) were added and the plates incubated for an additional 4 h. The medium was once more discarded and the Formazan Blue insoluble crystal, which was formed in the cells, was dissolved with 100 µL of DMSO. The OD was measured at 590 nm against a



background at 620 nm. The protective effect of KGF, CSF and CCF was evaluated using GraphPad Prism 6.01.

#### Nitrite assay

After treatment of RAW 264.7 cells with/without non-toxic concentrations of polysaccharide fractions and LPS, cell culture supernatant was used to quantify the NO secretion by the measurement of nitrite concentration in the supernatants using the Griess reaction [27]. Each culture supernatant was mixed with the same volume of Griess reagent 1X and the absorbance of the mixture at 540 nm was determined with a microplate reader (Molecular Device Spectra M4, USA). Fresh RPMI culture medium was used as the blank and the amount of nitrite in the samples was measured with the sodium nitrite serial dilution standard curve.

#### Intracellular reactive oxygen species (iROS) estimation

Intracellular ROS estimation was measured using DCFH-DA [28]. Approximately  $5 \times 10^3$  U87-MG cells/well were plated on 96-well plates and treated with various polysaccharide fractions and/or LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h. Then, the plates were washed with PBS 1X cells were treated with 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA for 1 h. The loading buffer was removed and the plates washed. New PBS 1X was added into each well and oxidized DCFH excitation and emission were measured at 485 and 525 nm respectively in a spectrophotometer (SpectraMax M4, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Diclofenac potassium at non-toxic concentration on U87-MG was used as positive control. Percentage ROS production inhibition was computed using Graph Pad prism 6.01.

#### In vitro evaluation of inhibitory effect of LPS-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines

About  $10^5$  U87-MG cells/well/2 mL in 96 well plates were treated with polysaccharide fractions for 1 h followed by 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS for 48 h. After incubation, cells were washed with 500  $\mu\text{L}$  of PBS 1X, and total RNA was extracted from the untreated cells and from the LPS and/or polysaccharide fraction treated cells using RNA Xpress reagent according to the manufacturer's protocol. RNA was then quantified with Nanodrop and purity of RNA was determined with  $A_{260}/A_{280}$  ratio (1.8–2.0 was considered pure). RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse-transcribed using a cDNA synthesis kit. Quantitative Real Time PCR was performed on reversed-transcribed cDNA products for determination of TNF- $\alpha$ , IL6, IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa\text{B}$  expression according to the manufacturer's instructions using a BIO-RAD CFX Connect, with SYBR Green (Kapa Biosystems) as the fluorescent dye, enabling real-time detection of PCR products. Sense and antisense PCR primers used in this study were purchased from Sigma Genosis, India (Table 1). All samples were run in triplicates and the output values

reported were the average of three wells. The amplification consisted of denaturation at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 25 s, primer annealing at 58–64  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s and extension at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min, for a total of 37 cycles followed by final extension at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min. For quantification, the target gene was normalized to the internal standard GAPDH gene.

#### Statistical analysis

Results were expressed as the means  $\pm$  SEM. Multi group comparison was performed by one-way analysis of variance, followed by the Dunnet's multiple comparisons as a post hoc analysis test for comparison between polysaccharide treatment and positive control, non-treated or LPS group at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ . Calculations were performed using GraphPad InStat<sup>®</sup> version 6.01 software.  $\text{IC}_{50}$  was analyzed using non-linear regression.

## Results

### Partial composition and in vitro toxicity of polysaccharide fractions

After the extraction procedure that included deproteinization, carbohydrates were the major components in the polysaccharide fractions. *C. citratus* polysaccharide presents the highest level of sugar ( $629.78 \pm 1.4$   $\mu\text{g}$  GE/mg of dry polysaccharide) and no polyphenols. However, small amount of polyphenols were found in KGF and CSF polysaccharides (less than 2%) (Table 2). Therefore, the potential of these polysaccharide fractions could be related only to their carbohydrate content.

In order to assess the effects of all the three polysaccharide fractions on the viability of RAW 264.7 and U87-MG cells, the cells were treated with the indicated concentrations of KGF, CSF and CCF in the presence or absence of LPS and cell viability analysed by MTT assay. The results were shown in Fig. 1. The viability of RAW 264.7 cells was not significantly altered after 24 h of incubation with up to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of polysaccharide fractions (Fig. 1) and the data revealed noticeable toxicity on U87 MG for all the fractions tested with less than 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 h ( $p < 0.001$ ). Up to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , all the polysaccharide fractions significantly altered the two cells viability in a dose-dependent manner and cell viability decreased with increasing concentration. A growth inhibitory concentration of 80% was observed at 1 mg/mL. The results of the  $\text{IC}_{50}$  concentrations for RAW 264.7 and U87-MG cells with respect to all the three fractions are shown in Table 3. Therefore, in subsequent experiments, the concentrations of polysaccharide fractions used were 10 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### Effect of KGF, CSF and CCF in LPS induced anti-proliferation in the U87-MG cell lines

The protective effect of KGF, CSF and CCF over LPS induced toxicity was evaluated through MTT assay. The protective effect of polysaccharide fractions is their ability to



**Table 1** Details of primer sequences (Sigma Genosys) used for inflammatory mediators gene expression through RT-PCR amplification

Genes	Oligoname	Oligonucleotide sequence 5'.....3'	Length	Anneal T°
IL6	Human-IL6-FP	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	20	61.8 °C
	Human-IL6-RP	GAGGTGAGTGGCTGTCTGTG	20	
TNFα	Human-TNFalpha-FP	CTCCAGGCGGTGCCTTGTTC	20	60.4 °C
	H-TNFalpha-RP	CAGGCAGAAGAGCGTGGTG	19	
IL1β	Human-IL1beta-FP	GCAAGGGCTTCAGGCAGGCCGG	23	64 °C
	Human-IL1beta-RP	GGTCATTCTCCTGGAAGTCTGTGGGC	27	
NF-kB	Human-Nf-kB-FP	GCGCTTCTGCCTTCCTTA	20	58 °C
	Human-Nf-kB-RP	TCTTCAGTTTGTATGCCCCC	20	
GAPDH	Human-GAPDH-FP	ACCACAGTCCATGCCATCAC	20	60.4 °C
	Human-GAPDH-RP	TCCACCACCTGTGTGCTGT	19	

inhibit LPS toxicity and increase U87-MG cell proliferation. The IC<sub>50</sub> for LPS in the U87-MG was found to be 100 µg/mL. LPS (100 µg/mL) treatment significantly decreased cell viability from 100 to 52.3 ± 3.1% but polysaccharides co-treatment increased the U87-MG proliferation and viability (*p* < 0.001). According to the concentrations of the test fractions, KGF and CCF were most active at 12.5 µg/mL (cell viability up to 83.3 ± 0.2 and 72.9 ± 0.8% respectively) (Fig. 2). The protective effect of CSF was observed at 50 µg/mL (cell viability up to 65.21 ± 0.72%). However, no dose-dependent linear effect was observed. Compared to polysaccharides, diclofenac potassium at 50 µg/mL was non-toxic on U87-MG cells (4.8 ± 0.8% of growth inhibitory percentage) and presented the best protective effect (cell viability up to 99.97 ± 0.03%) (*p* < 0.001).

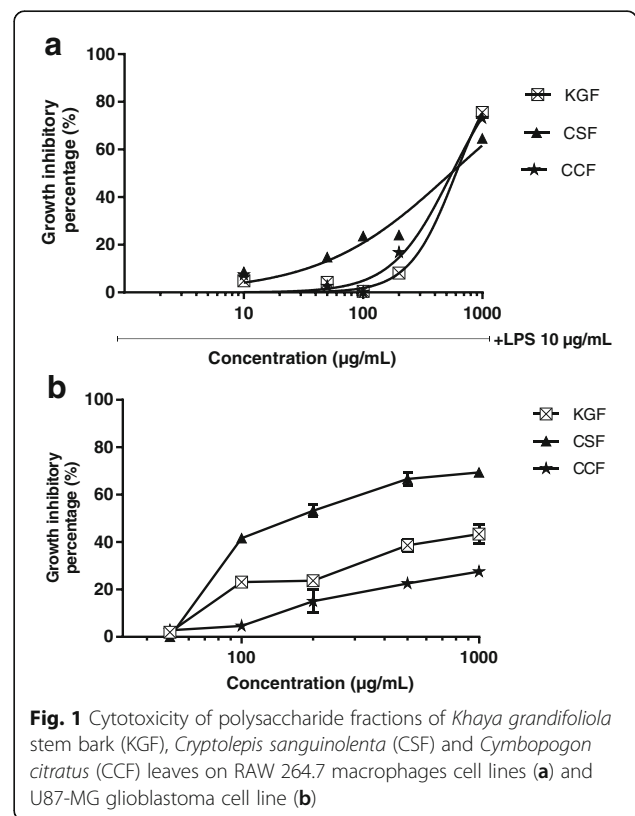
**Effect of KGF, CSF and CCF on NO and ROS secretion**

To investigate whether polysaccharide fractions regulate NO production, RAW 264.7 cells were pretreated with KGF, CSF and CCF for 1 h before treatment with LPS for 24 h, and nitrite content, a stable end product of NO was measured using Griess reaction. Treatment with LPS resulted in significant up-regulation of nitrite production (7.05 ± 0.09 µM), compared to the untreated control (3.5 ± 0.3 µM) (Fig. 3). However, RAW 264.7 cells pretreated with all the polysaccharide fractions at 100 µg/mL displayed a marked decrease in the induction

of nitrite after stimulation with LPS (*p* < 0.001). The nitrite production were respectively 2.56 ± 0.25; 3.02 ± 0.09 and 2.8 ± 0.16 µM for KGF, CSF and CCF treated cells at 100 µg/mL. The growth inhibitory percentage of Aspirin at 1 µM (180 µg/mL) on Raw 264.7 cells was 0.98 ± 0.28%. At this concentration, Aspirin-treated cells produced 2.46 ± 0.1 µM of nitrite. On the other hand, estimation of intracellular ROS was performed using DCFH-DA. The U87-MG cell treated with 10 µg/mL of LPS showed increased DCF fluorescence levels

**Table 2** Total sugar and polyphenols content of polysaccharides fractions of *Khaya grandifoliola* stem bark (KGF), *Cryptolepis sanguinolenta* (CSF) and *Cymbopogon citratus* (CCF) leaves by Phenol-sulfuric and Folin-Ciocalteu methods (mean ± SEM; n = 3)

Polysaccharide fractions	Total sugar content (µg GE/mg)	Total polyphenol (µg FAE/mg)
KGF	450.09 ± 0.33	17.76 ± 0.15
CSF	437.19 ± 0.53	15.54 ± 0.5
CCF	629.78 ± 1.39	0

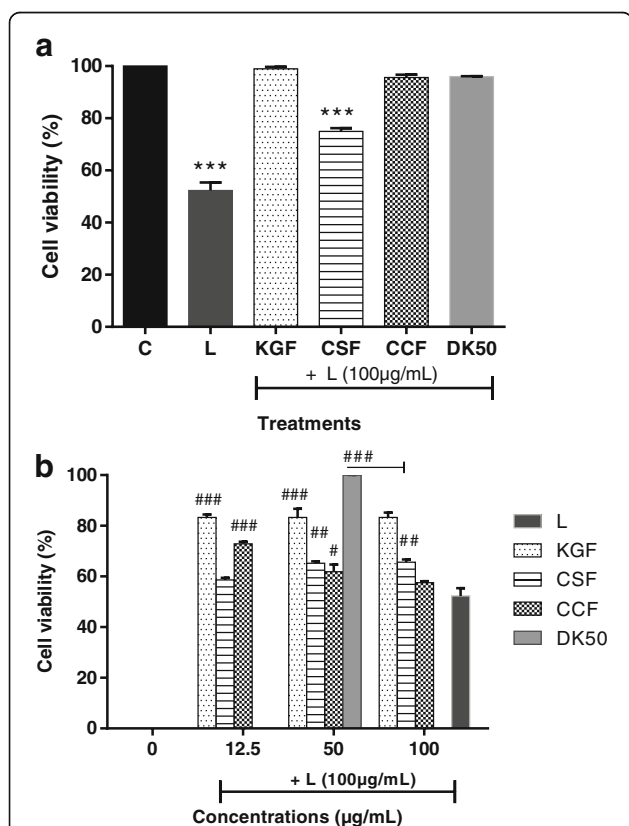


**Fig. 1** Cytotoxicity of polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* stem bark (KGF), *Cryptolepis sanguinolenta* (CSF) and *Cymbopogon citratus* (CCF) leaves on RAW 264.7 macrophages cell lines (a) and U87-MG glioblastoma cell line (b)

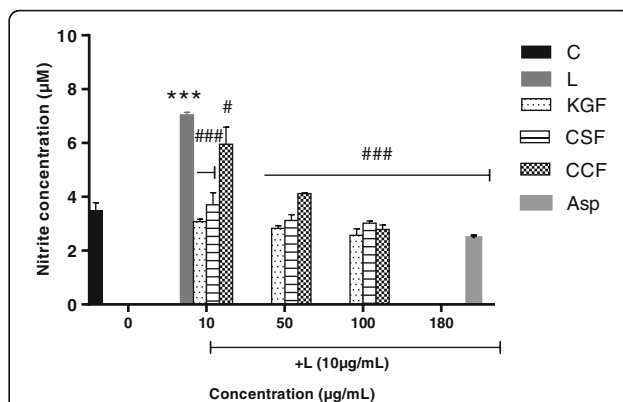
**Table 3** Inhibitory concentration 50 for Raw 264.7 Macrophages and U87-MG Glioblastoma cells line with respect to polysaccharide fractions of *K. grandifoliola* stem bark, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* leaves

Polysaccharide fractions	IC50 (µg/mL) for Raw 264.7 cells	IC50 (µg/mL) for U87-MG
KGF	600.9	>1000
CSF	545	243.7
CCF	554.1	>1000

(compared to the control,  $P < 0.005$ ) indicating of intracellular ROS production (Fig. 4). However, pre-incubation with KGF and CCF polysaccharide (12.5 µg/mL) and Diclofenac potassium (50 µg/mL) for 1 h before LPS treatment decreased the fluorescence intensity of the cells. CSF polysaccharide did not reduce intracellular ROS in LPS-induced U87-MG. The most promising KGF and



**Fig. 2** Inhibition of LPS toxicity on U87 cell lines by various polysaccharide fractions and diclofenac potassium; (a) C-control cells; L-LPS (100 µg/mL), KGF, CSF, CCF polysaccharides of *Khaya grandifoliola* stem bark, *Cryptolepis sanguinolenta* and *Cymbopogon citratus* leaves were tested at 100 µg/mL and Diclofenac potassium at 50 µg/mL (DK50). Data are expressed as mean ± SEM, \*\*\* denote statistical significance  $p < 0.001$  in comparison to the control group; (b) KGF, CSF, CCF polysaccharides were tested at 12.5, 50 and 100 µg/mL and DK50 #, ##, ### denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the LPS treated group

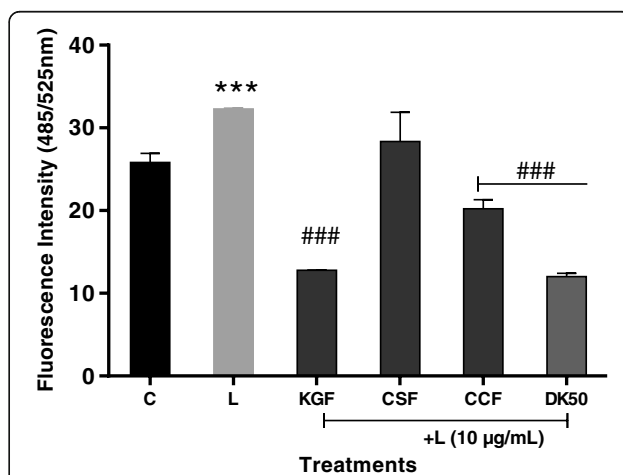


**Fig. 3** Effects of polysaccharides fractions of *Khaya grandifoliola* stem bark (KGF), *Cryptolepis sanguinolenta* (CSF) and *Cymbopogon citratus* (CCF) leaves and Aspirin (Asp) on the secretion of NO by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. C-Non-treated cells; L-LPS (10 µg/mL) treated cells, Asp-Aspirin 1 µM (180 µg/mL) treated cells, Data expressed as mean ± SEM (n = 3). \*, \*\*, \*\*\* denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the control group. #, ##, ### denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the LPS treated group (Dunnet multiple comparison, graph Pad Prism 6.0)

CSF showed the best NO and ROS inhibitory effects in LPS stimulated RAW 264.7 and U87-MG cell lines.

**Effect of polysaccharide fractions on mRNA expression of IL-1β, IL6, NF-kB and TNFα**

The systematic study of simultaneous changes in gene expression for several pro-inflammatory cytokines in



**Fig. 4** Effects of polysaccharides isolate from *Khaya grandifoliola* stem bark (KGF), *Cryptolepis sanguinolenta* (CSF) and *Cymbopogon citratus* (CCF) leaves at 12.5 µg/mL and Diclofenac potassium on the secretion of ROS by LPS-stimulated U87-MG cells. C-control cells; L-LPS (10 µg/mL), DK50-Diclofenac potassium 50 µg/mL. Data expressed as mean ± SEM (n = 3). \*, \*\*, \*\*\* denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the control group. #, ##, ### denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the LPS treated group (Dunnet multiple comparison, graph Pad Prism 6.0)

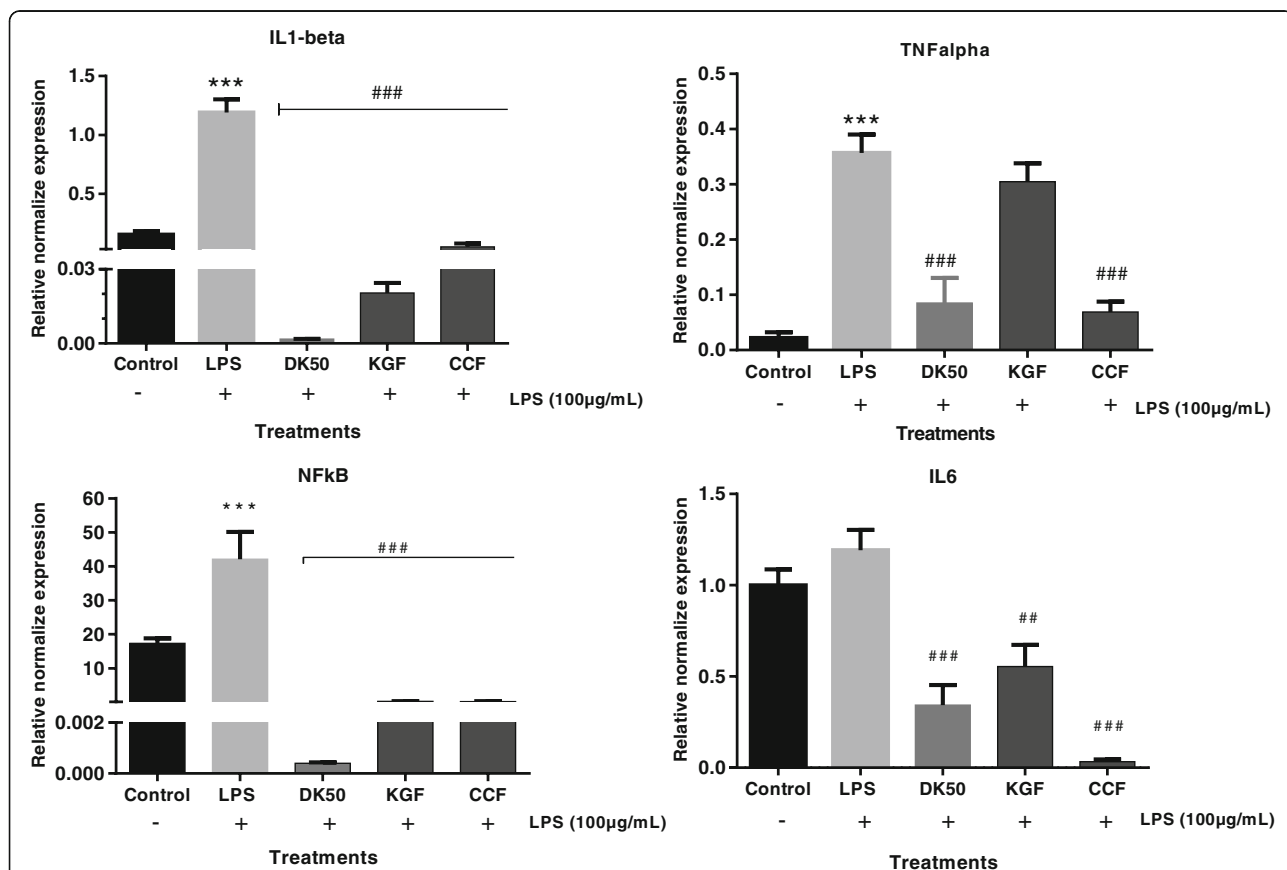
LPS-induced U87-MG cell lines was performed using Real Time gene expression studies. Comparing the LPS-treated and untreated cells, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  expression showed significant up-regulation. KGF and CCF polysaccharides at 12.5  $\mu$ g/mL were able to significantly reduce the over-expressions of IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B but only CCF reduced TNF- $\alpha$  over-expression. KGF and CCF suppressed the production of IL-6 and IL-1 $\beta$  in LPS-induced U87-MG cell lines by inhibiting NF- $\kappa$ B activation which is an important signaling pathway involved in the production of cytokines. Diclofenac potassium at 50  $\mu$ g/mL was more active on IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B compared to the polysaccharides (Fig. 5).

**Discussion**

Polysaccharides are present in plants, animals and microorganisms bound to with proteins and phenolic compounds. During their extraction, these others compounds are also obtained in various concentrations. Phenolic compounds

are known to have several biological activities including antioxidant and anti-inflammatory properties [29]. According to Chen et al. [30] and Mediesse et al. [15], the bioactivity of polysaccharide extracts increases in a dose-dependent manner with protein, phenolic and lipid contents. Recent studies now show that pure polysaccharides also have several biological activities [23, 31]. Some research has been oriented towards the identification of pure and bioactive polysaccharides. In this study, the modulation of *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharide fractions for LPS-induced inflammatory responses were examined in vitro. From cytotoxicity experiments, it was observed that the CSF polysaccharide exhibited more significant cytotoxic effect against the cancer cells than KGF and CCF fractions. The concentrations of KGF, CSF and CCF polysaccharides ( $\leq 100 \mu$ g/mL) used in this study were considered to be non-cytotoxic.

During inflammation, macrophages induce the expression of pro-inflammatory genes such as inducible nitric



**Fig. 5** Normalised gene expression levels of proinflammatory cytokines in LPS induced U87-MG cell lines (n = 3). The mRNA expression values were given as mean  $\pm$  SEM normalised to GAPDH levels in each sample. Y-axis values represent the number of mRNA copies relative to the number of GAPDH copies. Control-untreated cell line; LPS (100  $\mu$ g/mL), *K. grandifoliola* stem bark (FKG) and *C. citratus* leaves (FCC) were tested at 12.5  $\mu$ g/mL, DK50-Diclofenac potassium 50  $\mu$ g/mL treated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. #, ##, ### denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the LPS treated group. \*, \*\*, \*\*\* denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the control group

oxide synthase (iNOS). Cytokines, such as interleukin (IL)-1, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF), have been known to play important roles in pro-inflammatory response [32, 33]; and iNOS is up-regulated by secretion of pro-inflammatory cytokines and produces nitric oxide from L-arginine. Because high concentrations of NO can be toxic, the regulation of NO production is therefore an important target for inflammatory disease [34]. Our results indicate that FKG, FCS and FCC treatment can reduce NO in the RAW 264.7 cell. Pacheco-sanchez et al. [35] also reported that polysaccharides extracted from *Collybia dryophila* treatment showed a down-regulation effect of NO production. According to Kim et al. [36] classification, the percentage of NO inhibition from plant extract represents its anti-inflammatory potential. Therefore KGF and CCF polysaccharides could be considered as moderate and CSF polysaccharide as weak anti-inflammatory agent. In addition, LPS stimulates various transcription factors especially NF- $\kappa$ B which causes a chain of mechanisms, resulting in the production of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL6 and inflammatory mediator iNOS [37, 38]. Persistent NF- $\kappa$ B activation also causes chronic inflammation, which has long been related to certain types of cancers [39, 40]. In this study, after LPS incubation with U87 glioblastoma cell, the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL6 levels were elevated; the response was reversed by co-incubation of polysaccharide fractions in LPS. Several studies suggested that the biological activities of polysaccharides would strongly depend on their monosaccharide composition, structure, the degree of sulfation, the molecular weight, the sulfation pattern, and the glycosidic branches [41]. Luhm et al. [42] reported that  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) -D-Glucans from plant material were shown to be capable of having beneficial effects in pre-inflammatory responses, indicating that  $\beta$ -glucan can be a modulator of the anti-inflammatory response as interleukin mediators. We do not exactly understand the mechanism by which the KGF, CSF and CCF treatment reduce inflammation in the RAW 264.7 and U87 cells. Therefore, more research is needed to understand the effects of treatment with *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharide fractions on anti-inflammation and how these three polysaccharide fractions relate to changes of cytokine, ROS and NO.

## Conclusion

The present study was conducted to explore the potential use of *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharides to prevent chronic neuroinflammation. The results of the study show that KGF, CSF and CCF inhibit the toxic effect of LPS, increase brain cell (U87-MG) proliferation and exert anti-inflammatory effect by regulating various pro-inflammatory mediators (NO, ROS and pro-inflammatory cytokines). However, further detailed experiments need to be performed to understand the

exact mechanisms by which they act. Thus, KGF and CCF particularly present the best activities which could be used in a variety of painful conditions and also to attenuate neuroinflammation in neurological disorders.

## Abbreviations

CNS: Central Nervous System; DCFH-DA: Dichlorofluorescein diacetate; FCC: Polysaccharide fraction of *Cymbopogon citratus*; FCS: Polysaccharide fraction of *Cryptolepis sanguinolenta*; FKG: Polysaccharide fraction of *Khaya grandifoliola*; GAPDH: Glycerinaldehyde phosphate dehydrogenase; INF $\gamma$ : Interferon gamma; iROS: intracellular reactive oxygen; LPS: Lipopolysaccharide; MEM: Minimum Essential Medium; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B; NO: Nitrite oxide; TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

## Acknowledgments

The authors thank M. Nana of the Cameroon National Herbarium for plants identification. The authors are grateful to Professor Atogho-Tiedeu Barbara (Department of Biochemistry, University of Yaounde 1, Cameroon) for improving the English text.

## Funding

We gratefully acknowledge the Centre for Science and Technology of the Non-Aligned and Other Developing Countries (NAM S&T Centre) for providing the fellowship (Research Training Fellowship for Developing Country Scientist, RTF-DCS 14–15) at BITS, Pilani (India) to one of the authors Mediesse Kengne Francine.

## Availability of data and materials

All data are contained and described within the manuscript. The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Authors' contributions

TB, WFM and PY conceived the project, designed the study and were involved in the drafting and correction of the manuscript. TB and PY also coordinated the study. FMK carried out extraction of polysaccharides, oxidative and immunomodulatory assays, analysis and interpretation of data and participated in the correction of the manuscript. AH and MG participated in the work design and drafting of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Consent for publication

All authors gave their consent for the publication of the manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Valorisation of Plant Resources, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 3851, Messa-Yaounde, Yaounde, Cameroon. <sup>2</sup>Drug Discovery Research Laboratory, Department of Pharmacy, Birla Institute of Technology and Science–Pilani, Hyderabad campus, Jawahar Nagar, Hyderabad, Andhra Pradesh –500078, India. <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon. <sup>4</sup>Laboratory of Public Health Research Biotechnologies, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 3851, Messa-Yaounde, Yaounde, Cameroon.

Received: 12 October 2017 Accepted: 2 March 2018

Published online: 12 March 2018

## References

- Lee YL, Han JY, Lee CG, Heo K, Park SI, Park YS, Kim JS, Yang KM, Lee KJ, Kim TH, Rhee MH, Kim SD. Korean red ginseng saponin fraction modulates radiation effects on lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *J Ginseng Res*. 2014;38:208–14.
- Holden JA, Attard TJ, Loughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Inf Immun*. 2014;82(10):4190–203.
- Pallai A, Kiss B, Vereb G, Armaka M, Kollias G, Szekanecz Z, Szondy Z. Transmembrane TNF- $\alpha$  reverse signaling inhibits lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine formation in macrophages by inducing TGF- $\beta$ : therapeutic implications. *J Immunol*. 2016;196:1146–57.
- Liya Q, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *NIH Pub Acc*. 2007;55:453–62.
- Pizza V, Agressa A, D'Acunto CW, Festa M, Capasso A. Neuroinflamm-aging and neurodegenerative diseases: an overview. *CNS Neurol Disord Drug Target*. 2011;10:621–34.
- Niranjan R, Kamat PK, Nath C, Shukla R. Evaluation of guggulipid and nimesulide on production of inflammatory mediators and GFAP expression in LPS stimulated rat astrocytoma, cell line (C6). *J Ethnopharmacol*. 2010;127:625–30.
- Dondorp AM, Day NPJ. The treatment of severe malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(7):633–4.
- Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Immunol*. 2005;5:722–35.
- Reynolds A, Laurie C, Lee MR, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Inter Rev Neurobiol*. 2007;82:297–325.
- Koppula S, Kumar H, Kim IS, Choi DK. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*. 2012; <https://doi.org/10.1155/2012/823902>.
- Guidetti G, Di Cerbo A, Giovazzino A, Rubino V, Palatucci AT, Centenaro S, Fraccaroli E, Cortese L, Bonomo MG, Ruggiero G, Canello S, Terrazzano G. *In vitro* effects of some botanicals with anti-inflammatory and antitoxic activity. *J Immunol Res*. 2016;2016:5457010.
- Xie JH, Jin ML, Morris GA, Zha XQ, Chen HQ, Yi Y, Li JE, Wang ZJ, Gao J, Nie SP, Peng S, Xie MY. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1069255>.
- Xiaojuan H, Xuyan N, Jian L, Shaohua X, Aiping L. Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides: A Review. *J Experimen Integr Med*. 2012;2:15–27.
- Amit G, Pallavi RK, Sushama C. Applications and Uses of active ingredients from medicinal plants. *Indi J Nov Drug Deliv*. 2014;6:106–11.
- Mediesse KF, Woguia AL, Fogue SP, Atogho TB, Simo G, Boudjeko T. Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of *Stevia rebaudiana* leaves. *J Coast Life Med*. 2014;2:962–9.
- Aboughe-Angone S, Nguema-Ona E, Boudjeko T, Driouich A. Plant cell wall polysaccharides as immunomodulators of the immune system. *Cur Top Phytochemistry*. 2011;10:1–16.
- Boudjeko T, Megneko R, Woguia AL, Mediesse KF, WEJ K, Nounga TCD, Koum O. Antioxidant and Immunomodulatory properties of cell wall polysaccharides isolated from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L) king and H.E. Robins leaves. *BMC Res Notes*. 2015;8:759.
- Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:317–33.
- Njayou FN, Aboudi ECE, Tandjang MK, Tchana AK, Ngadjui BT, Moundipa PF. Hepatoprotective and Antioxidant activities of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC and *Entada africana* Guill. Et Perr. *J Nat Prod*. 2013;6:73–80.
- Ravinder K, Pawan K, Gaurav S, Paramjot K, Gagan S, Appramdeep K. Pharmacognostical investigation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Der Pharma Let*. 2010;2:181–9.
- Tempesta MS. The clinical efficacy of *Cryptolepis sanguinolenta* in the treatment of malaria. *Ghana Med J*. 2010;44:1–2.
- Tiwari M, Dwivedi UN, Kakkar P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food Chem Toxicol*. 2010;48:2913–9.
- Thangam R, Sathuvan M, Poongodi A, Suresh V, Pazhanichamy K, Sivasubramanian S, Kanipandian N, Ganesan N, Rengasamy R, Thirumurugan R, Kannan S. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon citratus* polysaccharide fractions. *Carbohydr Polym*. 2014;107:138–50.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–50.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*. 1956;28:350–6.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983;65:55–63.
- Cheenpracha S, Park EJ, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC. Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesterterpene peroxide, Epimuquibilin a. *Mar Drugs*. 2010;8:429–37.
- Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II Meth Mol Biol*. 2010;594:57–72.
- Kilani-Jaziri S, Mokdad-Bzeouich I, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, Kechir-Ghedira L. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure–activity relationship study. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40(4):416–24.
- Chen H, Zhang M, Qu Z, Xie B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem*. 2008;106:559–63.
- Batista JA, Dias EGN, Brito TV, Prudêncio RS, Silva RO, Ribeiro RA, Souza MHL, Regina CMP, Feitosa JPA, Chaves LS, Melo MRS, Freitas ALP, Medeiros JVR, Barbosa ALR. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: chemical structure and anti-inflammatory activity. *Carbohydr Polym*. 2014;99:59–67.
- Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Immunology - a short course*. 4th ed. New York: Wiley; 2000.
- Hua X, Chen P, Fox A, Myers R. Involvement of cytokines in lipopolysaccharide-induced facilitation of CGRP release from capsaicin-sensitive nerves in the trachea: studies with interleukin-1b and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Neurosci*. 1996;16(15):4742–8.
- Hur SJ, Choi SY, Lim BO. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Russula virescens* in the macrophage-like cell line RAW 264.7 activated by lipopolysaccharide. *J Nutr Food Sci*. 2012;142 <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000142>.
- Pacheco-Sánchez M, Boutin Y, Angers P, Gosselin A, Tweddell RJ. Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2007;555:61–6.
- Kim O, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Lett*. 1998;125:199–207.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(549):145–51.
- Hur SJ, Choi SY, Lim BO. *In Vitro* anti-inflammatory activity of *Russula virescens* in the macrophage like cell line RAW 264.7 activated by lipopolysaccharide. *J Nutr Food Sci*. 2012;2:142. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000142>.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell*. 1996;87:13–20.
- Normark S, Nilsson C, Normark BH, Hornef MW. Persistent infection with helicobacter pylori and the development of gastric cancer. *Adv Cancer Res*. 2003;99:63–89.
- Sun Z, He Y, Liang Z, Zhou W, Niu T. Sulfation of (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. *Carbohydr Polym*. 2009;77:628–33.
- Luhm J, Langenkamp U, Hensel J, Frohn C, Brand JM. Beta-(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors kappaB, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1beta/IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunol*. 2006;7:5.



Full Length Research Paper

## Evaluation of *in vitro* antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* C.D.C (Welw) stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr leaves

Francine Mediesse Kengne<sup>1</sup>, Marius Trésor Sipping Kemegne<sup>1</sup>, Mersmine Flaire Kouamo Mangoua<sup>1</sup>, Kenji Obadia<sup>2</sup>, Samuel Tassi Yunga<sup>2</sup>, Wilfried Fon Mbacham<sup>3,4</sup>, Rose Gana Fomban Leke<sup>2</sup> and Thaddée Boudjeko<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Valorisation of Plant Resources, Biotechnology Centre, University of Yaounde I, BP 3851, Messa-Yaounde Cameroon.

<sup>2</sup>Laboratory of Immunology, Biotechnology Centre, University of Yaounde I, BP 3851, Messa-Yaounde Cameroon.

<sup>3</sup>Laboratory of Public Health Biotechnology, Biotechnology Centre, University of Yaounde I, BP 3851, Messa-Yaounde Cameroon.

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Yaounde I, BP 812, Yaounde, Cameroon.

<sup>5</sup>Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale. Grand Réseau de Recherche VASI de Haute Normandie. Université de Rouen. 76821 Mont Saint Aignan, Cedex. France.

Received 16 December, 2017; Accepted 3 April, 2018

Antioxidant and immune modulatory activities of polysaccharides fractions isolated from *Khaya grandifoliola* stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* leaves were analyzed. Water-soluble total polysaccharides (TP) were extracted and precipitated in alcohol. Pectic (PF) and hemicellulosic fractions (HF) of cell walls were obtained using ammonium oxalate and potassium hydroxide. TP of *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta* pectins are mostly linked to proteins ( $86.39 \pm 1.13$  and  $67.66 \pm 2.05$   $\mu\text{g}$  eqBSA/mg DW). Polysaccharide fractions of *C. sanguinolenta* are rich in phenolic compounds. Gas chromatography analyses showed that TP of *C. sanguinolenta* is an arabinoglucan type, consisting mainly of glucose (60.51%) and arabinose (10.36%), while TP of *K. grandifoliola* is constituted of glucose (30.53%), galactose (28.89%), arabinose (17.57%) and rhamnose (10.74%). Pectic fractions of the two plants would be a rhamnagalacturonan type constituted of galacturonic acid, rhamnose and arabinose; while HF fractions might be xyloglucan as they were mainly constituted of glucose, xylose and arabinose. The polysaccharide fractions (50 to 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) exhibited antioxidant activity on both DPPH and ABTS radicals, with TP showing the highest activities. Polysaccharides were assessed to be non-toxic at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and strongly inhibited MSP1 (Malaria antigen)-induced overproduction of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by PBMCs in the *in vitro* immunological assays.

**Key words:** *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, polysaccharides, antioxidants, immunomodulatory activities.

## INTRODUCTION

*Khaya grandifoliola* C.D.C (Welw) (Meliaceae) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr (Periplocaceae) are two Cameroonian medicinal plants. Decoction from *K. grandifoliola* stem bark and leaves of *C. sanguinolenta* are used in the treatment of malaria and other infectious diseases (Bickii et al., 2000; Adeyemi and Gbilade, 2006; Stephen et al., 2009). *K. grandifoliola* is also called African Mahogany, Benin Mahogany, Large-leaved Mahogany or Senegal Mahogany. *C. sanguinolenta*, also known as Nibima, Kadze, Gangamau or Ghanaian quinine is a climbing shrub. These two plant species are largely distributed in western and central African countries. Because of the importance of these plants in traditional medicine, numerous studies showed the pharmacological properties of their plant extracts including hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, hypoglycemic, anti-pyretic, anti-microbial and anti-malaria activities (Ansah and Gooderham, 2002; Falodun et al., 2009; Olajide et al., 2009; Tempesta, 2010; Njyou et al., 2013). Secondary metabolites (polyphenols, flavonoids, limonoids, saponins, tanins, alkaloids, anthraquinones, flavonoids, reducing sugars, phlobatanins, etc.) are mostly cited as responsible for plant effects, despite the possible presence of polysaccharides in traditional preparations (decoctions, infusions and macerations) (Bickii et al., 2000; Stephen et al., 2009).

Plant cell walls are highly complex structures whose composition and physical properties vary depending on the cell type and plant species (Fry, 2011; Fangel et al., 2012). Nevertheless, all plant cell walls have similar basic structure: they consist of a fibrillar phase of cellulose microfibrils set in a matrix. This matrix is composed mostly of hemicelluloses and pectins (non-cellulosic cell wall polysaccharides) with a variety of different structures, structural proteins, glycoproteins and phenolic components (Fry, 2011). Hemicelluloses and pectins are important active components of plants which play crucial roles in plant growth, development and defense responses (Nguema-Ona et al., 2013). Non-cellulosic cell wall polysaccharides of higher plants represent a potential source of pharmacologically active polysaccharides (Xiaojuan et al., 2012; Ramar et al., 2014; Mediesse et al., 2014; Boudjeko et al., 2015).

According to Xie et al. (2015), there is an increasing interest of pharmaceutical sectors and researchers toward polysaccharides isolated from medicinal plants because of their biological activities including antioxidant (inhibition of lipid peroxidation, free radicals scavenging activities, protection of DNA from breaks induced by ROS), anti-inflammatory, anticancer activity (Xiaojuan et

al., 2012; Amit et al., 2014; Tabarsa et al., 2017) and stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) proliferation and INF $\gamma$  cytokines production (Boudjeko et al., 2015).

Moreover, most polysaccharides derived from higher plants are relatively non-toxic and do not cause significant side effects comparatively to immunomodulatory bacterial polysaccharides and synthetic compounds (Schepetkin and Quinn, 2006; Mediesse et al., 2014; Tabarsa et al., 2017).

The aim of present study was to explore free radical scavenging activities of total soluble pectic and hemicellulosic polysaccharides isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves. *Luminex* technique was performed to quantify the production of pro-inflammatory by PBMCs in the presence of polysaccharide fractions and/or absence of malaria antigen (MSP1) as stimuli. Furthermore, monosaccharide composition, proteins and polyphenols content were determined in each fraction.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Stem bark of *K. grandifoliola* C.D.C (Welw.) of the Meliaceae family and leaves of *C. sanguinolenta* (Lindl.) Schltr of the Periplocaceae family were harvested respectively in Mbalmayo and Ongot (Centre region, Cameroon). They were identified by M. Nana of the National Herbarium of Cameroon in comparison to the voucher specimens' N°52658 and N° 28247/SRF-Cam respectively for *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves. The plant materials were air dried for two weeks and crushed into small pieces (<1 mm).

### Extraction of soluble polysaccharides

Total soluble polysaccharides (TP) were extracted according to Boudjeko et al. (2015). *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves powder (30 g) were boiled with distilled water 20:1 (v/w) at 80°C for 3 h. The water extracts were filtered and centrifuged (3000 rpm for 30 min). The collected supernatant was treated with four volumes of ethanol 95% during 48 h at room temperature to obtain crude polysaccharides after centrifugation (3000 rpm, 30 min). The resulting crude polysaccharide was solubilized in distilled water, dialyzed against distilled water during 72 h and lyophilized.

### Extraction of cell wall polysaccharides

The cell wall was isolated according to the protocol described by Ray et al. (2004) with modifications. Plant powder (5 g) was boiled in 100 mL of 85% ethanol for 30 min. Thereafter, the mixture was centrifuged (4000 rpm, 30 min) and the pellet suspended into 100 mL of 90% dimethyl sulfoxide and homogenized for 24 h at room temperature. The mixture was centrifuged (4000 rpm, 15 min) and the residue was solubilized in 100 mL of methanol 50%, washed

\*Corresponding author. E-mail: boudjeko@yahoo.com. Tel: + (237) 675 34 17 54.



twice with acetone and dried at 40°C. The residue obtained represents the cell wall material (CWM).

To extract the pectic and hemicellulosic fractions, CWM (1 g) was extracted twice with boiled ammonium oxalate at 0.5% for 1 h, followed by incubation of the residue in 1 M KOH overnight at room temperature as described by Ray et al. (2004). All extracts were centrifuged and dialyzed against water. Alkaline extracts were acidified to pH 5 with acetic acid prior to dialysis.

#### Determination of protein content

The quantity of proteins present in each polysaccharide fraction was determined by the Bradford (1976) method using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard. Practically, each polysaccharide fraction (1 mL) was added to the same volume of freshly prepared Bradford reagent. The absorbance was measured at 595 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer after incubation for 30 min in the dark. The amount of proteins was expressed as µg BSA equivalent/mg DW).

#### Determination of phenolic compounds content

The phenolic compounds were quantified in the various polysaccharide fractions by the Folin-Ciocalteu methods (Singleton and Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagent (75 µL) was added to 750 µL of polysaccharide solutions (0.4 mg/mL). After 3 min, 750 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) were added, followed by incubation for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 760 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. Gallic acid was used as standard during the experiment and the amount of polyphenols expressed as µg Gallic acid equivalent (GAE)/mg DW).

#### Analysis of monosaccharide composition

Gas chromatography (GC) was used for identification and quantification of the monosaccharide units of soluble, pectic and hemicellulosic polysaccharide fractions of *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves as described by Ray et al. (2004). Neutral glycosyl composition of their alditol acetate and their trimethyl-silyl-glycoside derivatives respectively were determined (York et al., 1985). As references, the following standard monosaccharides were derivatized and analyzed accordingly: D-Mannose, D-ribose, L-rhamnose, D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, L-arabinose, D-fucose. Inositol (1 mg/mL) was used as internal standard.

#### In vitro antioxidant activities

##### Evaluation of 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free radical-scavenging activity

The free radical-scavenging activity of the polysaccharide fractions was measured in terms of their hydrogen donating or radical-scavenging ability using the DPPH radical (Katalinić et al., 2004). For the assay, 500 µL of the polysaccharide fraction at different concentrations (50-300 µg/mL) were introduced into test tubes and 500 µL of the freshly prepared solution of 400 µmol/L DPPH in methanol was then added. The mixture was incubated at 37°C for 30 min in the dark and the absorbance was measured at 517 nm using a UV-1605 Shimadzu spectrophotometer. Gallic acid and catechin were used as positive controls. A low absorbance of the reaction mixture indicated high free radical scavenging activity. The DPPH radical scavenging effect was calculated as "Inhibitory percentage" according to the following formula:

$$\text{Inhibitory percentage (\%)} = \left\{ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \right\}$$

Where, A<sub>0</sub> is the absorbance of the control reaction and A<sub>1</sub> is the absorbance in the presence of the sample.

##### 2,2-azino-bis-3-ethylbenzylthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) free radical scavenging assay

ABTS free radical-scavenging activity was evaluated according to Re et al. (1999). Briefly, 1 mL of ABTS reagent was added to 100 µL of polysaccharide fractions at different concentrations (50-300 µg/mL). The mixture was stirred and kept in the dark for 30 min. The absorbance was measured at 734 nm using UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. Gallic acid and catechin were used as positive controls. The ABTS radical-inhibitory percentage was calculated as above.

#### In vitro immunomodulatory activities

##### Isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Ethical clearance N°2015/03/568/CE/CNERSH/SP was obtained from the National Ethics Committee on Research and Human Health (Cameroon). Signed informed written consent was obtained from each enrolled person. The blood was collected from men and women between 23 and 35 years and diluted with 10 mL of incomplete Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium. Fifteen mL of this mixture was added to Ficollin 2/3-1/3 (v/v) and centrifuged at 10000 g for 25 min. PBMCs suspended in 4 ml of incomplete RPMI 1640 medium was washed and centrifuged at 8000 g. After separation, PBMCs was finally diluted in complete RPMI 1640 medium containing type AB human serum, Hepes, 200 mM L-glutamine and 50 mg/mL Gentamicin and counted with lazarrus (blue trypan).

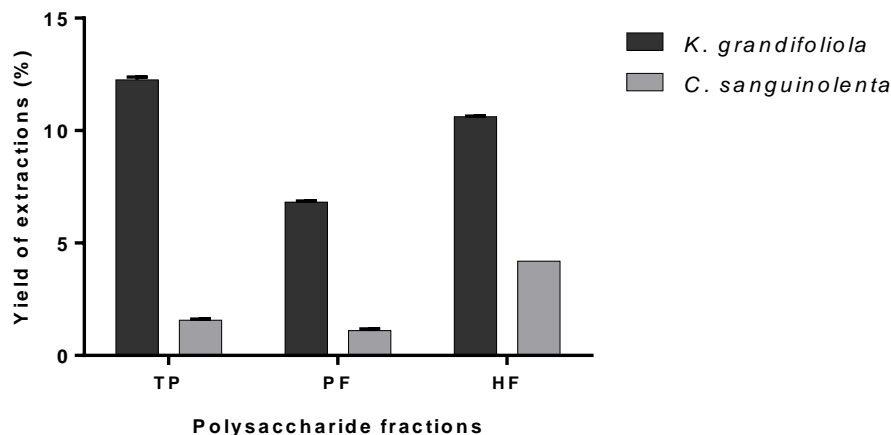
##### Cell proliferation assay

In this study the polysaccharide fractions were tested at 200 µg/mL concentration according to Boudjeko et al. (2015). However, the non-toxicity of polysaccharide fractions and the toxicity of the malaria antigen MSP1 used as positive control in the immunological assay on PBMCs viability were evaluated. Practically, 5×10<sup>5</sup> cells/well/500 µL were treated with 500 µL of polysaccharide fractions (200 µg/mL) or MSP1 (20 µg/mL) in 24 white well plates during 48 h at 37°C, 5% of CO<sub>2</sub> with 89% relative humidity. Non-treated cells represented the control. Centrifugation of well content (80 g; 5 min) was performed, followed by the suspension of the pellets in 1 mL of complete RPMI medium. Cells were counted using blue trypan and the cell viability was determined by the following formula:

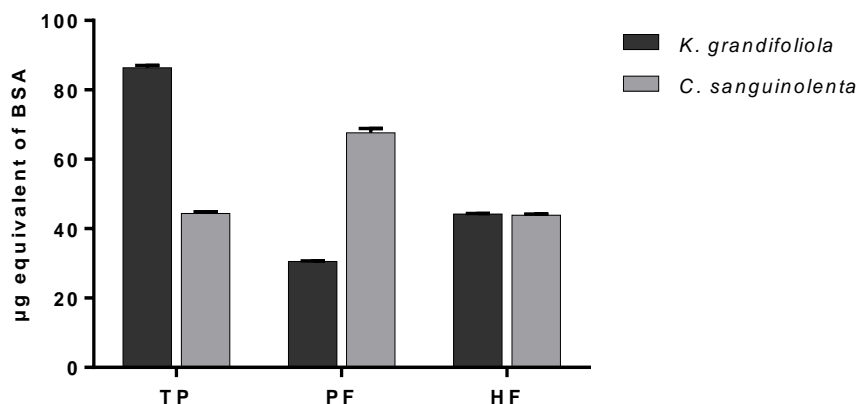
$$\text{Cell viability (\%)} = \left( \frac{\text{number of viable cells}}{\text{number of total cells}} \right) \times 100$$

##### Detection and quantification of pro-inflammatory cytokines

A treatment of 2×10<sup>5</sup> cells/well/100 µL with 100 µL of polysaccharide fractions at 200 µg/mL or MSP1 at 20 µg/mL was performed. The human PBMCs culture was incubated for 16 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> at 90% RH with different polysaccharide-enriched fractions and/or MSP1 and subjected to test of the production of pro-inflammatory cytokines. The treatment of cells with both polysaccharide fractions and MSP1 was performed to see the effect of these polysaccharides in the presence of an antigen. After incubation in the same conditions, the mixture was centrifuged. Supernatants were used for detection and quantification of IL1β, IL6 and TNFα pro-inflammatory cytokines



**Figure 1.** Yield of polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves.



**Figure 2.** Total proteins content in polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves.

levels using the Human Premixed Multi-Analyte kit. Experiments were performed in accordance with manufacturer's protocol (Luminex kit HCYTOMAG-60K-05). The plate was read with the *Luminex* 100 cytometer equipped with a *Luminex* MAGpix Analyzer.

#### Statistical analysis

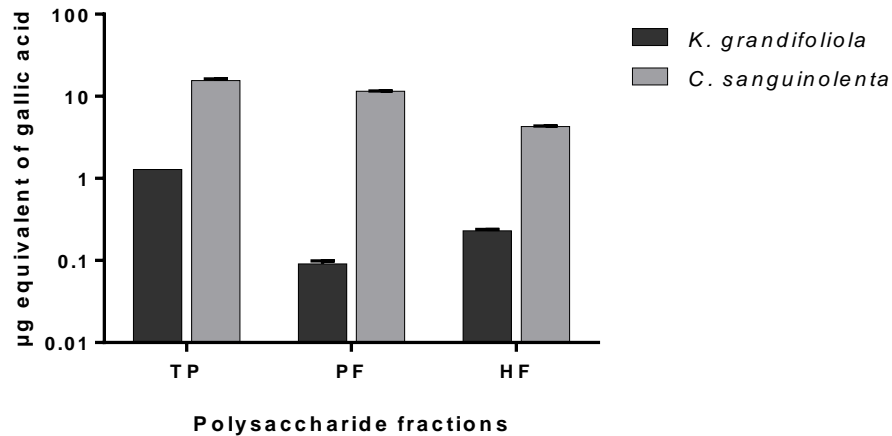
The experimental data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical differences between means were evaluated using the program SPSS for Windows, v. 19.0 (SPSS, Inc.). Differences with  $P < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

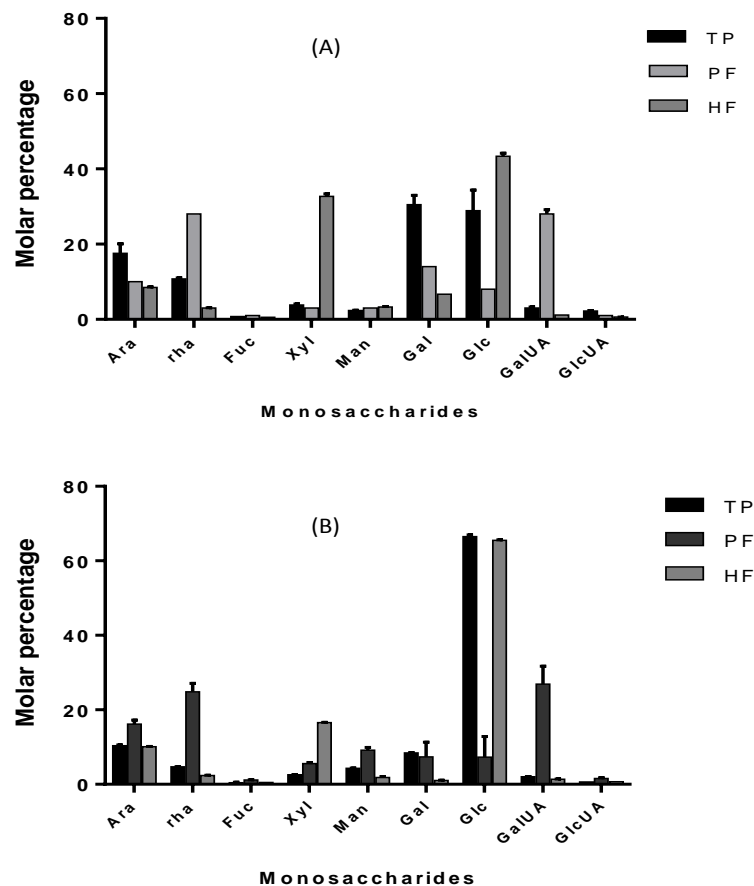
### Yield of polysaccharide fractions, total protein, total phenolic compounds and monosaccharides composition

Three fractions namely total soluble polysaccharides (TP), pectic fraction (PF) and hemicellulosic fraction (HF)

were obtained at different yields for *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves (Figure 1) in hot water, boiled ammonium oxalate at 0.5% and 1 M KOH. More material was extracted from the stem bark of *K. grandifoliola* than *C. sanguinolenta* sample. The partial characterization showed that all these polysaccharides are mostly linked to proteins and phenolic compounds in various proportions. However, PF of *C. sanguinolenta* and TP of *K. grandifoliola* present the highest contents in proteins with  $67.66 \pm 2.05$  and  $86.39 \pm 1.13$   $\mu\text{eqBSA}/\text{mg DW}$  respectively (Figure 2). Phenolic compounds are mostly abundant in PF and TP fractions of *C. sanguinolenta* leaves ( $11.56 \pm 0.00$  and  $15.53 \pm 1.34$   $\mu\text{g EGA}/\text{mg DW}$  respectively) (Figure 3). Monosaccharide composition analysis revealed that polysaccharide fractions of *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* are constituted of sugar monomers at different proportions. TP of *C. sanguinolenta* leaves was composed of Glu (60.51%), Ara (10.36%) and Gal (8.46%) suggesting an arabinoglucan while TP of *K.*



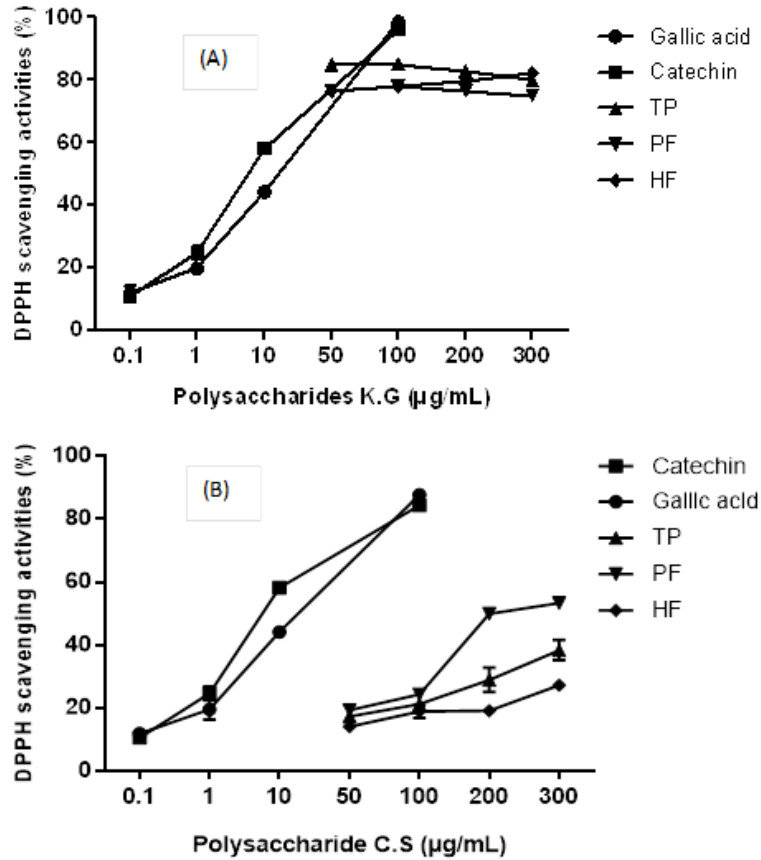
**Figure 3.** Phenolics content of polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves.



**Figure 4.** Molar percentages of sugar monomers present in polysaccharide fractions isolated from (A) *K. grandifoliola* stem bark and (B) *C. sanguinolenta* leaves. TP, Total soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction; Ara, arabinose; Rha, rhamnose; Fuc, fucose; Xyl, xylose; GalA, acide galacturonic acid; GlcA, glucuronic acid; Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose.

*grandifoliola* stem bark was constituted of Glu (30.53%), Gal (28.89%), Ara (17.57%) and Rha (10.74%) (Figure

4). Pectic Fractions of both plants would be a rhamnogalacturonan constituted of GalUA (28.88;



**Figure 5.** DPPH-free radical scavenging activity (%) of polysaccharide fractions isolated from (A) *K. grandifoliola* stem bark and (B) *C. sanguinolenta* leaves. TP, Total Soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction.

28.85%), Rha (24.83; 28.81%) and Ara (16.16; 10.29%) respectively for *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta*. HF of both plants would be a xyloglucan because they are mainly constituted of Glu, Xyl and Ara.

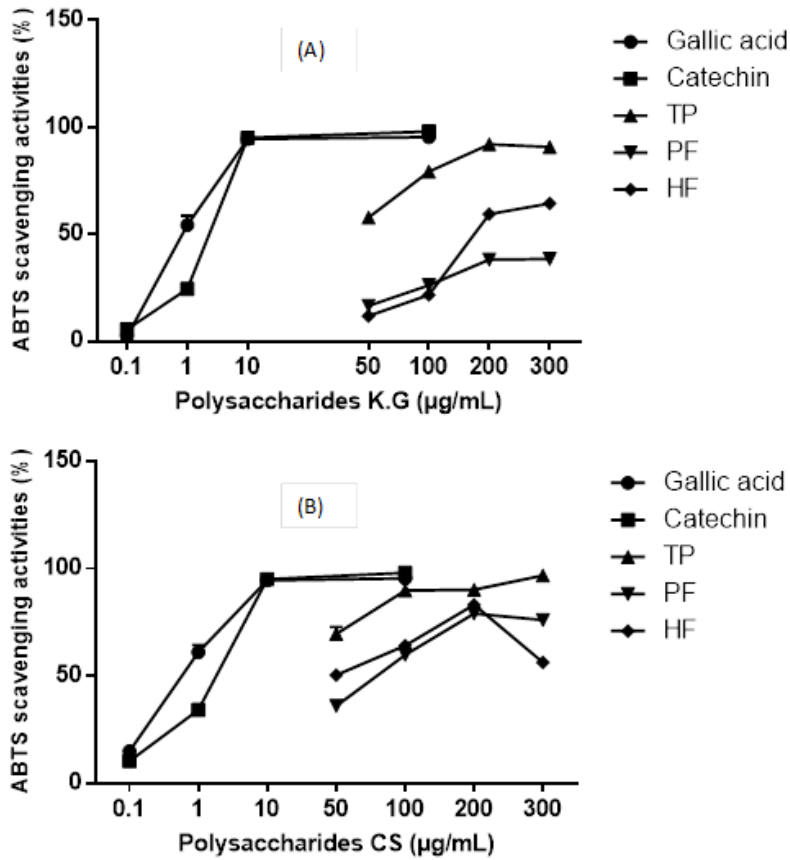
### DPPH and ABTS radical-scavenging activities

DPPH radical is an unwavering nitrogen-centered radical that has a characteristic absorption at 517 nm. Excellent DPPH scavenging activity confers superior antioxidant activity, and the mauve color of DPPH solution fades upon the scavenging capacity of the tested samples. As shown in Figure 5, all polysaccharide fractions scavenged DPPH in a concentration-dependent manner ranging from 50 to 200 µg/mL. Total soluble fraction of *K. grandifoliola* exhibited the remarkable antioxidant activity with 85.15±0.12% at 100 µg/mL (Figure 6A). Among the *C. sanguinolenta* polysaccharide fractions, PF showed the best scavenging activity at 300 µg/mL (53.41±1.36%) while HF presented the lowest scavenging activity (Figure 6B). However, TP of *C. sanguinolenta* presented the best ABTS radical scavenging activities with 96.86±0.77% and

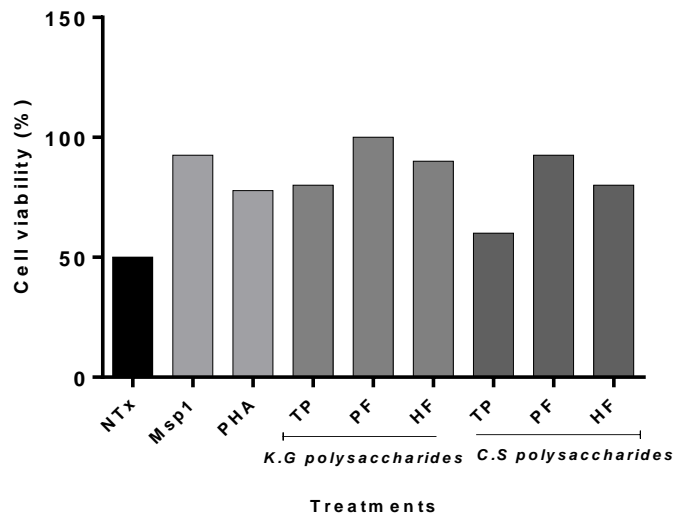
92.07±0.34% at 300 µg/mL for *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta* respectively.

### Immunomodulatory activities of polysaccharide fractions

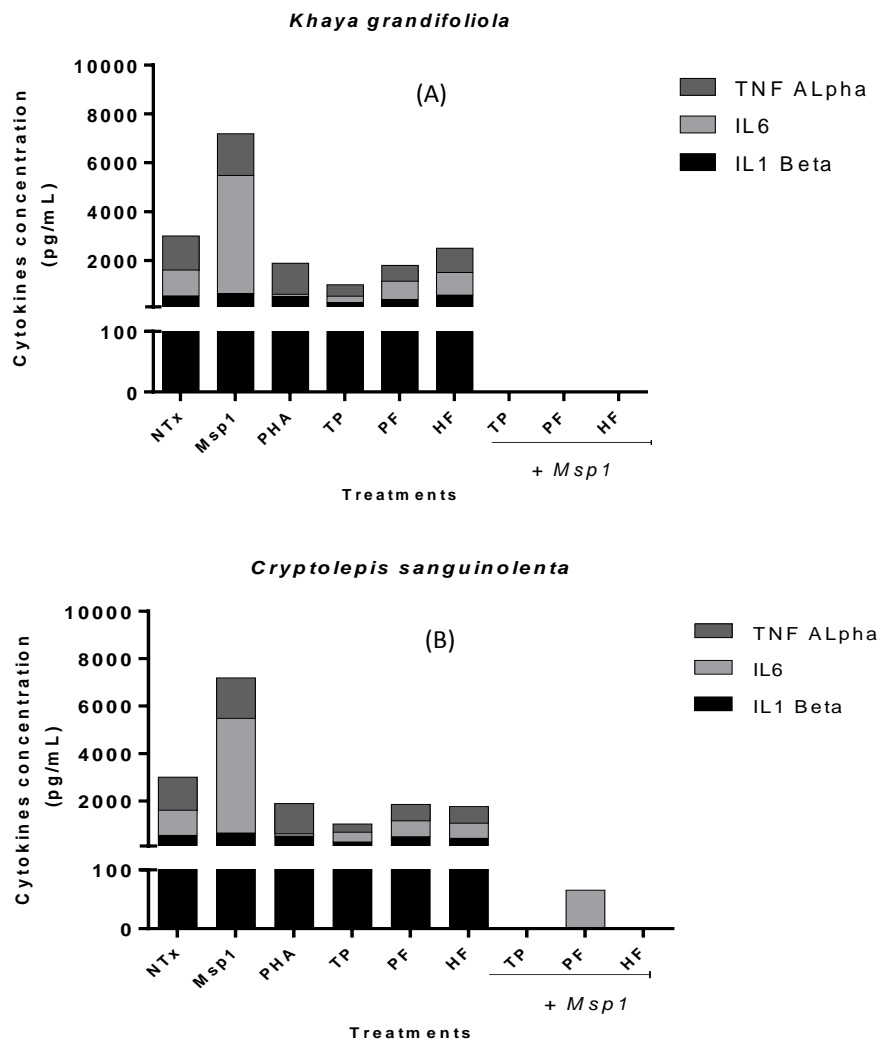
The treatment of PBMCs with polysaccharide fractions at 200 µg/mL increased significantly ( $P < 0.05$ ) their viability comparatively to untreated PBMCs (NTx). But, the best cell viability percentages were observed with PF of *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta* treated PBMCs respectively (90-100%). The same observation has been done on PBMCs treated with a malaria antigen (MSP1) (Figure 7). The evaluation of production of proinflammatory cytokines by *Luminex* technique in the presence of one mitogen (PHA) and malaria antigen (MSP1) showed that PBMCs produced more cytokines in presence of malaria antigen than mitogen PHA ( $P < 0.05$ ) (Figure 8). Moreover, any cytokines production was detectable in PBMCs treated by both MSP1 and fraction polysaccharides. Furthermore, the immunomodulatory activity showed that polysaccharide fractions inhibited a



**Figure 6.** ABTS-free radical scavenging activity (%) of polysaccharide fractions isolated from (A) *K. grandifoliola* stem bark and (B) *C. sanguinolenta* leaves. TP, Total Soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction.



**Figure 7.** Cell viability percentages of PBMCs cells non-treated and treated with MSP1, PHA and polysaccharide fractions from *K. grandifoliola* Stem bark (K.G) and *C. sanguinolenta* leaves C.S TP, total soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction; NTx = PBMCs untreated; PHA = PBMCs treated with phytohemagglutinine A; MSP1, PBMCs treated with Merozoit Surface Protein (20 µg/mL).



**Figure 8.** Production of Pro-inflammatory cytokines IL1Beta, IL6 by PMBCs non treated and treated with PHA, MSP1, polysaccharide fractions from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves. TP, total soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction; NTx = PMBCs untreated; PHA = PMBCs treated with phytohemagglutinine A; MSP1, PMBCs treated with Merozoit Surface Protein (20 µg/mL).

significant overproduction of pro-inflammatory cytokines (IL1 β, IL 6 and TNF α) by PBMCs, as compared to the untreated cells in the presence of MSP1. TP and HF showed the best immunomodulatory activity in the presence of MSP1.

## DISCUSSION

Polysaccharides are present in plants, animals and microorganisms in conjugation with proteins and phenolic compounds. During the extraction process of polysaccharides, proteins and phenolic compounds are also obtained in various concentrations. According to

Chen et al. (2008), the bioactivity of polysaccharides depends primarily on their chemical environment and their combination with other compounds such as proteins, polyphenols and lipids. Phenolic compounds are known showed that TP of both plant species demonstrated the best antioxidant potential on DPPH and ABTS radical. PBMCs proliferation was significantly increased by all the polysaccharide fractions and the proinflammatory cytokines production significantly decreased particularly by all polysaccharide fractions in presence of MSP1 as antigen stimuli for PBMCs. These results suggest that polysaccharides from *K. Grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves are potential antioxidant and immunostimulating agents for functional foods or

medicine. All these properties justify the use of these two plants in traditional medicine and encourage the study of polysaccharide by researchers in the pharmaceutical industry. However, further investigation of structural identification is required.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate the institutional and material support from the Biotechnology Centre of the University of Yaounde 1. The study was partially supported by Third World Academy of Sciences (TWAS). Special thanks to Nguema-Ona Eric for the excellent technical assistance offered.

## REFERENCES

- Aboughe-Angone S, Nguema-Ona E, Ghosh P, Lerouge P, Ishii T, Ray B, Driouich A (2008). Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: Structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 343:67-72.
- Adeyemi AA, Gbilade AA (2006). Antianaemic activity of *Spondias mombin* and *Khaya grandifoliola* aqueous extracts on rats. *J. Pharm. Bioresour.* 3:94-97.
- Amit G, Pallavi RK, Sushama C (2014). Applications and uses of active ingredients from medicinal plants. *Indian J. Nov. Drug. Deliv.* 6:106-111.
- Bickii J, Njifutie N, Ayafor JF, Basco LK, Ringwald P (2000). *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69:27-33.
- Boudjeko T, Megnekou R, Woguia AL, Mediesse KF, Kanemoto WEJ, Nounga TCD, Koum O (2015). Antioxidant and immunomodulatory properties of cell wall polysaccharides isolated from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L) King and H.E. Robins leaves. *BMC Res. Notes* 8:759.
- Chen H, Zhang M, Qu Z, Xie B (2008). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). *Food Chem.* 106:559-563.
- Fangel JU, Ulvskov P, Knox JP, Mikkelsen MD, Harholt J, Popper A, Willats WGT (2012). Cell wall evolution and diversity. *Front. Plant Sci.* 3(152):1-8.
- Fry SC (2011). Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Ann. Plant Rev.* 41:1-42.
- He X, Shu J, Xu L, Lu C, Lu A (2011). Inhibitory Effect of *Astragalus* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF  $\alpha$  and IL-1  $\beta$  production in THP-1 Cells. *Molecules* 17:3155-3164.
- Katalinić V, Milos M, Modum D, Musi I, Boban M (2004). Antioxydant effectiveness of selected wines in comparison with (+)- catéchine. *Food Chem.* 86:593-600.
- Kilani-Jaziri S, Mokdad-Bzeouich I, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2017). Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and *p*-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study. *Drug Chem. Toxicol.* 4(40):416-424.
- Lan MB, Zhang YH, Zheng Y, Yuan HH, Zhao HL, Gao F (2010). Antioxidant and Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from Moxa (*Artemisia argyi*) Leaf. *Food Sci. Biotechnol.* 19(6):1463-1469.
- Li Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J., Yuan C, Hao Z, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ, Mohnen D. (2013). An arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *The Plant Cell* 25:270-287.
- Liochev SI (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Rad. Biol. Med.* 60:1-4.
- Mediesse KF, Woguia AL, Fogue SP, Atogho TB, Simo G, Boudjeko T (2014). Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Coast Life Med.* 2:962-969.
- Nguema-Ona E, Moore JP, Fagerström AD, Fangel JU, Willats WGT, Hugo A, Vivier MA (2013). Overexpression of the grapevine PGIP1 in tobacco results in compositional changes in the leaf arabinoxyloglucan network in the absence of fungal infection. *BMC Plant Biol.* 13:46.
- Njyou FN, Aboudi ECE, Tandjang MK, Tchana AK, Ngadjui BT, Moundipa PF (2013). "Hepatoprotective and antioxidant activities of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC and *Entada africana* Guill. et Perr.,". *J. Nat. Prod.* 6:73-80.
- Olajide OA, Ajayi AM, Wright CW (2009). Anti-inflammatory properties of cryptolepine. *Phytother. Res.* 10:1421-1425.
- Pham-Huy LA, He Hua, Pham-Huy C (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4:89-96.
- Ray B, Loutier-Bourhis C, Condamine E, Driouich A, Lerouge P (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterization of novel xyloglucan motif. *Carbohydr Res.* 339:201-208.
- Re R, Pellegrini AA, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolonization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Schepetkin IA, Quinn MT (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6:317-333.
- Stephen UA, Abiodun F, Osahon OE (2009). Phytochemicals analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* stem bark. *J. Biol. Sci.* 9(1):63-67.
- Tabarsa M, You SG, Dabaghian EH, Surayot U (2017). Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. *J. Food Drug Anal.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.016>.
- Xiaojuan H, Xuyan N, Jian L, Shaohua X, Aiping L (2012). Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides: A Review. *J. Experimen. Integr. Med.* 2:15-27.
- Xie JH, Jin ML, Morris GA, Zha XQ, Chen HQ, Yi Y, Li JE, Wang ZJ, Gao J, Nie SP, Peng S, Xie MY (2015). Advances on Bioactive polysaccharides from medicinal plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56(sup1):S60-84
- You L, Gao Q, Feng M, Yang B, Ren J, Gu L, Cui C, Zhao M (2013). Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities. *Food Chem.* 4(138):2242-2249.



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory response by polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr and *Cymbopogon citratus* Stapf leaves in raw 264.7 macrophages and U87 glioblastoma cells

Francine Kengne Mediesse<sup>1</sup>, Thaddée Boudjeko<sup>1,3\*</sup>, Anantharaju Hasitha<sup>2</sup>, Matharasala Gangadhar<sup>2</sup>, Wilfred Fon Mbacham<sup>3,4</sup> and Perumal Yogeeswari<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cymbopogon citratus* (Stapf) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr leaves are used in Cameroonian traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases. Several studies have been performed on the biological activities of secondary metabolites extracted from these plants. However, to the best of our knowledge, the anti-neuro inflammatory and protective roles of the polysaccharides of these three plants have not yet been elucidated. This study aimed at investigating potential use of *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharides in the prevention of chronic inflammation.

**Methods:** Firstly, the composition of polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark (KGF), *C. sanguinolenta* (CSF) and *C. citratus* (CCF) leaves was assessed. Secondly, the cytotoxicity was evaluated on Raw 264.7 macrophages and U87-MG glioblastoma cell lines by the MTT assay. This was followed by the in vitro evaluation of the ability of KGF, CSF and CCF to inhibit lipopolysaccharides (LPS) induced overproduction of various pro-inflammatory mediators (NO, ROS and IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, NF- $\kappa$ B cytokines). This was done in Raw 264.7 and U87-MG cells. Finally, the in vitro protective effect of KGF, CSF and CCF against LPS-induced toxicity in the U87-MG cells was evaluated.

**Results:** CCF was shown to mostly contain sugar and no polyphenol while KGF and CSP contained very few amounts of these metabolites ( $\leq 2\%$ ). The three polysaccharide fractions were non-toxic up to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . All the polysaccharides at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inhibited NO production, but only KGF and CCF at 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  down-regulated LPS-induced ROS overproduction. Finally, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS reduced 50% of U87 cell viability, and pre-treatment with the three polysaccharides significantly increased the proliferation.

(Continued on next page)

\* Correspondence: [boudjeko@yahoo.com](mailto:boudjeko@yahoo.com)

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Valorisation of Plant Resources, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 3851, Messa-Yaounde, Yaounde, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



(Continued from previous page)

**Conclusion:** These results suggest that the polysaccharides of *K. grandifoliola*, *C. citratus* and *C. sanguinolenta* could be beneficial in preventing/treating neurodegenerative diseases in which neuroinflammation is part of the pathophysiology.

**Keywords:** Plant polysaccharide, *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *Cymbopogon citratus*, Lipopolysaccharides, Anti-neuroinflammatory

## Background

Lipopolysaccharides (LPS) derived from gram-negative bacteria are considered to be the most potent activators of the production of various inflammatory mediators such as pro and anti-inflammatory cytokines, nitric oxide (NO) by macrophages [1–3]. LPS excreted during bacterial infection cause chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration [4, 5], therefore their stimulation is a good model for mimicking neuroinflammatory conditions [6]. Abrogation of the inflammatory mediator's production may be the potential target(s) for neuroinflammatory therapeutics.

Children under the age of five affected by malaria are at risk of developing complications including severe anaemia and cerebral malaria (CM). CM occurs in non-immunized individuals and those with failure of standard antimalarial treatment [7]. It is mostly characterized by hyper-parasitemia, excessive production of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12 etc....) followed by up-regulation of endothelial cell adhesion molecule expression, which contribute to the sequestration of parasitized erythrocytes in the brain microvasculature [8]. This sequestration reduces the microvascular flow, thereby causing disruption of blood brain barrier (BBB), cerebral oedema and tissue hypoxia. Increasing evidence suggests that oxidative damage to cell components has a relevant pathophysiological role in several types of human diseases, including malaria. The inflammation of the brain may also contribute to a wide variety of neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Multiples Sclerosis and psychiatric diseases [9, 10]. A lot of anti-inflammatory drugs are commercialised but due to their potential secondary effects (teratogenic, mutagenic, cancerigenic, gastric, metabolic, endocrinal, neuronal disorders), it is necessary to discover and develop much safer and new bioactive compounds [11].

According to Xie et al. [12], there is an increasing interest of pharmaceutical sectors and researchers in polysaccharides isolated from medicinal plants because of their biological activities that are antioxidant (inhibition of lipid peroxidation, free radicals scavenging activities, protection of DNA from breaks induced by ROS), anti-inflammatory, anticancer [13–15], as well as the stimulation of PBMC proliferation and INF $\gamma$  cytokine production [16, 17]. Moreover, most polysaccharides derived from higher plants are relatively non-toxic and do not cause significant side effects

as compared to immunomodulatory bacterial polysaccharides and synthetic compounds [18].

*Khaya grandifoliola* (Meliaceae family), *Cryptolepis sanguinolenta* (Periplocaceae family) and *Cymbopogon citratus* (Poaceae family) are three medicinal plants found in Cameroon and many African countries. Decoctions from *K. grandifoliola* stem bark and root, *C. sanguinolenta* leaves and of *C. citratus* leaves are used in the treatment of malaria and other infectious diseases that provoke fever, pain and inflammation [19–21]. Numerous studies have been conducted in order to justify the folkloric use of these plants in the treatment of inflammatory diseases [11, 21–23]. The present work aimed at exploring the anti-neuroinflammatory (down-regulation of NO, ROS and various pro-inflammatory cytokines) of polysaccharide fractions isolated from these plants of interest. In vitro system experiment was performed using various spectrophotometry, cell biology and molecular biology techniques including: MTT assay, Griess reactions and DCFH-DA assay, and Quantitative Real Time PCR.

## Methods

### Materials

The stem barks of *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Welw) (Meliaceae family), leaves of *Cymbopogon citratus* Stapf (Poaceae family) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr (Periplocaceae family) were collected from Mbalmayo forest, Emana and Ongot respectively, in the Centre Region of Cameroon. The plant species were identified and authenticated by Mr. Nana of the National Herbarium of Cameroon, Yaounde (Cameroon), (Voucher specimen no: 52658/SFR-Cam, N°14,243/HNC and 28,247/SRF-Cam respectively for *K. grandifoliola* stem bark, *C. citratus* and *C. sanguinolenta* leaves).

### Polysaccharide fraction preparation

The stem bark of *K. grandifoliola*, leaves of *C. citratus* and *C. sanguinolenta* were collected, shade-dried for one week at room temperature and powdered. Extraction of low molecular weight (LMW) polysaccharide fractions was performed as described by Thangam et al. [23] with slight modifications. Briefly, for the de-coloration and de-fatting process, 200 g of each powder was soaked in 60% methanol for 48 h in a shaker at 200 rpm. The resulting materials were boiled twice in 1 L of distilled water at 80 °C for 2 h and the

supernatants were pooled and precipitated overnight at 4 °C with 95° ethanol (1:2 (v/v)). The polysaccharides were collected by centrifugation, then dissolved in water and dialyzed against distilled water at room temperature. Each dialysate was then mixed with 4:1 (v/v) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ButOH solvent system and stirred for 15 min. After centrifugation, the upper polysaccharide solution was collected and deproteinized twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ButOH solvent until there were no proteins left. The absence of proteins in each fraction was confirmed by the Bradford (1976) [24] method. The deproteinized polysaccharide solutions were then subjected to lyophilization and LMW polysaccharide fractions were obtained and were named KGE, CSF and CCF for *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* respectively.

#### Quantification of total sugar and phenolic compounds

Total sugars were determined using phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as described by Dubois et al. [25], where neutral monosaccharides were heated in acid medium and transformed into dehydrated derivatives of furfural. Practically, 0.2 mL of sample were mixed with 0.2 mL of 5% phenol. Then, 1 mL of concentrated sulfuric acid was added quickly and stirred. The mixture was placed at 100 °C for 10 min until it developed a yellow colour. The absorbance was read at 485 nm. The amount and level of sugar present were calculated using glucose as standard and expressed as µg equivalent of glucose (GE) per mg of dry polysaccharides.

Phenolic compounds were estimated by the Folin-Ciocalteu method [15]. Briefly, 750 µL of extract solution (0.3 mg/mL) of polysaccharide fractions were added to 75 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min, 750 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) were added. The absorbance was measured at 760 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer after 30 min in the dark. Phenolic compound amounts were calculated using ferulic acid as standard and expressed as µg equivalent of ferulic acid equivalent (FAE)/mg of dry polysaccharide.

#### Toxicity of polysaccharide fractions on raw 264.7 macrophages and U87-MG cell lines

RAW 264.7 cells, the murine macrophage cell line and the U87-MG human glioblastoma cell line were obtained from the National Centre for Cell Science (NCCS) Pune, India. RAW 264.7 cells and U87-MG cells were cultured respectively in RPMI 1640 medium and Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), L-Glutamine (200 mM), streptomycin (200 µg/ml) and penicillin (200 U/ml) and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The assay was carried out on cells with 70% confluence. The cell viability was tested using Trypan Blue dye and at least 95% of viability was confirmed to carry out the assay.

RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^5$ ) were treated with 10 µg/mL LPS with or without different concentrations of

polysaccharide fractions (100–1000 µg/mL) for 24 h (polysaccharide samples were added 1 h before LPS). Non-treated cells were utilized as negative controls and cells treated with LPS alone were utilized as positive controls. Aspirin, a non-steroid anti-inflammatory compound (previously shown to be non-toxic for Raw 264.7 cells), was used 1 µM as positive control. After treatment, the cell culture supernatants were collected for nitrite assay and plated cells used for cell proliferation assessment by MTT assay.

Otherwise, U87-MG ( $5 \times 10^3$ ) cells were treated with different concentrations of polysaccharide fractions (100–1000 µg/mL) for 48 h and the cell proliferation was evaluated by MTT assay.

#### Cell proliferation assay

Proliferation of cells after treatment was determined by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) colorimetric assay [26]. After incubation, the medium was discarded, MTT (0.5 mg/mL in PBS 1X) was added to the treated cells and the plate was incubated for an additional 4 h. The medium was discarded once more and Formazan Blue, which was formed in the cells, was dissolved with 100 µL of Dimethylsulphoxide (DMSO). The optical density (OD) was measured at 590 nm against a background at 620 nm using a microplate reader (Molecular Device Spectra M4, USA). The cell viability was determined as  $(\text{Mean A1}_{(590-620\text{nm})} / \text{Mean A0}_{(590-620\text{nm})}) * 100$  where A0 and A1 are respectively the absorbance in untreated and treated wells. The toxicity or growth inhibitory percentage of polysaccharide fractions were determined by the formula:  $1 - [(\text{Mean A1}_{(590-620\text{nm})} / \text{Mean A0}_{(590-620\text{nm})}) * 100]$ .

#### In vitro evaluation of inhibitory effect of LPS-induced brain toxicity

An U87-MG glioblastoma cell line was used in this assay to mimic in vitro brain toxicity. For optimization of LPS dose, U87 cells were treated with LPS (1-200 µg/mL) and growth inhibitory percentage determined by MTT assay as previously described. The inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) value was calculated using GraphPad Prism 6.01. The protective effect of polysaccharide fractions at non-toxic concentrations (12.5–100 µg/mL) on U87-MG was assessed by their co-incubation with LPS (100 µg/mL) for 48 h (polysaccharide samples were added 1 h before LPS). Diclofenac potassium at 50 µg/mL (previously shown to be non-toxic for U87-MG cells) was used as positive control. The medium was changed after 48 h and 100 µL of MTT (0.5 mg/ml stock solution) were added and the plates incubated for an additional 4 h. The medium was once more discarded and the Formazan Blue insoluble crystal, which was formed in the cells, was dissolved with 100 µL of DMSO. The OD was measured at 590 nm against a

background at 620 nm. The protective effect of KGF, CSF and CCF was evaluated using GraphPad Prism 6.01.

#### Nitrite assay

After treatment of RAW 264.7 cells with/without non-toxic concentrations of polysaccharide fractions and LPS, cell culture supernatant was used to quantify the NO secretion by the measurement of nitrite concentration in the supernatants using the Griess reaction [27]. Each culture supernatant was mixed with the same volume of Griess reagent 1X and the absorbance of the mixture at 540 nm was determined with a microplate reader (Molecular Device Spectra M4, USA). Fresh RPMI culture medium was used as the blank and the amount of nitrite in the samples was measured with the sodium nitrite serial dilution standard curve.

#### Intracellular reactive oxygen species (iROS) estimation

Intracellular ROS estimation was measured using DCFH-DA [28]. Approximately  $5 \times 10^3$  U87-MG cells/well were plated on 96-well plates and treated with various polysaccharide fractions and/or LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h. Then, the plates were washed with PBS 1X cells were treated with 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA for 1 h. The loading buffer was removed and the plates washed. New PBS 1X was added into each well and oxidized DCFH excitation and emission were measured at 485 and 525 nm respectively in a spectrophotometer (SpectraMax M4, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Diclofenac potassium at non-toxic concentration on U87-MG was used as positive control. Percentage ROS production inhibition was computed using Graph Pad prism 6.01.

#### In vitro evaluation of inhibitory effect of LPS-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines

About  $10^5$  U87-MG cells/well/2 mL in 96 well plates were treated with polysaccharide fractions for 1 h followed by 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS for 48 h. After incubation, cells were washed with 500  $\mu\text{L}$  of PBS 1X, and total RNA was extracted from the untreated cells and from the LPS and/or polysaccharide fraction treated cells using RNA Xpress reagent according to the manufacturer's protocol. RNA was then quantified with Nanodrop and purity of RNA was determined with  $A_{260}/A_{280}$  ratio (1.8–2.0 was considered pure). RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse-transcribed using a cDNA synthesis kit. Quantitative Real Time PCR was performed on reversed-transcribed cDNA products for determination of TNF- $\alpha$ , IL6, IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa\text{B}$  expression according to the manufacturer's instructions using a BIO-RAD CFX Connect, with SYBR Green (Kapa Biosystems) as the fluorescent dye, enabling real-time detection of PCR products. Sense and antisense PCR primers used in this study were purchased from Sigma Genosis, India (Table 1). All samples were run in triplicates and the output values

reported were the average of three wells. The amplification consisted of denaturation at 95 °C for 25 s, primer annealing at 58–64 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, for a total of 37 cycles followed by final extension at 72 °C for 10 min. For quantification, the target gene was normalized to the internal standard GAPDH gene.

#### Statistical analysis

Results were expressed as the means  $\pm$  SEM. Multi group comparison was performed by one-way analysis of variance, followed by the Dunnet's multiple comparisons as a post hoc analysis test for comparison between polysaccharide treatment and positive control, non-treated or LPS group at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ . Calculations were performed using GraphPad InStat® version 6.01 software.  $\text{IC}_{50}$  was analyzed using non-linear regression.

## Results

### Partial composition and in vitro toxicity of polysaccharide fractions

After the extraction procedure that included deproteinization, carbohydrates were the major components in the polysaccharide fractions. *C. citratus* polysaccharide presents the highest level of sugar ( $629.78 \pm 1.4$   $\mu\text{g}$  GE/mg of dry polysaccharide) and no polyphenols. However, small amount of polyphenols were found in KGF and CSF polysaccharides (less than 2%) (Table 2). Therefore, the potential of these polysaccharide fractions could be related only to their carbohydrate content.

In order to assess the effects of all the three polysaccharide fractions on the viability of RAW 264.7 and U87-MG cells, the cells were treated with the indicated concentrations of KGF, CSF and CCF in the presence or absence of LPS and cell viability analysed by MTT assay. The results were shown in Fig. 1. The viability of RAW 264.7 cells was not significantly altered after 24 h of incubation with up to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of polysaccharide fractions (Fig. 1) and the data revealed noticeable toxicity on U87 MG for all the fractions tested with less than 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 h ( $p < 0.001$ ). Up to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , all the polysaccharide fractions significantly altered the two cells viability in a dose-dependent manner and cell viability decreased with increasing concentration. A growth inhibitory concentration of 80% was observed at 1 mg/mL. The results of the  $\text{IC}_{50}$  concentrations for RAW 264.7 and U87-MG cells with respect to all the three fractions are shown in Table 3. Therefore, in subsequent experiments, the concentrations of polysaccharide fractions used were 10 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### Effect of KGF, CSF and CCF in LPS induced anti-proliferation in the U87-MG cell lines

The protective effect of KGF, CSF and CCF over LPS induced toxicity was evaluated through MTT assay. The protective effect of polysaccharide fractions is their ability to



**Table 1** Details of primer sequences (Sigma Genosys) used for inflammatory mediators gene expression through RT-PCR amplification

Genes	Oligoname	Oligonucleotide sequence 5'.....3'	Length	Anneal T°
IL6	Human-IL6-FP	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	20	61.8 °C
	Human-IL6-RP	GAGGTGAGTGGCTGTCTGTG	20	
TNFα	Human-TNFalpha-FP	CTCCAGGCGGTGCCTTGTTC	20	60.4 °C
	H-TNFalpha-RP	CAGGCAGAAGAGCGTGGTG	19	
IL1β	Human-IL1beta-FP	GCAAGGGCTTCAGGCAGGCCGG	23	64 °C
	Human-IL1beta-RP	GGTCATTCTCCTGGAAGTCTGTGGGC	27	
NF-kB	Human-Nf-kB-FP	GCGCTTCTGCCTTCCTTA	20	58 °C
	Human-Nf-kB-RP	TCTTCAGTTTGTATGCCCCC	20	
GAPDH	Human-GAPDH-FP	ACCACAGTCCATGCCATCAC	20	60.4 °C
	Human-GAPDH-RP	TCCACCACCTGTGTGCTGT	19	

inhibit LPS toxicity and increase U87-MG cell proliferation. The IC<sub>50</sub> for LPS in the U87-MG was found to be 100 µg/mL. LPS (100 µg/mL) treatment significantly decreased cell viability from 100 to 52.3 ± 3.1% but polysaccharides co-treatment increased the U87-MG proliferation and viability (*p* < 0.001). According to the concentrations of the test fractions, KGF and CCF were most active at 12.5 µg/mL (cell viability up to 83.3 ± 0.2 and 72.9 ± 0.8% respectively) (Fig. 2). The protective effect of CSF was observed at 50 µg/mL (cell viability up to 65.21 ± 0.72%). However, no dose-dependent linear effect was observed. Compared to polysaccharides, diclofenac potassium at 50 µg/mL was non-toxic on U87-MG cells (4.8 ± 0.8% of growth inhibitory percentage) and presented the best protective effect (cell viability up to 99.97 ± 0.03%) (*p* < 0.001).

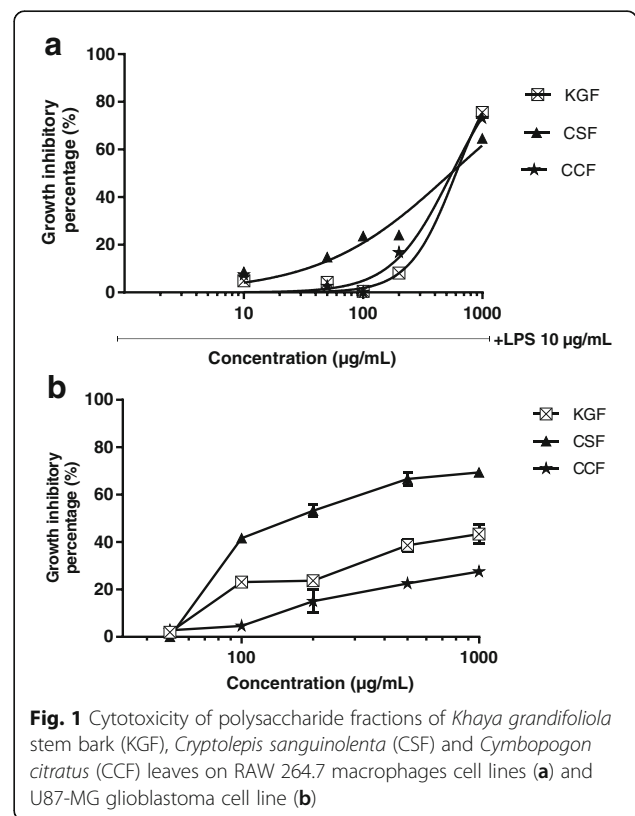
**Effect of KGF, CSF and CCF on NO and ROS secretion**

To investigate whether polysaccharide fractions regulate NO production, RAW 264.7 cells were pretreated with KGF, CSF and CCF for 1 h before treatment with LPS for 24 h, and nitrite content, a stable end product of NO was measured using Griess reaction. Treatment with LPS resulted in significant up-regulation of nitrite production (7.05 ± 0.09 µM), compared to the untreated control (3.5 ± 0.3 µM) (Fig. 3). However, RAW 264.7 cells pretreated with all the polysaccharide fractions at 100 µg/mL displayed a marked decrease in the induction

of nitrite after stimulation with LPS (*p* < 0.001). The nitrite production were respectively 2.56 ± 0.25; 3.02 ± 0.09 and 2.8 ± 0.16 µM for KGF, CSF and CCF treated cells at 100 µg/mL. The growth inhibitory percentage of Aspirin at 1 µM (180 µg/mL) on Raw 264.7 cells was 0.98 ± 0.28%. At this concentration, Aspirin-treated cells produced 2.46 ± 0.1 µM of nitrite. On the other hand, estimation of intracellular ROS was performed using DCFH-DA. The U87-MG cell treated with 10 µg/mL of LPS showed increased DCF fluorescence levels

**Table 2** Total sugar and polyphenols content of polysaccharides fractions of *Khaya grandifoliola* stem bark (KGF), *Cryptolepis sanguinolenta* (CSF) and *Cymbopogon citratus* (CCF) leaves by Phenol-sulfuric and Folin-Ciocalteu methods (mean ± SEM; n = 3)

Polysaccharide fractions	Total sugar content (µg GE/mg)	Total polyphenol (µg FAE/mg)
KGF	450.09 ± 0.33	17.76 ± 0.15
CSF	437.19 ± 0.53	15.54 ± 0.5
CCF	629.78 ± 1.39	0

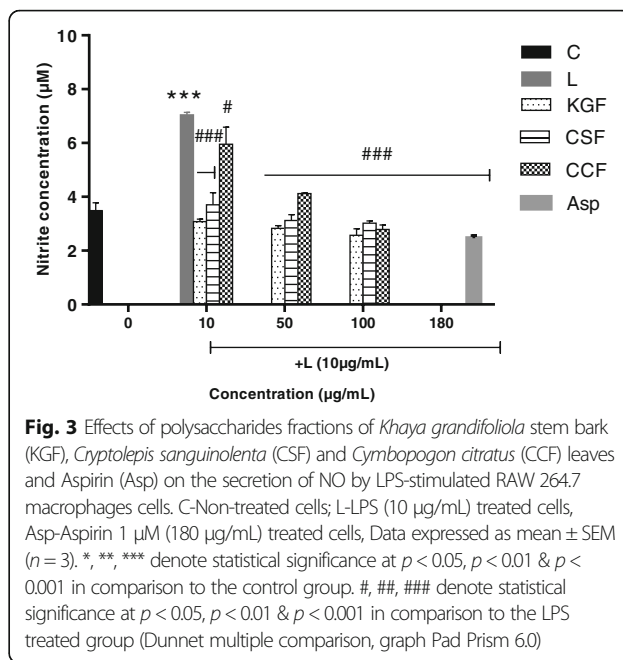
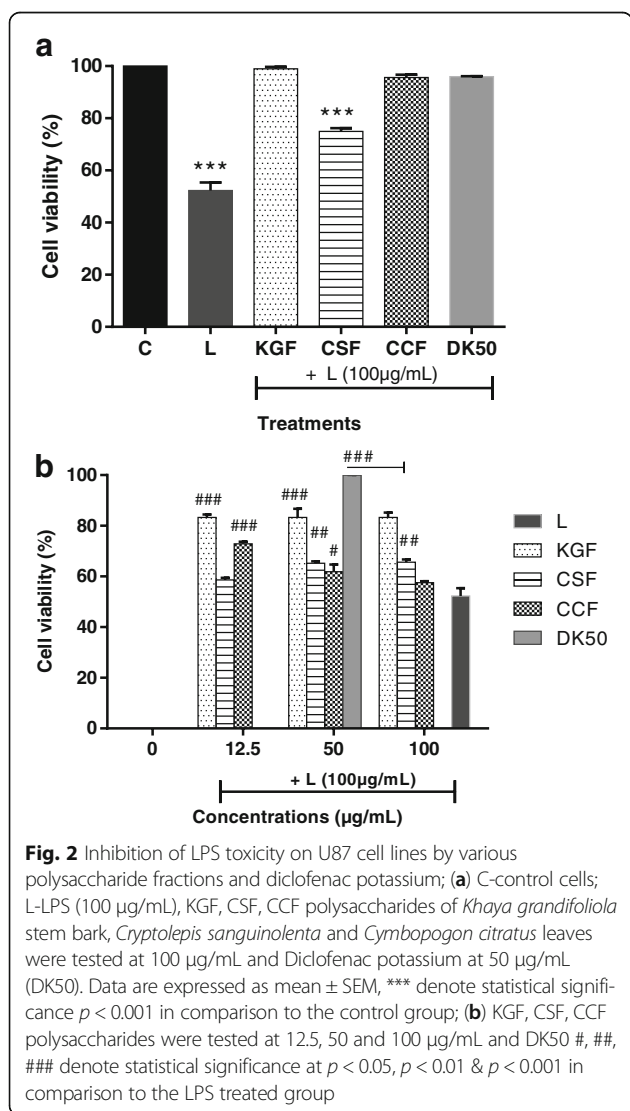


**Fig. 1** Cytotoxicity of polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* stem bark (KGF), *Cryptolepis sanguinolenta* (CSF) and *Cymbopogon citratus* (CCF) leaves on RAW 264.7 macrophages cell lines (a) and U87-MG glioblastoma cell line (b)

**Table 3** Inhibitory concentration 50 for Raw 264.7 Macrophages and U87-MG Glioblastoma cells line with respect to polysaccharide fractions of *K. grandifoliola* stem bark, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* leaves

Polysaccharide fractions	IC50 (µg/mL) for Raw 264.7 cells	IC50 (µg/mL) for U87-MG
KGF	600.9	>1000
CSF	545	243.7
CCF	554.1	>1000

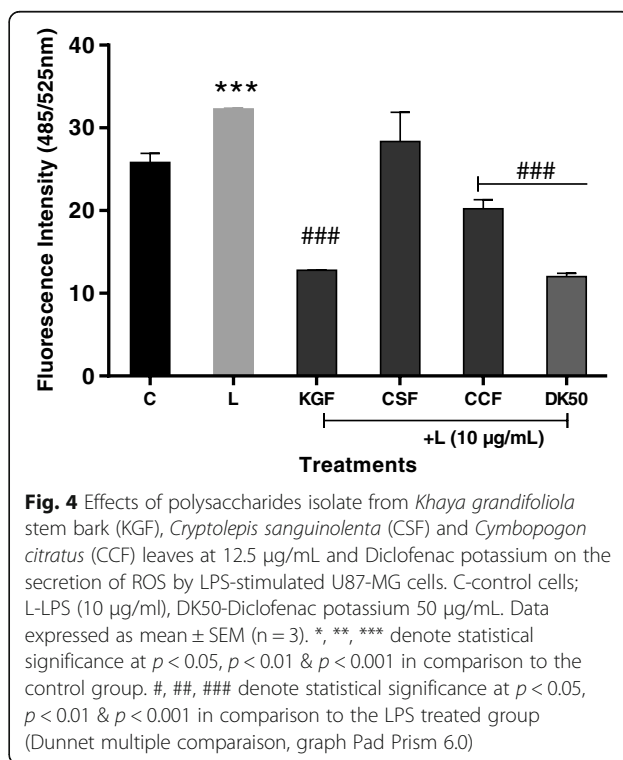
(compared to the control,  $P < 0.005$ ) indicating of intracellular ROS production (Fig. 4). However, pre-incubation with KGF and CCF polysaccharide (12.5 µg/mL) and Diclofenac potassium (50 µg/mL) for 1 h before LPS treatment decreased the fluorescence intensity of the cells. CSF polysaccharide did not reduce intracellular ROS in LPS-induced U87-MG. The most promising KGF and



CSF showed the best NO and ROS inhibitory effects in LPS stimulated RAW 264.7 and U87-MG cell lines.

**Effect of polysaccharide fractions on mRNA expression of IL-1β, IL6, NF-kB and TNFα**

The systematic study of simultaneous changes in gene expression for several pro-inflammatory cytokines in



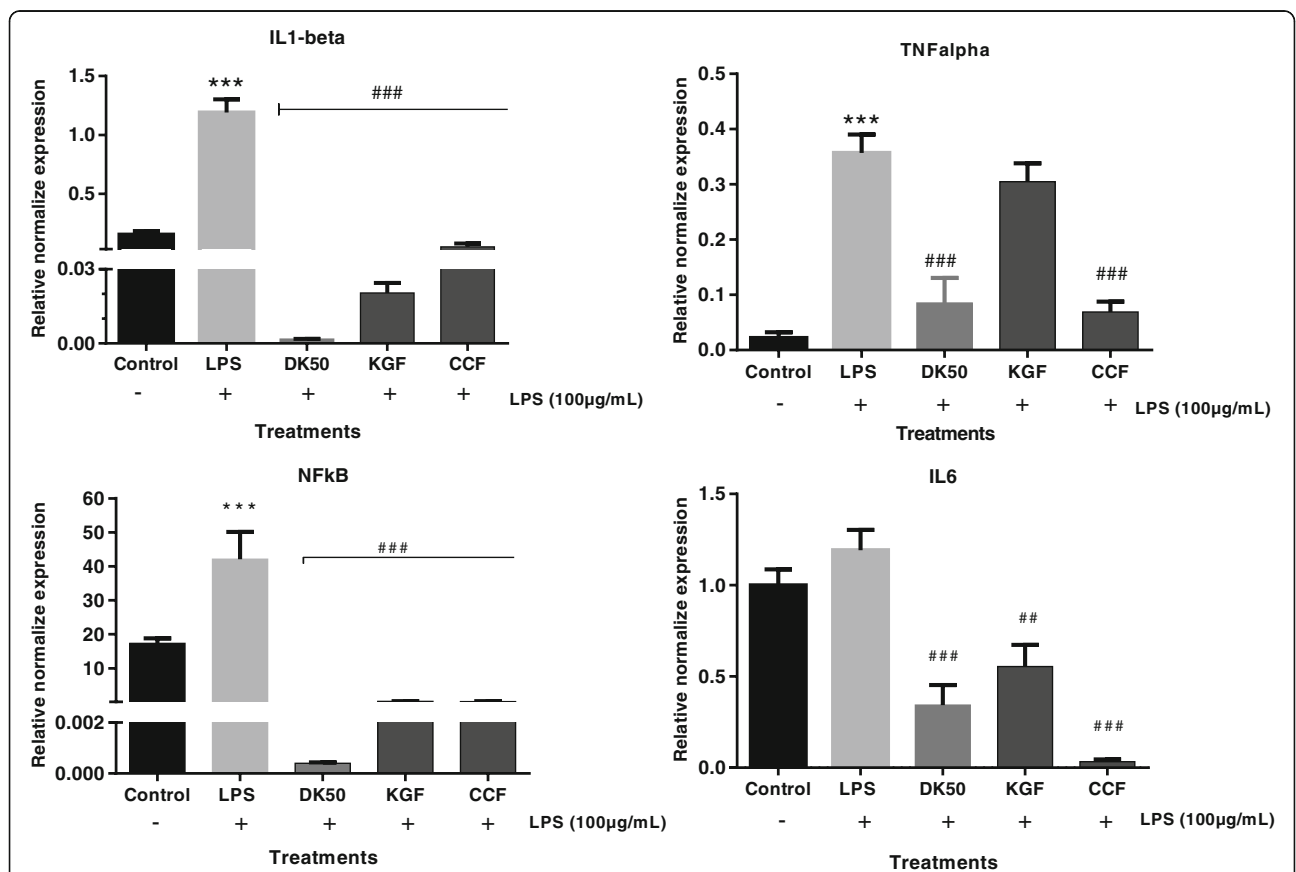
LPS-induced U87-MG cell lines was performed using Real Time gene expression studies. Comparing the LPS-treated and untreated cells, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  expression showed significant up-regulation. KGF and CCF polysaccharides at 12.5  $\mu$ g/mL were able to significantly reduce the over-expressions of IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B but only CCF reduced TNF- $\alpha$  over-expression. KGF and CCF suppressed the production of IL-6 and IL-1 $\beta$  in LPS-induced U87-MG cell lines by inhibiting NF- $\kappa$ B activation which is an important signaling pathway involved in the production of cytokines. Diclofenac potassium at 50  $\mu$ g/mL was more active on IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B compared to the polysaccharides (Fig. 5).

**Discussion**

Polysaccharides are present in plants, animals and microorganisms bound to with proteins and phenolic compounds. During their extraction, these others compounds are also obtained in various concentrations. Phenolic compounds

are known to have several biological activities including antioxidant and anti-inflammatory properties [29]. According to Chen et al. [30] and Mediesse et al. [15], the bioactivity of polysaccharide extracts increases in a dose-dependent manner with protein, phenolic and lipid contents. Recent studies now show that pure polysaccharides also have several biological activities [23, 31]. Some research has been oriented towards the identification of pure and bioactive polysaccharides. In this study, the modulation of *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharide fractions for LPS-induced inflammatory responses were examined in vitro. From cytotoxicity experiments, it was observed that the CSF polysaccharide exhibited more significant cytotoxic effect against the cancer cells than KGF and CCF fractions. The concentrations of KGF, CSF and CCF polysaccharides ( $\leq 100 \mu$ g/mL) used in this study were considered to be non-cytotoxic.

During inflammation, macrophages induce the expression of pro-inflammatory genes such as inducible nitric



**Fig. 5** Normalised gene expression levels of proinflammatory cytokines in LPS induced U87-MG cell lines (n = 3). The mRNA expression values were given as mean  $\pm$  SEM normalised to GAPDH levels in each sample. Y-axis values represent the number of mRNA copies relative to the number of GAPDH copies. Control-untreated cell line; LPS (100  $\mu$ g/mL), *K. grandifoliola* stem bark (FKG) and *C. citratus* leaves (FCC) were tested at 12.5  $\mu$ g/mL, DK50-Diclofenac potassium 50  $\mu$ g/mL treated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. #, ##, ### denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the LPS treated group. \*, \*\*, \*\*\* denote statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  &  $p < 0.001$  in comparison to the control group



oxide synthase (iNOS). Cytokines, such as interleukin (IL)-1, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF), have been known to play important roles in pro-inflammatory response [32, 33]; and iNOS is up-regulated by secretion of pro-inflammatory cytokines and produces nitric oxide from L-arginine. Because high concentrations of NO can be toxic, the regulation of NO production is therefore an important target for inflammatory disease [34]. Our results indicate that FKG, FCS and FCC treatment can reduce NO in the RAW 264.7 cell. Pacheco-sanchez et al. [35] also reported that polysaccharides extracted from *Collybia dryophila* treatment showed a down-regulation effect of NO production. According to Kim et al. [36] classification, the percentage of NO inhibition from plant extract represents its anti-inflammatory potential. Therefore KGF and CCF polysaccharides could be considered as moderate and CSF polysaccharide as weak anti-inflammatory agent. In addition, LPS stimulates various transcription factors especially NF- $\kappa$ B which causes a chain of mechanisms, resulting in the production of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL6 and inflammatory mediator iNOS [37, 38]. Persistent NF- $\kappa$ B activation also causes chronic inflammation, which has long been related to certain types of cancers [39, 40]. In this study, after LPS incubation with U87 glioblastoma cell, the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL6 levels were elevated; the response was reversed by co-incubation of polysaccharide fractions in LPS. Several studies suggested that the biological activities of polysaccharides would strongly depend on their monosaccharide composition, structure, the degree of sulfation, the molecular weight, the sulfation pattern, and the glycosidic branches [41]. Luhm et al. [42] reported that  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) -D-Glucans from plant material were shown to be capable of having beneficial effects in pre-inflammatory responses, indicating that  $\beta$ -glucan can be a modulator of the anti-inflammatory response as interleukin mediators. We do not exactly understand the mechanism by which the KGF, CSF and CCF treatment reduce inflammation in the RAW 264.7 and U87 cells. Therefore, more research is needed to understand the effects of treatment with *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharide fractions on anti-inflammation and how these three polysaccharide fractions relate to changes of cytokine, ROS and NO.

## Conclusion

The present study was conducted to explore the potential use of *K. grandifoliola*, *C. sanguinolenta* and *C. citratus* polysaccharides to prevent chronic neuroinflammation. The results of the study show that KGF, CSF and CCF inhibit the toxic effect of LPS, increase brain cell (U87-MG) proliferation and exert anti-inflammatory effect by regulating various pro-inflammatory mediators (NO, ROS and pro-inflammatory cytokines). However, further detailed experiments need to be performed to understand the

exact mechanisms by which they act. Thus, KGF and CCF particularly present the best activities which could be used in a variety of painful conditions and also to attenuate neuroinflammation in neurological disorders.

## Abbreviations

CNS: Central Nervous System; DCFH-DA: Dichlorofluorescein diacetate; FCC: Polysaccharide fraction of *Cymbopogon citratus*; FCS: Polysaccharide fraction of *Cryptolepis sanguinolenta*; FKG: Polysaccharide fraction of *Khaya grandifoliola*; GAPDH: Glycerinaldehyde phosphate dehydrogenase; INF $\gamma$ : Interferon gamma; iROS: intracellular reactive oxygen; LPS: Lipopolysaccharide; MEM: Minimum Essential Medium; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B; NO: Nitrite oxide; TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

## Acknowledgments

The authors thank M. Nana of the Cameroon National Herbarium for plants identification. The authors are grateful to Professor Atogho-Tiedeu Barbara (Department of Biochemistry, University of Yaounde 1, Cameroon) for improving the English text.

## Funding

We gratefully acknowledge the Centre for Science and Technology of the Non-Aligned and Other Developing Countries (NAM S&T Centre) for providing the fellowship (Research Training Fellowship for Developing Country Scientist, RTF-DCS 14–15) at BITS, Pilani (India) to one of the authors Mediesse Kengne Francine.

## Availability of data and materials

All data are contained and described within the manuscript. The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Authors' contributions

TB, WFM and PY conceived the project, designed the study and were involved in the drafting and correction of the manuscript. TB and PY also coordinated the study. FMK carried out extraction of polysaccharides, oxidative and immunomodulatory assays, analysis and interpretation of data and participated in the correction of the manuscript. AH and MG participated in the work design and drafting of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Consent for publication

All authors gave their consent for the publication of the manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Valorisation of Plant Resources, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 3851, Messa-Yaounde, Yaounde, Cameroon. <sup>2</sup>Drug Discovery Research Laboratory, Department of Pharmacy, Birla Institute of Technology and Science–Pilani, Hyderabad campus, Jawahar Nagar, Hyderabad, Andhra Pradesh –500078, India. <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon. <sup>4</sup>Laboratory of Public Health Research Biotechnologies, The Biotechnology Centre, University of Yaounde I, P.O. Box 3851, Messa-Yaounde, Yaounde, Cameroon.

Received: 12 October 2017 Accepted: 2 March 2018

Published online: 12 March 2018

## References

- Lee YL, Han JY, Lee CG, Heo K, Park SI, Park YS, Kim JS, Yang KM, Lee KJ, Kim TH, Rhee MH, Kim SD. Korean red ginseng saponin fraction modulates radiation effects on lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *J Ginseng Res*. 2014;38:208–14.
- Holden JA, Attard TJ, Loughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Inf Immun*. 2014;82(10):4190–203.
- Pallai A, Kiss B, Vereb G, Armaka M, Kollias G, Szekanez Z, Szondy Z. Transmembrane TNF- $\alpha$  reverse signaling inhibits lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine formation in macrophages by inducing TGF- $\beta$ : therapeutic implications. *J Immunol*. 2016;196:1146–57.
- Liya Q, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *NIH Pub Acc*. 2007;55:453–62.
- Pizza V, Agressa A, D'Acunto CW, Festa M, Capasso A. Neuroinflamm-aging and neurodegenerative diseases: an overview. *CNS Neurol Disord Drug Target*. 2011;10:621–34.
- Niranjan R, Kamat PK, Nath C, Shukla R. Evaluation of guggulipid and nimesulide on production of inflammatory mediators and GFAP expression in LPS stimulated rat astrocytoma, cell line (C6). *J Ethnopharmacol*. 2010;127:625–30.
- Dondorp AM, Day NPJ. The treatment of severe malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(7):633–4.
- Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Immunol*. 2005;5:722–35.
- Reynolds A, Laurie C, Lee MR, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Inter Rev Neurobiol*. 2007;82:297–325.
- Koppula S, Kumar H, Kim IS, Choi DK. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*. 2012; <https://doi.org/10.1155/2012/823902>.
- Guidetti G, Di Cerbo A, Giovazzino A, Rubino V, Palatucci AT, Centenaro S, Fraccaroli E, Cortese L, Bonomo MG, Ruggiero G, Canello S, Terrazzano G. *In vitro* effects of some botanicals with anti-inflammatory and antitoxic activity. *J Immunol Res*. 2016;2016:5457010.
- Xie JH, Jin ML, Morris GA, Zha XQ, Chen HQ, Yi Y, Li JE, Wang ZJ, Gao J, Nie SP, Peng S, Xie MY. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1069255>.
- Xiaojuan H, Xuyan N, Jian L, Shaohua X, Aiping L. Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides: A Review. *J Experimen Integr Med*. 2012;2:15–27.
- Amit G, Pallavi RK, Sushama C. Applications and Uses of active ingredients from medicinal plants. *Indi J Nov Drug Deliv*. 2014;6:106–11.
- Mediesse KF, Woguia AL, Fogue SP, Atogho TB, Simo G, Boudjeko T. Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of Stevia rebaudiana leaves. *J Coast Life Med*. 2014;2:962–9.
- Aboughe-Angone S, Nguema-Ona E, Boudjeko T, Driouich A. Plant cell wall polysaccharides as immunomodulators of the immune system. *Cur Top Phytochemistry*. 2011;10:1–16.
- Boudjeko T, Megneko R, Woguia AL, Mediesse KF, WEJ K, Nounga TCD, Koum O. Antioxidant and Immunomodulatory properties of cell wall polysaccharides isolated from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L) king and H.E. Robins leaves. *BMC Res Notes*. 2015;8:759.
- Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:317–33.
- Njyou FN, Aboudi ECE, Tandjang MK, Tchana AK, Ngadjui BT, Moundipa PF. Hepatoprotective and Antioxidant activities of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC and *Entada africana* Guill. Et Perr. *J Nat Prod*. 2013;6:73–80.
- Ravinder K, Pawan K, Gaurav S, Paramjot K, Gagan S, Appramdeep K. Pharmacognostical investigation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Der Pharma Let*. 2010;2:181–9.
- Tempesta MS. The clinical efficacy of *Cryptolepis sanguinolenta* in the treatment of malaria. *Ghana Med J*. 2010;44:1–2.
- Tiwari M, Dwivedi UN, Kakkar P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food Chem Toxicol*. 2010;48:2913–9.
- Thangam R, Sathuvan M, Poongodi A, Suresh V, Pazhanichamy K, Sivasubramanian S, Kanipandian N, Ganesan N, Rengasamy R, Thirumurugan R, Kannan S. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon citratus* polysaccharide fractions. *Carbohydr Polym*. 2014;107:138–50.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–50.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*. 1956;28:350–6.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983;65:55–63.
- Cheenpracha S, Park EJ, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC. Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesterterpene peroxide, Epimuquibilin a. *Mar Drugs*. 2010;8:429–37.
- Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II Meth Mol Biol*. 2010;594:57–72.
- Kilani-Jaziri S, Mokdad-Bzeouich I, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, Kechir-Ghedira L. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure–activity relationship study. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40(4):416–24.
- Chen H, Zhang M, Qu Z, Xie B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem*. 2008;106:559–63.
- Batista JA, Dias EGN, Brito TV, Prudêncio RS, Silva RO, Ribeiro RA, Souza MHL, Regina CMP, Feitosa JPA, Chaves LS, Melo MRS, Freitas ALP, Medeiros JVR, Barbosa ALR. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: chemical structure and anti-inflammatory activity. *Carbohydr Polym*. 2014;99:59–67.
- Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Immunology - a short course*. 4th ed. New York: Wiley; 2000.
- Hua X, Chen P, Fox A, Myers R. Involvement of cytokines in lipopolysaccharide-induced facilitation of CGRP release from capsaicin-sensitive nerves in the trachea: studies with interleukin-1b and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Neurosci*. 1996;16(15):4742–8.
- Hur SJ, Choi SY, Lim BO. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Russula virescens* in the macrophage-like cell line RAW 264.7 activated by lipopolysaccharide. *J Nutr Food Sci*. 2012;142 <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000142>.
- Pacheco-Sánchez M, Boutin Y, Angers P, Gosselin A, Tweddell RJ. Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2007;555:61–6.
- Kim O, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Lett*. 1998;125:199–207.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(549):145–51.
- Hur SJ, Choi SY, Lim BO. *In Vitro* anti-inflammatory activity of *Russula virescens* in the macrophage like cell line RAW 264.7 activated by lipopolysaccharide. *J Nutr Food Sci*. 2012;2:142. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000142>.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell*. 1996;87:13–20.
- Normark S, Nilsson C, Normark BH, Hornef MW. Persistent infection with helicobacter pylori and the development of gastric cancer. *Adv Cancer Res*. 2003;99:63–89.
- Sun Z, He Y, Liang Z, Zhou W, Niu T. Sulfation of (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. *Carbohydr Polym*. 2009;77:628–33.
- Luhm J, Langenkamp U, Hensel J, Frohn C, Brand JM. Beta-(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors kappaB, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1beta/IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunol*. 2006;7:5.

Full Length Research Paper

## Evaluation of *in vitro* antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* C.D.C (Welw) stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr leaves

Francine Mediesse Kengne<sup>1</sup>, Marius Trésor Sipping Kemegne<sup>1</sup>, Mersmine Flaire Kouamo Mangoua<sup>1</sup>, Kenji Obadiah<sup>2</sup>, Samuel Tassi Yunga<sup>2</sup>, Wilfried Fon Mbacham<sup>3,4</sup>, Rose Gana Fomban Leke<sup>2</sup> and Thaddée Boudjeko<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Valorisation of Plant Resources, Biotechnology Centre, University of Yaounde I, BP 3851, Messa-Yaounde Cameroon.

<sup>2</sup>Laboratory of Immunology, Biotechnology Centre, University of Yaounde I, BP 3851, Messa-Yaounde Cameroon.

<sup>3</sup>Laboratory of Public Health Biotechnology, Biotechnology Centre, University of Yaounde I, BP 3851, Messa-Yaounde Cameroon.

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Yaounde I, BP 812, Yaounde, Cameroon.

<sup>5</sup>Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale. Grand Réseau de Recherche VASI de Haute Normandie. Université de Rouen. 76821 Mont Saint Aignan, Cedex. France.

Received 16 December, 2017; Accepted 3 April, 2018

Antioxidant and immune modulatory activities of polysaccharides fractions isolated from *Khaya grandifoliola* stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* leaves were analyzed. Water-soluble total polysaccharides (TP) were extracted and precipitated in alcohol. Pectic (PF) and hemicellulosic fractions (HF) of cell walls were obtained using ammonium oxalate and potassium hydroxide. TP of *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta* pectins are mostly linked to proteins ( $86.39 \pm 1.13$  and  $67.66 \pm 2.05$   $\mu\text{g}$  eqBSA/mg DW). Polysaccharide fractions of *C. sanguinolenta* are rich in phenolic compounds. Gas chromatography analyses showed that TP of *C. sanguinolenta* is an arabinoglucan type, consisting mainly of glucose (60.51%) and arabinose (10.36%), while TP of *K. grandifoliola* is constituted of glucose (30.53%), galactose (28.89%), arabinose (17.57%) and rhamnose (10.74%). Pectic fractions of the two plants would be a rhamnogalacturonan type constituted of galacturonic acid, rhamnose and arabinose; while HF fractions might be xyloglucan as they were mainly constituted of glucose, xylose and arabinose. The polysaccharide fractions (50 to 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) exhibited antioxidant activity on both DPPH and ABTS radicals, with TP showing the highest activities. Polysaccharides were assessed to be non-toxic at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and strongly inhibited MSP1 (Malaria antigen)-induced overproduction of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by PBMCs in the *in vitro* immunological assays.

**Key words:** *Khaya grandifoliola*, *Cryptolepis sanguinolenta*, polysaccharides, antioxidants, immunomodulatory activities.

## INTRODUCTION

*Khaya grandifoliola* C.D.C (Welw) (Meliaceae) and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr (Periplocaceae) are two Cameroonian medicinal plants. Decoction from *K. grandifoliola* stem bark and leaves of *C. sanguinolenta* are used in the treatment of malaria and other infectious diseases (Bickii et al., 2000; Adeyemi and Gbilade, 2006; Stephen et al., 2009). *K. grandifoliola* is also called African Mahogany, Benin Mahogany, Large-leaved Mahogany or Senegal Mahogany. *C. sanguinolenta*, also known as Nibima, Kadze, Gangamau or Ghanaian quinine is a climbing shrub. These two plant species are largely distributed in western and central African countries. Because of the importance of these plants in traditional medicine, numerous studies showed the pharmacological properties of their plant extracts including hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, hypoglycemic, anti-pyretic, anti-microbial and anti-malaria activities (Ansah and Gooderham, 2002; Falodun et al., 2009; Olajide et al., 2009; Tempesta, 2010; Njyou et al., 2013). Secondary metabolites (polyphenols, flavonoids, limonoids, saponins, tanins, alkaloids, anthraquinones, flavonoids, reducing sugars, phlobatanins, etc.) are mostly cited as responsible for plant effects, despite the possible presence of polysaccharides in traditional preparations (decoctions, infusions and macerations) (Bickii et al., 2000; Stephen et al., 2009).

Plant cell walls are highly complex structures whose composition and physical properties vary depending on the cell type and plant species (Fry, 2011; Fangel et al., 2012). Nevertheless, all plant cell walls have similar basic structure: they consist of a fibrillar phase of cellulose microfibrils set in a matrix. This matrix is composed mostly of hemicelluloses and pectins (non-cellulosic cell wall polysaccharides) with a variety of different structures, structural proteins, glycoproteins and phenolic components (Fry, 2011). Hemicelluloses and pectins are important active components of plants which play crucial roles in plant growth, development and defense responses (Nguema-Ona et al., 2013). Non-cellulosic cell wall polysaccharides of higher plants represent a potential source of pharmacologically active polysaccharides (Xiaojuan et al., 2012; Ramar et al., 2014; Mediesse et al., 2014; Boudjeko et al., 2015).

According to Xie et al. (2015), there is an increasing interest of pharmaceutical sectors and researchers toward polysaccharides isolated from medicinal plants because of their biological activities including antioxidant (inhibition of lipid peroxidation, free radicals scavenging activities, protection of DNA from breaks induced by ROS), anti-inflammatory, anticancer activity (Xiaojuan et

al., 2012; Amit et al., 2014; Tabarsa et al., 2017) and stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) proliferation and INF $\gamma$  cytokines production (Boudjeko et al., 2015).

Moreover, most polysaccharides derived from higher plants are relatively non-toxic and do not cause significant side effects comparatively to immunomodulatory bacterial polysaccharides and synthetic compounds (Schepetkin and Quinn, 2006; Mediesse et al., 2014; Tabarsa et al., 2017).

The aim of present study was to explore free radical scavenging activities of total soluble pectic and hemicellulosic polysaccharides isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves. *Luminex* technique was performed to quantify the production of pro-inflammatory by PBMCs in the presence of polysaccharide fractions and/or absence of malaria antigen (MSP1) as stimuli. Furthermore, monosaccharide composition, proteins and polyphenols content were determined in each fraction.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Stem bark of *K. grandifoliola* C.D.C (Welw.) of the Meliaceae family and leaves of *C. sanguinolenta* (Lindl.) Schltr of the Periplocaceae family were harvested respectively in Mbalmayo and Ongot (Centre region, Cameroon). They were identified by M. Nana of the National Herbarium of Cameroon in comparison to the voucher specimens' N°52658 and N° 28247/SRF-Cam respectively for *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves. The plant materials were air dried for two weeks and crushed into small pieces (<1 mm).

### Extraction of soluble polysaccharides

Total soluble polysaccharides (TP) were extracted according to Boudjeko et al. (2015). *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves powder (30 g) were boiled with distilled water 20:1 (v/w) at 80°C for 3 h. The water extracts were filtered and centrifuged (3000 rpm for 30 min). The collected supernatant was treated with four volumes of ethanol 95% during 48 h at room temperature to obtain crude polysaccharides after centrifugation (3000 rpm, 30 min). The resulting crude polysaccharide was solubilized in distilled water, dialyzed against distilled water during 72 h and lyophilized.

### Extraction of cell wall polysaccharides

The cell wall was isolated according to the protocol described by Ray et al. (2004) with modifications. Plant powder (5 g) was boiled in 100 mL of 85% ethanol for 30 min. Thereafter, the mixture was centrifuged (4000 rpm, 30 min) and the pellet suspended into 100 mL of 90% dimethyl sulfoxide and homogenized for 24 h at room temperature. The mixture was centrifuged (4000 rpm, 15 min) and the residue was solubilized in 100 mL of methanol 50%, washed

\*Corresponding author. E-mail: boudjeko@yahoo.com. Tel: + (237) 675 34 17 54.



twice with acetone and dried at 40°C. The residue obtained represents the cell wall material (CWM).

To extract the pectic and hemicellulosic fractions, CWM (1 g) was extracted twice with boiled ammonium oxalate at 0.5% for 1 h, followed by incubation of the residue in 1 M KOH overnight at room temperature as described by Ray et al. (2004). All extracts were centrifuged and dialyzed against water. Alkaline extracts were acidified to pH 5 with acetic acid prior to dialysis.

#### Determination of protein content

The quantity of proteins present in each polysaccharide fraction was determined by the Bradford (1976) method using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard. Practically, each polysaccharide fraction (1 mL) was added to the same volume of freshly prepared Bradford reagent. The absorbance was measured at 595 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer after incubation for 30 min in the dark. The amount of proteins was expressed as µg BSA equivalent/mg DW).

#### Determination of phenolic compounds content

The phenolic compounds were quantified in the various polysaccharide fractions by the Folin-Ciocalteu methods (Singleton and Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagent (75 µL) was added to 750 µL of polysaccharide solutions (0.4 mg/mL). After 3 min, 750 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) were added, followed by incubation for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 760 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. Gallic acid was used as standard during the experiment and the amount of polyphenols expressed as µg Gallic acid equivalent (GAE)/mg DW).

#### Analysis of monosaccharide composition

Gas chromatography (GC) was used for identification and quantification of the monosaccharide units of soluble, pectic and hemicellulosic polysaccharide fractions of *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves as described by Ray et al. (2004). Neutral glycosyl composition of their alditol acetate and their trimethyl-silyl-glycoside derivatives respectively were determined (York et al., 1985). As references, the following standard monosaccharides were derivatized and analyzed accordingly: D-Mannose, D-ribose, L-rhamnose, D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, L-arabinose, D-fucose. Inositol (1 mg/mL) was used as internal standard.

#### In vitro antioxidant activities

##### Evaluation of 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free radical-scavenging activity

The free radical-scavenging activity of the polysaccharide fractions was measured in terms of their hydrogen donating or radical-scavenging ability using the DPPH radical (Katalinić et al., 2004). For the assay, 500 µL of the polysaccharide fraction at different concentrations (50-300 µg/mL) were introduced into test tubes and 500 µL of the freshly prepared solution of 400 µmol/L DPPH in methanol was then added. The mixture was incubated at 37°C for 30 min in the dark and the absorbance was measured at 517 nm using a UV-1605 Shimadzu spectrophotometer. Gallic acid and catechin were used as positive controls. A low absorbance of the reaction mixture indicated high free radical scavenging activity. The DPPH radical scavenging effect was calculated as "Inhibitory percentage" according to the following formula:

$$\text{Inhibitory percentage (\%)} = \left\{ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \right\}$$

Where, A<sub>0</sub> is the absorbance of the control reaction and A<sub>1</sub> is the absorbance in the presence of the sample.

##### 2,2-azino-bis-3-ethylbenzylthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) free radical scavenging assay

ABTS free radical-scavenging activity was evaluated according to Re et al. (1999). Briefly, 1 mL of ABTS reagent was added to 100 µL of polysaccharide fractions at different concentrations (50-300 µg/mL). The mixture was stirred and kept in the dark for 30 min. The absorbance was measured at 734 nm using UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. Gallic acid and catechin were used as positive controls. The ABTS radical-inhibitory percentage was calculated as above.

#### In vitro immunomodulatory activities

##### Isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Ethical clearance N°2015/03/568/CE/CNERSH/SP was obtained from the National Ethics Committee on Research and Human Health (Cameroon). Signed informed written consent was obtained from each enrolled person. The blood was collected from men and women between 23 and 35 years and diluted with 10 mL of incomplete Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium. Fifteen mL of this mixture was added to Ficollin 2/3-1/3 (v/v) and centrifuged at 10000 g for 25 min. PBMCs suspended in 4 ml of incomplete RPMI 1640 medium was washed and centrifuged at 8000 g. After separation, PBMCs was finally diluted in complete RPMI 1640 medium containing type AB human serum, Hepes, 200 mM L-glutamine and 50 mg/mL Gentamicin and counted with lazarrus (blue trypan).

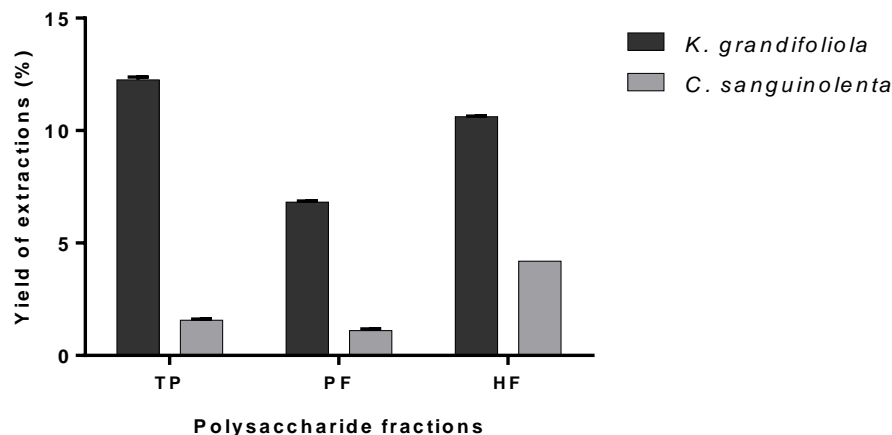
##### Cell proliferation assay

In this study the polysaccharide fractions were tested at 200 µg/mL concentration according to Boudjeko et al. (2015). However, the non-toxicity of polysaccharide fractions and the toxicity of the malaria antigen MSP1 used as positive control in the immunological assay on PBMCs viability were evaluated. Practically, 5×10<sup>5</sup> cells/well/500 µL were treated with 500 µL of polysaccharide fractions (200 µg/mL) or MSP1 (20 µg/mL) in 24 white well plates during 48 h at 37°C, 5% of CO<sub>2</sub> with 89% relative humidity. Non-treated cells represented the control. Centrifugation of well content (80 g; 5 min) was performed, followed by the suspension of the pellets in 1 mL of complete RPMI medium. Cells were counted using blue trypan and the cell viability was determined by the following formula:

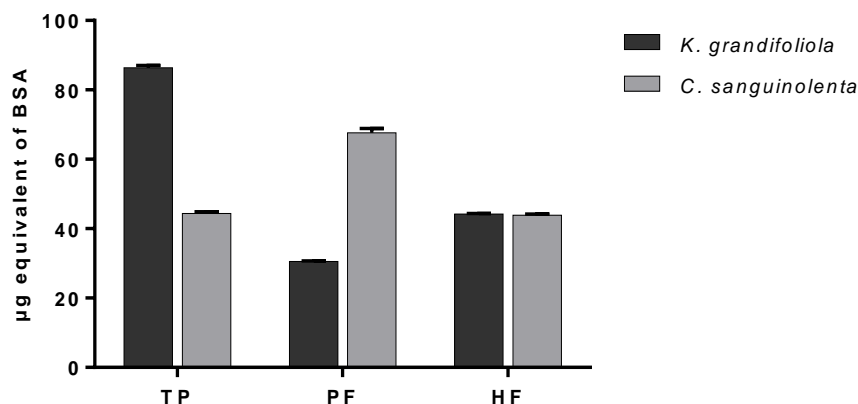
$$\text{Cell viability (\%)} = \left( \frac{\text{number of viable cells}}{\text{number of total cells}} \right) \times 100$$

##### Detection and quantification of pro-inflammatory cytokines

A treatment of 2×10<sup>5</sup> cells/well/100 µL with 100 µL of polysaccharide fractions at 200 µg/mL or MSP1 at 20 µg/mL was performed. The human PBMCs culture was incubated for 16 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> at 90% RH with different polysaccharide-enriched fractions and/or MSP1 and subjected to test of the production of pro-inflammatory cytokines. The treatment of cells with both polysaccharide fractions and MSP1 was performed to see the effect of these polysaccharides in the presence of an antigen. After incubation in the same conditions, the mixture was centrifuged. Supernatants were used for detection and quantification of IL1β, IL6 and TNFα pro-inflammatory cytokines



**Figure 1.** Yield of polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves.



**Figure 2.** Total proteins content in polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves.

levels using the Human Premixed Multi-Analyte kit. Experiments were performed in accordance with manufacturer's protocol (Luminex kit HCYTOMAG-60K-05). The plate was read with the *Luminex* 100 cytometer equipped with a *Luminex* MAGpix Analyzer.

#### Statistical analysis

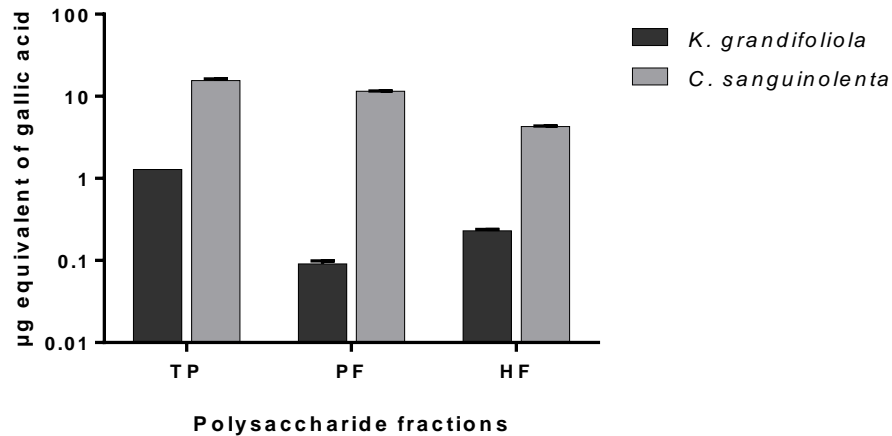
The experimental data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical differences between means were evaluated using the program SPSS for Windows, v. 19.0 (SPSS, Inc.). Differences with  $P < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

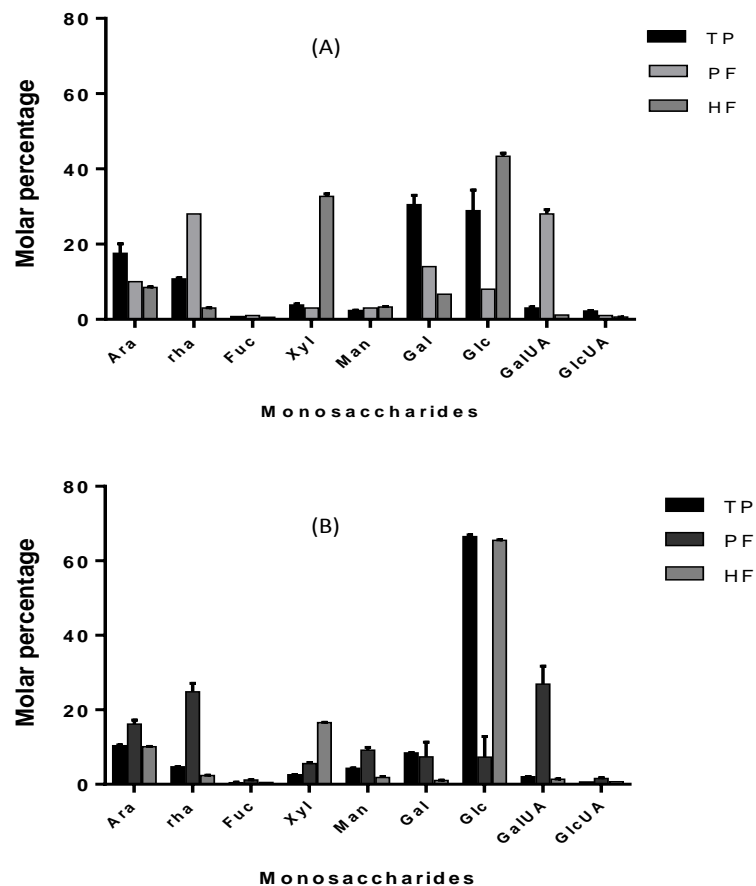
### Yield of polysaccharide fractions, total protein, total phenolic compounds and monosaccharides composition

Three fractions namely total soluble polysaccharides (TP), pectic fraction (PF) and hemicellulosic fraction (HF)

were obtained at different yields for *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves (Figure 1) in hot water, boiled ammonium oxalate at 0.5% and 1 M KOH. More material was extracted from the stem bark of *K. grandifoliola* than *C. sanguinolenta* sample. The partial characterization showed that all these polysaccharides are mostly linked to proteins and phenolic compounds in various proportions. However, PF of *C. sanguinolenta* and TP of *K. grandifoliola* present the highest contents in proteins with  $67.66 \pm 2.05$  and  $86.39 \pm 1.13$   $\mu\text{eqBSA}/\text{mg DW}$  respectively (Figure 2). Phenolic compounds are mostly abundant in PF and TP fractions of *C. sanguinolenta* leaves ( $11.56 \pm 0.00$  and  $15.53 \pm 1.34$   $\mu\text{g EGA}/\text{mg DW}$  respectively) (Figure 3). Monosaccharide composition analysis revealed that polysaccharide fractions of *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* are constituted of sugar monomers at different proportions. TP of *C. sanguinolenta* leaves was composed of Glu (60.51%), Ara (10.36%) and Gal (8.46%) suggesting an arabinoglucan while TP of *K.*



**Figure 3.** Phenolics content of polysaccharide fractions isolated from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves.

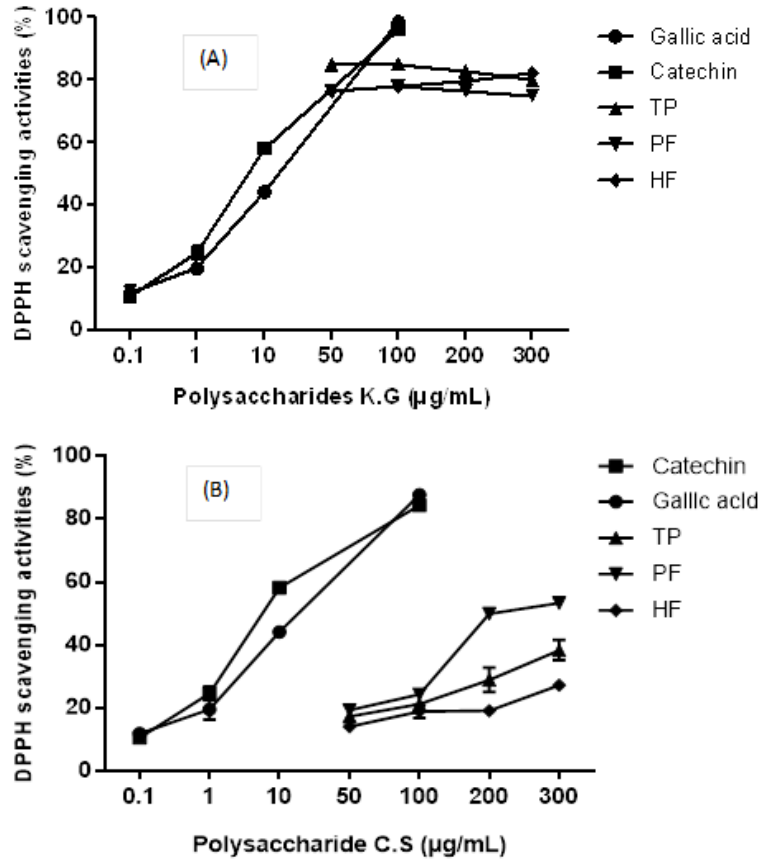


**Figure 4.** Molar percentages of sugar monomers present in polysaccharide fractions isolated from (A) *K. grandifoliola* stem bark and (B) *C. sanguinolenta* leaves. TP, Total soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction; Ara, arabinose; Rha, rhamnose; Fuc, fucose; Xyl, xylose; GalA, acide galacturonic acid; GlcA, glucuronic acid; Man, mannose; Gal, galactose; Glc, glucose.

*grandifoliola* stem bark was constituted of Glu (30.53%), Gal (28.89%), Ara (17.57%) and Rha (10.74%) (Figure

4). Pectic Fractions of both plants would be a rhamnogalacturonan constituted of GalUA (28.88;





**Figure 5.** DPPH-free radical scavenging activity (%) of polysaccharide fractions isolated from (A) *K. grandifoliola* stem bark and (B) *C. sanguinolenta* leaves. TP, Total Soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction.

28.85%), Rha (24.83; 28.81%) and Ara (16.16; 10.29%) respectively for *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta*. HF of both plants would be a xyloglucan because they are mainly constituted of Glu, Xyl and Ara.

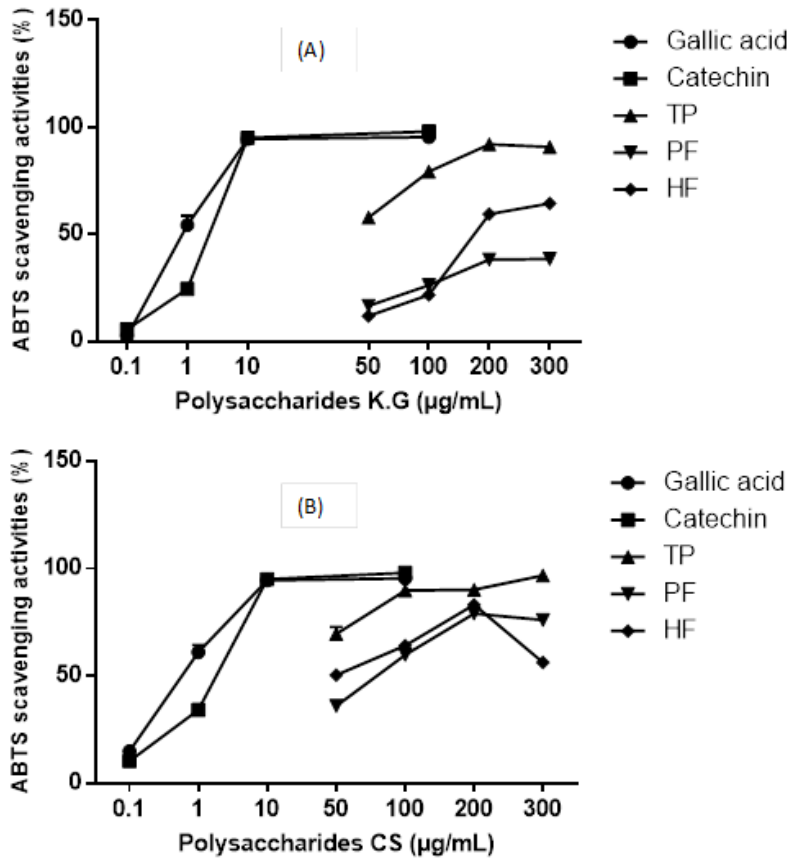
### DPPH and ABTS radical-scavenging activities

DPPH radical is an unwavering nitrogen-centered radical that has a characteristic absorption at 517 nm. Excellent DPPH scavenging activity confers superior antioxidant activity, and the mauve color of DPPH solution fades upon the scavenging capacity of the tested samples. As shown in Figure 5, all polysaccharide fractions scavenged DPPH in a concentration-dependent manner ranging from 50 to 200 µg/mL. Total soluble fraction of *K. grandifoliola* exhibited the remarkable antioxidant activity with 85.15±0.12% at 100 µg/mL (Figure 6A). Among the *C. sanguinolenta* polysaccharide fractions, PF showed the best scavenging activity at 300 µg/mL (53.41±1.36%) while HF presented the lowest scavenging activity (Figure 6B). However, TP of *C. sanguinolenta* presented the best ABTS radical scavenging activities with 96.86±0.77% and

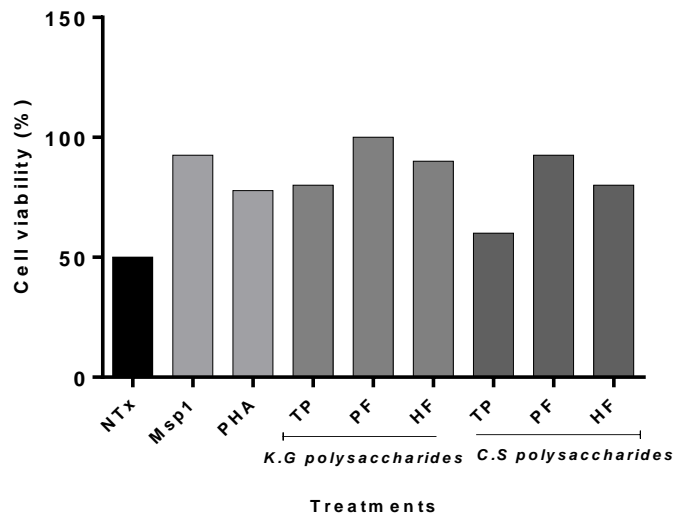
92.07±0.34% at 300 µg/mL for *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta* respectively.

### Immunomodulatory activities of polysaccharide fractions

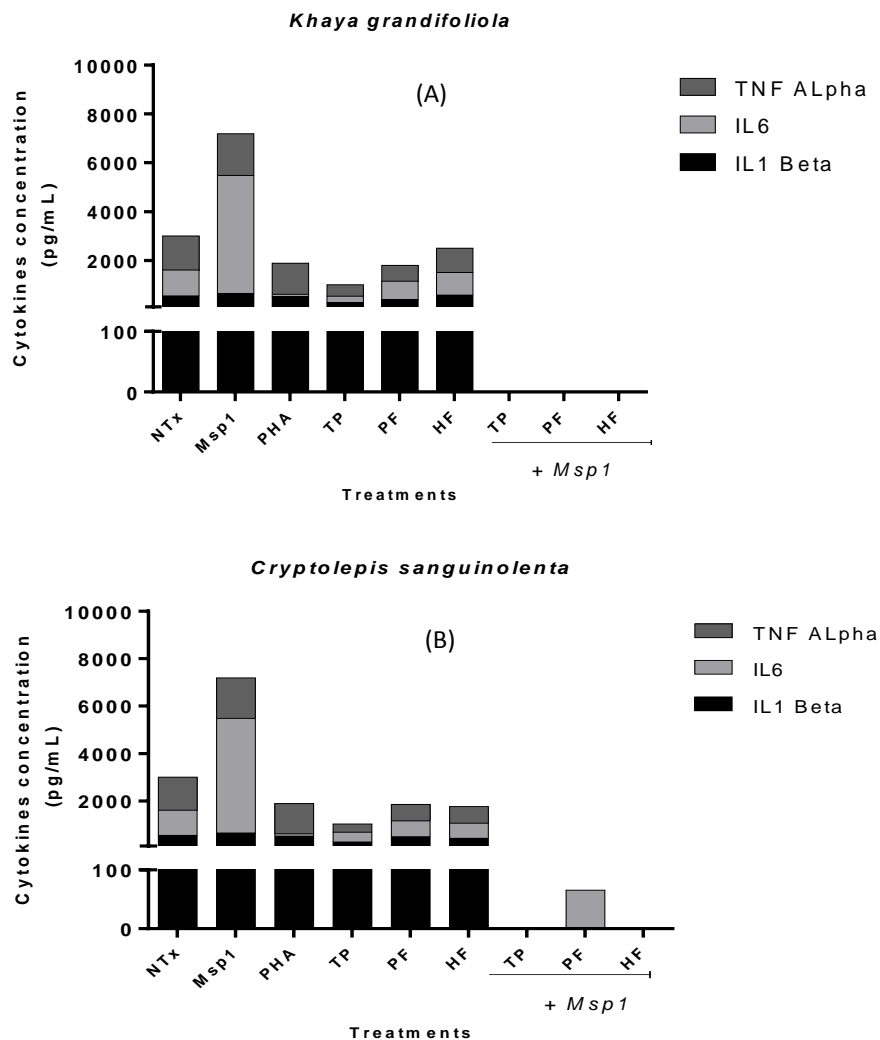
The treatment of PBMCs with polysaccharide fractions at 200 µg/mL increased significantly ( $P < 0.05$ ) their viability comparatively to untreated PBMCs (NTx). But, the best cell viability percentages were observed with PF of *K. grandifoliola* and *C. sanguinolenta* treated PBMCs respectively (90-100%). The same observation has been done on PBMCs treated with a malaria antigen (MSP1) (Figure 7). The evaluation of production of proinflammatory cytokines by *Luminex* technique in the presence of one mitogen (PHA) and malaria antigen (MSP1) showed that PBMCs produced more cytokines in presence of malaria antigen than mitogen PHA ( $P < 0.05$ ) (Figure 8). Moreover, any cytokines production was detectable in PBMCs treated by both MSP1 and fraction polysaccharides. Furthermore, the immunomodulatory activity showed that polysaccharide fractions inhibited a



**Figure 6.** ABTS-free radical scavenging activity (%) of polysaccharide fractions isolated from (A) *K. grandifoliola* stem bark and (B) *C. sanguinolenta* leaves. TP, Total Soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction.



**Figure 7.** Cell viability percentages of PBMCs cells non-treated and treated with MSP1, PHA and polysaccharide fractions from *K. grandifoliola* Stem bark (K.G) and *C. sanguinolenta* leaves C.S TP, total soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction; NTx = PBMCs untreated; PHA = PBMCs treated with phytohemagglutinine A; MSP1, PBMCs treated with Merozoit Surface Protein (20 µg/mL).



**Figure 8.** Production of Pro-inflammatory cytokines IL1Beta, IL6 by PMBCs non treated and treated with PHA, MSP1, polysaccharide fractions from *K. grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves. TP, total soluble fraction; PF, pectic fraction; HF, soluble hemicellulosic fraction; NTx = PMBCs untreated; PHA = PMBCs treated with phytohemagglutinine A; MSP1, PMBCs treated with Merozoit Surface Protein (20 µg/mL).

significant overproduction of pro-inflammatory cytokines (IL1  $\beta$ , IL 6 and TNF  $\alpha$ ) by PBMCs, as compared to the untreated cells in the presence of MSP1. TP and HF showed the best immunomodulatory activity in the presence of MSP1.

## DISCUSSION

Polysaccharides are present in plants, animals and microorganisms in conjugation with proteins and phenolic compounds. During the extraction process of polysaccharides, proteins and phenolic compounds are also obtained in various concentrations. According to

Chen et al. (2008), the bioactivity of polysaccharides depends primarily on their chemical environment and their combination with other compounds such as proteins, polyphenols and lipids. Phenolic compounds are known showed that TP of both plant species demonstrated the best antioxidant potential on DPPH and ABTS radical. PBMCs proliferation was significantly increased by all the polysaccharide fractions and the proinflammatory cytokines production significantly decreased particularly by all polysaccharide fractions in presence of MSP1 as antigen stimuli for PBMCs. These results suggest that polysaccharides from *K. Grandifoliola* stem bark and *C. sanguinolenta* leaves are potential antioxidant and immunostimulating agents for functional foods or

medicine. All these properties justify the use of these two plants in traditional medicine and encourage the study of polysaccharide by researchers in the pharmaceutical industry. However, further investigation of structural identification is required.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate the institutional and material support from the Biotechnology Centre of the University of Yaounde 1. The study was partially supported by Third World Academy of Sciences (TWAS). Special thanks to Nguema-Ona Eric for the excellent technical assistance offered.

## REFERENCES

- Aboughe-Angone S, Nguema-Ona E, Ghosh P, Lerouge P, Ishii T, Ray B, Driouich A (2008). Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: Structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 343:67-72.
- Adeyemi AA, Gbilade AA (2006). Antianaemic activity of *Spondias mombin* and *Khaya grandifoliola* aqueous extracts on rats. *J. Pharm. Bioresour.* 3:94-97.
- Amit G, Pallavi RK, Sushama C (2014). Applications and uses of active ingredients from medicinal plants. *Indian J. Nov. Drug. Deliv.* 6:106-111.
- Bickii J, Njifutie N, Ayafor JF, Basco LK, Ringwald P (2000). *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69:27-33.
- Boudjeko T, Megnekou R, Woguia AL, Mediesse KF, Kanemoto WEJ, Nounga TCD, Koum O (2015). Antioxidant and immunomodulatory properties of cell wall polysaccharides isolated from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L) King and H.E. Robins leaves. *BMC Res. Notes* 8:759.
- Chen H, Zhang M, Qu Z, Xie B (2008). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). *Food Chem.* 106:559-563.
- Fangel JU, Ulvskov P, Knox JP, Mikkelsen MD, Harholt J, Popper A, Willats WGT (2012). Cell wall evolution and diversity. *Front. Plant Sci.* 3(152):1-8.
- Fry SC (2011). Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Ann. Plant Rev.* 41:1-42.
- He X, Shu J, Xu L, Lu C, Lu A (2011). Inhibitory Effect of *Astragalus* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF  $\alpha$  and IL-1  $\beta$  production in THP-1 Cells. *Molecules* 17:3155-3164.
- Katalinić V, Milos M, Modum D, Musi I, Boban M (2004). Antioxydant effectiveness of selected wines in comparison with (+)- catéchine. *Food Chem.* 86:593-600.
- Kilani-Jaziri S, Mokdad-Bzeouich I, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2017). Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and *p*-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study. *Drug Chem. Toxicol.* 4(40):416-424.
- Lan MB, Zhang YH, Zheng Y, Yuan HH, Zhao HL, Gao F (2010). Antioxidant and Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from Moxa (*Artemisia argyi*) Leaf. *Food Sci. Biotechnol.* 19(6):1463-1469.
- Li Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J., Yuan C, Hao Z, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ, Mohnen D. (2013). An arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *The Plant Cell* 25:270-287.
- Liochev SI (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Rad. Biol. Med.* 60:1-4.
- Mediesse KF, Woguia AL, Fogue SP, Atogho TB, Simo G, Boudjeko T (2014). Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Coast Life Med.* 2:962-969.
- Nguema-Ona E, Moore JP, Fagerström AD, Fangel JU, Willats WGT, Hugo A, Vivier MA (2013). Overexpression of the grapevine PGIP1 in tobacco results in compositional changes in the leaf arabinoxyloglucan network in the absence of fungal infection. *BMC Plant Biol.* 13:46.
- Njyou FN, Aboudi ECE, Tandjang MK, Tchana AK, Ngadjui BT, Moundipa PF (2013). "Hepatoprotective and antioxidant activities of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC and *Entada africana* Guill. et Perr.,". *J. Nat. Prod.* 6:73-80.
- Olajide OA, Ajayi AM, Wright CW (2009). Anti-inflammatory properties of cryptolepine. *Phytother. Res.* 10:1421-1425.
- Pham-Huy LA, He Hua, Pham-Huy C (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4:89-96.
- Ray B, Loutier-Bourhis C, Condamine E, Driouich A, Lerouge P (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterization of novel xyloglucan motif. *Carbohydr Res.* 339:201-208.
- Re R, Pellegrini AA, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolonization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Schepetkin IA, Quinn MT (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6:317-333.
- Stephen UA, Abiodun F, Osahon OE (2009). Phytochemicals analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* stem bark. *J. Biol. Sci.* 9(1):63-67.
- Tabarsa M, You SG, Dabaghian EH, Surayot U (2017). Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. *J. Food Drug Anal.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.016>.
- Xiaojuan H, Xuyan N, Jian L, Shaohua X, Aiping L (2012). Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides: A Review. *J. Experimen. Integr. Med.* 2:15-27.
- Xie JH, Jin ML, Morris GA, Zha XQ, Chen HQ, Yi Y, Li JE, Wang ZJ, Gao J, Nie SP, Peng S, Xie MY (2015). Advances on Bioactive polysaccharides from medicinal plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56(sup1):S60-84
- You L, Gao Q, Feng M, Yang B, Ren J, Gu L, Cui C, Zhao M (2013). Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities. *Food Chem.* 4(138):2242-2249.