

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE



DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

Activité antiproliférative et mécanismes d'action de quelques plantes médicinales Camerounaises

THESE DE DOCTORAT/Ph.D EN BIOCHIMIE

Soutenue le 19 Février 2015

Par

CHOUMESSI TCHEWONPI Aphrodite

Matricule : 01W126

DEA en Biochimie

Devant un jury composé de :

Président : ETOA François-Xavier, *Professeur*, Université de Yaoundé I

Rapporteur : PENLAP BENG Véronique, *Maître de Conférences*,
Université de Yaoundé I


Membres : KUIATE Jules Roger, *Professeur*, Université de Dschang

NDOM Paul, *Maître de Conférences*, Université de Yaoundé I

MOUNDIPA FEWOU PAUL, *Professeur*, Université de Yaoundé I



Année académique 2014 - 2015

<p>UNIVERSITE DE YAOUNDE I FACULTE DES SCIENCES Division de la Programmation et du suivi des Activités Académiques</p>		<p>The University of Yaounde I Faculty of Science Division of Programming and follow up of Academic Affairs</p>
<p>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</p>	<p>LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF</p>	

ANNEE ACADEMIQUE 2013/2014
(Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 15 Octobre 2014
ADMINISTRATION

DOYEN : BILONG Paul, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA : NJOPWOUO Daniel, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE : DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DRC : OWONO OWONO Luc Calvin, Maître de Conférences

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche : ABOSSOLO Monique,
Chargé de cours

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., Chargé de
Cours

1-DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BCH) (41)			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	MOUNDIPA FEWOU PAUL	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	MBACHAM Wilfred	Professeur	En poste
3	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
4	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Maître de Conférences	En poste
5	BOUDJEKO Thadée	Maître de Conférences	En poste
6	FEKAM BOYOM Fabrice	Maître de Conférences	En poste
7	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
8	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
9	MINKA Samuel	Maître de Conférences	En poste
10	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
11	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
12	ATOGHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
13	BELINGA née NDOYE FOE Marie F.	Chargé de Cours	<i>Chef DAF/FS</i>
14	BIGOGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
15	BIYITI BI ESSAM née AKAM ADA L.	Chargé de Cours	<i>L G. MINRESI</i>
16	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste

17	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
18	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Chargé de Cours	En poste
19	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
20	EVEHE BEBANDOUE Marie-Solange	Chargé de Cours	En poste
21	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
22	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargé de Cours	<i>CE SEP MINESUP</i>
23	NGONDI Judith Laure	Chargé de Cours	En poste
24	Palmer NIASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
25	NJAYOU Frédéric Nico	Chargé de Cours	En poste
26	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
27	WAKAM née NANA Louise	Chargé de Cours	En poste
28	AKINDEH MBUH NJI	Assistant	En poste
29	BEBEE FATIMATOU	Assistante	En poste
30	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Assistante	En poste
31	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
32	DJUUKWO NKONGA Ruth Viviane	Assistante	En poste
33	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
34	FONKOUA Merlin	Assistant	En poste
35	KOTUE KAPTUE Charles	Assistant	En poste
36	LUNGA Paul KAILAH	Assistant	En poste
37	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistant	En poste
38	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary A.	Assistante	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistante	En poste
40	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Assistant	En poste
41	TIENTCHEU DJOKAM Leopold	Assistant	En poste
2-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE (B.P.A) (45)			
1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NGASSAM Pierre	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En poste
8	NOLA Moïse	Maître de Conférences	En poste
9	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
10	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>MINSANTE</i>
11	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	<i>CT2 MIN. ENERGIE</i>
12	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C. S. MINRESI</i>

13	NJAMEN Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
14	TAN Paul	Maître de Conférences	En poste
15	TCHUEM TCHUENTE Louis	Maître de Conférences	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
16	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Chargé de Cours	En poste
17	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
18	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
19	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
20	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
21	DZEUFIE'DJOMENI Paul Désiré	Chargé de Cours	En poste
22	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
23	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	En poste
24	KEKEUNOU Sévilor	Chargé de Cours	En poste
25	MEGNEKOU Rosette	Chargé de Cours	En poste
26	MONY NTONE Ruth	Chargé de Cours	En poste
27	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
28	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
29	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
30	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Chargé de Cours	En poste
31	ATSAMO Albert Donatien	Assistant	En poste
32	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
33	KANDELA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
34	KOGA MANG'DObara	Assistant	En poste
35	LEUKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Assistant	En poste
36	MAHOB Raymond Joseph	Assistant	En poste
37	MBENOUN MASSE Paul Serge	Assistant	En poste
38	MOUNGANG NGAMENI Luciane	Assistant	En poste
39	MUH Benrice FIEN	Assistant	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
41	NGOUATEU NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
42	NJUA Clarisse YAFI	Assistante	En poste
43	OBI OBEN Esther	Assistante	En poste
44	TADU Zéphirin	Assistant	En poste
45	YEDE	Assistant	En poste
3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE (B. P. V) (25)			
1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	AMBANG Zachée	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / FSE</i>
3	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
4	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste

5	MOSSEBO Dominique Claude	Maître de Conférences	En poste
6	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Chargé de Cours	En poste
10	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Chargé de Cours	<i>Insp. Services MINESUP</i>
12	MBOLO Marie	Chargé de Cours	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Chargé de Cours	<i>CE/MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Chargé de Cours	En poste
16	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
17	NSOM ZAMO Annie Claude	Chargé de Cours	<i>Expert national / UNESCO</i>
18	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
19	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
20	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Assistante	En poste
22	MAFFO MAFFO Nicole	Assistante	En poste
23	NGALLE Hermine BILLE	Assistante	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistante	En poste
4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.1.) (33)			
1	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
2	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Directeur MINESUP</i>
3	NJOPWOOU Daniel	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
4	AGWARA ONDOH Moïse	Maître de Conférences	<i>Insp Génér. MINPMEA</i>
5	AVOM Jérôme	Maître de Conférences	<i>Directeur IAI Gabon</i>
6	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée mission P.R.</i>
7	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
8	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
9	GHOGOMU Paul MINGO	Maître de Conférences	<i>Directeur Cabinet PM</i>
10	KETCHA MBADCAM Joseph	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
11	LAMINSI Samuel	Maître de Conférences	En poste
12	MELO née CHINJE Uphie F.	Maître de Conférences	<i>Directeur Mipromalo</i>
13	NANSEU Charles Péguy	Maître de Conférences	En poste
14	NENWA Justin	Maître de Conférences	En poste
15	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen / UBda</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>S. G. MINESUP</i>

17	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
18	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean claude	Chargé de Cours	En poste
22	KONG SAKEO	Chargé de Cours	<i>C. M. au P. M.</i>
23	NJOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
24	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
25	SIGNING Pierre	Chargé de Cours	En poste
26	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
27	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
28	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awoua	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	NDI Julius NSAMI	Assistant	En poste
5- DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (34)			
1	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/DSSE</i>
2	GHOGOMU TIH Robert Raphaël	Professeur	En poste
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU Bonaventure	Professeur	<i>Chef de Dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
6	NKENGFAK Augustin Ephraïm	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>CS Rectorat / UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	VD / UB
12	KAPNANG Henriette	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Didérot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C. UYI</i>
17	TIH née NGO BILONG Anastasie	Maître de Conférences	En poste
18	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
19	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
20	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste

21	KENMOGNE Marguerite	Chargé de Cours	En poste
22	MBAZOA née DJAMA Céline	Chargé de Cours	En poste
23	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
24	NGO MBING Josephine	Chargé de Cours	En poste
25	NGONO BIKOBO Dominique S.	Chargé de Cours	En poste
26	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	En poste
27	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
28	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
29	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
30	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
31	FOTSO WABO Ghislain	Assistant	En poste
32	KAMTO Eutrophe Ledoux	Assistant	En poste
33	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
34	NGOMO Orléans	Assistant	En poste
6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)			
1	TCHUENTE Maurice	Professeur	<i>PCA UB</i>
2	ATSA ETOUNDI Roger	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt./CD MINFOPRA</i>
3	FOTSO Pauline Laure	Maître de Conférences	<i>Vice-Recteur UDs</i>
4	FOUDA NDJODO Marcel	Maître de Conférences	<i>IA1 MINESUP/ Chef Dpt ENS</i>
5	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
6	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO PONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
11	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
12	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
13	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
14	DJOUWE MEFFEJA Merline	Assistante	En poste
15	EBELE Serge	Assistant	En poste
16	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
17	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
18	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
19	KENFACK DONGMO Clauvice Viliane	Assistant	En poste
20	KOUOKAM KOUOKAM Etienne A.	Assistant	En poste
21	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
22	MONTHE DJIAEU Valery Martial	Assistant	En poste
24	OMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste

25	TAPAMO Hyppolite	Assistant	En poste
7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUE (MA) (35)			
1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>DPI UYII</i>
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	NGUETSENG Gabriel	Professeur	<i>Chef du CUTI UYI</i>
5	NOUTCHEGUEME Norbert	Professeur	En poste
6	EMVUDU WONO Yves	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule. MINESUP</i>
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie Blaise	Maître de Conférences	En poste
8	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
9	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
10	WAMON François	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	En poste
12	AYISSI Raoult Domingo	Chargé de Cours	En poste
13	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
14	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
18	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
21	NOUNDJEU Pierre	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
25	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
26	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
27	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
28	MBELE BEDIMA Martin	Assistant	En poste
29	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
30	NGUEFACK Bertrand	Assistant	En poste
31	NIMPA PEFOUNKEU ROMAIN	Assistant	En poste
32	POLA DOUNDOU Emmanuel	Assistant	En poste
33	TAKAM SOH Patrice	Assistant	En poste
34	TAN AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
35	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin E.	Assistant	En poste
8- DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			

1	ETOA François-Xavier	Professeur	<i>Chef de Dépt., CT/PM</i>
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef Div. recherche IMPM</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
5	BOYOMO ONANA	Chargé de Cours	En poste
6	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
7	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
8	NYEGUE Maximilienne Ascencion	Chargé de Cours	En poste
9	RIWOM Sara Honorine	Chargé de Cours	En poste
10	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Assistant	En poste
12	NJIKI BIKOY Jacky	Assistante	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste
9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (40)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	<i>Vice-Doyen/DRC</i>
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3	NJOMO Damien	Professeur	En poste
4	WOAFO Paul	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	En poste
6	BEN-BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
7	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef de Dépt. UN</i>
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
9	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
10	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>Recteur UY II</i>
11	PEMHA Elkana	Maître de Conférences	En poste
13	TABOD Charles TABOD	Maître de Conférences	<i>Doyen UBda</i>
14	TCHAWOUA Clément	Maître de Conférences	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
16	BIYA MOTTO Frédéric	Chargé de Cours	<i>Dir. Gén.B.MEKIM</i>
17	DJUIDJE KENMOE G. épouse A. KAZE	Chargé de Cours	En poste
18	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean-Sire	Chargé de Cours	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Chargé de Cours	En poste
21	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En poste
22	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
23	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste
24	MBONO SAMBA Yves Cliristian	Chargé de Cours	<i>Vice Doyen Uds</i>
25	NÀNA NBENDJO Blaise	Chargé de Cours	En poste

26	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
26	OBONOU MARCEL	Chargé de Cours	En poste
27	SAIDOU	Chargé de Cours	En poste
28	SIEWE SIEWE Martin	Chargé de Cours	En poste
29	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
30	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
31	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
32	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En poste
33	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
34	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
35	ABDOURAHIMI	Assistant	En poste
36	BODO Bernard	Assistant	En poste
37	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
38	ENYENGUE NYAM F. Epse BELINGA	Assistant	En poste
39	MBINACK Clément	Assistant	En poste
40	MBOUSSI NKOMIDIO Aissatou	Assistant	En poste
10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (43)			
1	BILONG PAUL	Professeur	<i>Doyen / Chef de Dépt.</i>
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Doyen / UN</i>
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>D.I.P.D. UYI</i>
7	MVONDO ONDOA Joseph	Maître de Conférences	En poste
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NDJIGUI Paul-Désiré	Maître de Conférences	En poste
10	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C / UM</i>
11	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
12	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
13	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
14	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	<i>Chef D.A.A.S.R.</i>
15	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
16	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir.P. Barrage Memve'ele</i>
17	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>CS / MINMIDT</i>
18	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>C.E.A MINIMDT</i>
19	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	En poste
20	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	En poste
21	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste

22	LIENOU Gaston	Chargé de Cours	En poste
23	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	En poste
24	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
25	MOUNDI Amidou	Chargé de Cours	<i>Inspecteur 1. MINIMDT</i>
26	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
27	NGUETCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	En poste
29	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
30	NYECK Bruno	Chargé de Cours	<i>S/Directeur/MINMIDT</i>
31	ONANA Vincent	Chargé de Cours	<i>C. S. MINIMDT</i>
32	TCHAKOUNTE J. épouse. NUMBEM	Chargé de Cours	En poste
33	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
34	YENE ATANGANA Joseph Q.	Chargé de Cours	<i>Chef Div. MINFOF</i>
35	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>S. G. MINTP</i>
36	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En poste
37	FUH Calistus Gentry	Assistant	<i>Sec. d'Etat / MINMIDT</i>
38	METANG Victor	Assistant	En poste
39	NGO BELNOUN Rose Noël	Assistante	En poste
40	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
41	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux 1	Assistant	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Assistant	<i>CS / MINMIDT</i>
43	TENGA Jean Pierre	Assistant	En poste

DEDICACE

À mes parents, Monsieur et Madame **TCHEWONPI**

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de la contribution de plusieurs personnes et organismes dont je ne saurais énumérer de manière exhaustive. Ainsi que l'on soit cité ou non dans les lignes qui suivent, il n'en demeure pas moins significatif la gratitude que je porte à l'endroit de vos différentes contributions. J'adresse mes sincères remerciements aux:

i) **Personnalités:**

Au **Prof. PENLAP BENG Véronique** pour l'accueil dans son équipe de recherche, la proposition et la supervision de ce travail. Votre disponibilité, votre rigueur et vos critiques constructives ont été déterminantes dans la réalisation de ce travail. Je tiens à vous exprimer ici ma profonde gratitude.

Au **Prof. ASONGANYI TAZOACHA** qui a accepté de superviser ce travail malgré ses multiples occupations et dont la rigueur m'a été d'un grand atout.

Au **Chef de département de Biochimie Prof. MOUNDIPA FEWOU Paul** et à tous les **enseignants** du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour la formation académique et intellectuelle dont ils m'ont fait bénéficier.

Aux Profs. **Annie VALETTE**, **Bernard DUCOMMUN** et à tous les membres de l'équipe 'innovations pour l'étude de la prolifération en 3D (IP3D)' de l'Institut des Technologies Avancées du Vivant (ITAV- Université de Toulouse, France) qui ont accepté de m'accueillir dans leur équipe, me permettant ainsi de réaliser une partie importante de mon travail de recherche.

A **Mathieu DANEL** et **Stefan CHASSAING** de la plate forme de Chimie (ITAV- Toulouse, France) pour le travail effectué lors du fractionnement et de l'élucidation de la structure chimique du composé actif.

Au **Dr. Paulo OLIVEIRA** et à toute l'équipe du Centre de Neurosciences et de Biologie Cellulaire de l'Université de Coimbra (Portugal) pour m'avoir encadré durant la réalisation de mes travaux dans son laboratoire.

Aux **Prof. Hans K. BIESALSKI** et **Prof. Donatus NOHR** et à toute d'équipe du laboratoire de l'Institut de Biologie-chimie et Nutrition de l'Université de Hohenheim (Allemagne) pour l'accueil dans leur équipe de recherche et pour avoir encadré mon travail pendant la durée de mon stage.

Au **Prof. NDOM Paul** et à toute l'équipe du Service d'Oncologie Médicale de l'Hôpital Général de Yaoundé pour les données statistiques sur le cancer au Cameroun.

Aux **Drs. ASONGALEM A Emmanuel, PIEME A Constant, NANA Paulin** et **MANFO Faustin** pour leurs conseils et leur soutien à la réalisation de ce travail.

A **TETO Georges, NGOUDJOU Rose, NONO Borgia**, du laboratoire de Biochimie et Immunologie de la Faculté de Médecine et Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I.

A mon époux et mes enfants pour leur patience et leurs encouragements.

A la famille **TCHEWONPI** pour son soutien multiforme et leurs encouragements.

Aux familles **SONGO, SONNA** et **FOKO** pour leurs encouragements.

A **KANKEU Patrice** et sa famille pour leur soutien.

A **DONKENG D Valerie, MENKEM Elisabeth** et **ASSONFACK Béatrice épouse Song** pour leur soutien et leurs contributions.

A tous mes amis et connaissances.

ii) **Organismes qui m'ont accordé des stages de laboratoire :**

A la Coopération Française à travers l'ambassade de France pour m'avoir permis de réaliser une part importante de mon travail au cours de mon stage à l'université de Toulouse (ITAV).

Au 'Coimbra group' pour le financement de mon stage à l'Université de Coimbra, Portugal.

Au ' Food Security Center' de l'Université de Hohenheim qui m'a également permis de réaliser un stage à l'Université de Hohenheim.

A tous, merci.

iii) Au **SEIGNEUR DIEU** qui a rendu possible ce travail, a fait de moi ce que je suis et m'a comblé de ces grâces. A toi Seigneur l'honneur et la gloire.

SOMMAIRE

	Page
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DEDICACE.....	xi
REMERCIEMENTS	xii
SOMMAIRE.....	xiv
RÉSUMÉ.....	xviii
ABSTRACT	xx
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxii
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
LISTE DES FIGURES	xxiv
INTRODUCTION	1
I REVUE DE LITTÉRATURE ET PROBLEMATIQUE.....	3
I.1 LES PLANTES MÉDICINALES COMME SOURCES DE MOLECULES CYTOTOXIQUES	3
I.1.1 Médicaments utilisés en chimiothérapie provenant des plantes.....	3
I.1.2 Plantes médicinales et cancers	5
I.1.2.1 Plantes non comestibles	5
I.1.2.2 Plantes comestibles	6
I.1.3 Ethnobotaniques des plantes d'intérêt.....	7
I.1.3.1 <i>Fagara leprieuri</i> Guill. & Perr (Rutaceae).....	8
I.1.3.2 <i>Fagara xanthoxyloides</i> Waterm. (Rutaceae).....	8
I.1.3.3 <i>Xylopia aethiopica</i> Dunal A. Rich. (Annonaceae).....	8
I.1.3.4 <i>Monodora myristica</i> (Gaertn.) Dunal (Annonaceae)	9
I.1.3.5 <i>Leea guineensis</i> G. Don (Leeaceae).....	9
I.1.4 Travaux antérieurs.....	9
I.1.4.1 <i>Fagara leprieuri</i> Guill. & Perr (Rutaceae).....	9
I.1.4.2 <i>Fagara xanthoxyloides</i> Waterm (<i>F. xanthoxyloides</i> , Rutacée).....	10
I.1.4.3 <i>Xylopia aethiopica</i> Dunal A. Rich. (Annonaceae).....	10
I.1.4.4 <i>Monodora myristica</i> (Gaertn.) Dunal (Annonaceae)	10
I.1.4.5 <i>Leea guineensis</i> G. Don (Leeaceae).....	11
I.2 LES CANCERS	11
I.2.1 Historique des cancers.....	12
I.2.2 Processus moléculaires de cancérogénèse.....	12

I.2.2.1 Phase d'initiation.....	12
I.2.2.2 Phase de promotion	13
I.2.2.3 Phases de progression et invasion	14
I.2.3 Classification des cancers.....	15
I.2.3.1 Tumeurs bénignes et malignes	15
I.2.3.2 Les cancers épithéliaux : carcinome et adénocarcinome	15
I.2.3.3 Les cancers non épithéliaux	16
I.2.4 Le cycle cellulaire	18
I.2.4.1 Généralités.....	18
I.2.4.2 Points de contrôle du cycle cellulaire.....	20
I.2.4.3 Cycle cellulaire et cancers.....	21
I.2.5 L'apoptose.....	22
I.2.5.1 Généralités.....	22
I.2.5.2 Apoptose et cancers.....	27
I.3 RELATION POUVOIR ANTIOXYDANT ET ACTIVITÉ ANTIPROLIFÉRATIVE ..	29
I.4 PROBLEMATIQUE	30
II MATÉRIEL ET MÉTHODES	32
II.1 MATÉRIEL	32
II.1.1 Matériel végétal	32
II.1.2 Cellules utilisées	32
II.1.3 Animaux d'expérience	33
II.1.4 Réactifs	33
II.2 MÉTHODES.....	34
II.2.1 Préparation des différents extraits.....	34
II.2.1.1 Extraction de l'acide phytique	34
II.2.1.2 Extraction de la L-DOPA	34
II.2.1.3 Extraction des phénols totaux par le méthanol 1% HCl	34
II.2.1.4 Extractions à l'éthanol 70 % et à l'eau.....	35
II.2.2 Evaluation de l'activité antiproliférative	35
II.2.2.1 Effet des extraits éthanol 70% sur la prolifération des cellules cancéreuses	35
II.2.2.2 Étude de la relation concentration – effet	36

II.2.3	Evaluation du mode d'action antiprolifératif des extraits.....	38
II.2.3.1	Activité de la caspase -3	38
II.2.3.2	Analyse de la condensation de l'ADN.....	40
II.2.3.3	Effet des extraits sur la mitochondrie	41
II.2.4	Propriétés antioxydantes de <i>F. leprieuri</i> , <i>F. xanthoxyloides</i> et <i>X. aethiopica</i> ...	43
II.2.4.1	Quantification des antioxydants présents dans les échantillons	43
II.2.4.2	Evaluation de l'activité antioxydante.....	48
II.2.5	Caractérisation de l'activité antiproliférative de <i>Xylopiya aethiopica</i> et purification de la molécule la plus active	49
II.2.5.1	Viabilité sur les fibroblastes normaux	49
II.2.5.2	Effet de <i>X. aethiopica</i> sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN	50
II.2.5.3	Analyse HPLC de l'extrait éthanol 70% de <i>X. aethiopica</i>	51
II.2.5.4	Identification de la fraction la plus active par le réactif WST-1.....	52
II.2.5.5	Analyse de la fraction la plus active sur des marqueurs de l'apoptose.....	52
II.3	ANALYSES STATISTIQUES	54
III	RÉSULTATS ET DISCUSSION	55
III.1	ACTIVITÉ ANTIPROLIFERATIVE DES EXTRAITS	55
III.1.1	Effet des extraits des plantes sur la prolifération de différentes lignées de cellules cancéreuses.....	55
III.1.2	Relation concentration – effet des extraits	56
III.1.2.1	Test de clonogénie sur plastique.....	56
III.1.2.2	Effet des extraits sur la viabilité par le test au WST-1	57
III.1.2.3	Effet des extraits sur la viabilité des cellules MDA-MB 231, MCF 7 et MCF 12 A par coloration des protéines à la sulforhodamine B (SRB).....	59
III.1.3	Discussion partielle.....	66
III.2	EVALUATION DU MODE D'ACTION ANTIPROLIFERATIF DES EXTRAITS .	69
III.2.1	Effet des extraits sur l'activité de la caspase 3	69
III.2.2	Condensation de l'ADN	70
III.2.3	Effet des extraits sur les paramètres mitochondriaux.....	71
III.2.3.1	Effet des extraits sur le potentiel mitochondrial transmembranaire	71
III.2.3.2	Effet sur la respiration / consommation d'oxygène.....	72

III.2.4 Discussion partielle.....	74
III.3 TENEUR EN ANTIOXYDANTS ET PROPRIETES ANTIOXYDANTES	77
III.3.1 Teneur en antioxydant	77
III.3.1.1 Antioxydants quantifiés par spectrophotométrie.....	77
III.3.1.2 Antioxydants quantifiés par chromatographie liquide haute performance	78
III.3.2 Activité antioxydante des extraits.....	79
III.3.2.1 Activité anti-radicalaire sur le radical DPPH°.....	79
III.3.2.2 Analyse de la réduction des ions ferriques (FeSO ₄).....	80
III.3.3 Discussion partielle.....	80
III.4 IDENTIFICATION DE LA MOLECULE ANTIPROLIFERATIVE DE <i>Xylopi</i> <i>aethiopica</i>	82
III.4.1 Effet de <i>X. aethiopica</i> sur la prolifération des fibroblastes normaux	82
III.4.2 Effet de l'extrait de <i>X. aethiopica</i> sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN.....	83
III.4.3 Analyse HPLC de l'extrait EtOH 70% de <i>X. aethiopica</i>	84
III.4.4 Identification de la fraction la plus active de l'extrait de <i>X. aethiopica</i>	85
III.4.5 Caractérisation de l'activité cytotoxique du composé du pic 1	88
III.4.6 Identification du composé du pic 1.....	92
III.4.7 Discussion partielle.....	93
III.5 DISCUSSION GENERALE	96
IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES	100
IV.1 CONCLUSION	100
IV.2 PERSPECTIVES.....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102
ANNEXES	I

RÉSUMÉ

Les fruits de *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (*F. leprieuri*, Rutaceae) et *Fagara xanthoxyloides* Waterm. (*F. xanthoxyloides*, Rutaceae), les amandes de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (*M. myristica*, Annonaceae), les feuilles de *Leea guineensis* G. Don (*L. guineensis*, Leeaceae) et les gousses de *Xylopia aethiopica* Dunal A. Rich (*X. aethiopica*, Annonaceae) sont utilisés en cuisine comme épices (sauf *L. guineensis*) et en médecine traditionnelle pour soigner diverses maladies (y compris les cancers) et infections. Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés antiprolifératives des extraits éthanol 70% (30% eau) sur des lignées de cellules cancéreuses par diverses méthodes et à la purification et l'identification de la molécule responsable de l'activité cytotoxique de l'extrait le plus actif. Pour la réalisation de cet objectif, le travail a été organisé autour de quatre grands points. L'évaluation de l'activité antiproliférative a été réalisée par le test d'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses humaines colorectal (HCT 116), d'ostéosarcome (U2OS), du carcinome du sein (Sum PT 159), de l'adénocarcinome du pancréas (Capan 2 PC) et les cellules leucémiques KG1a et U937, le test de clonogénie sur plastique et le test de viabilité cellulaire (test au WST-1 et à la sulforhodamine B). La caractérisation du mécanisme de l'activité antiproliférative des extraits constituant la deuxième partie du travail a été effectuée à travers l'étude de l'activité de la caspase-3, la condensation de l'ADN nucléaire et les fonctions mitochondriales (potentiel membranaire et respiration). La troisième partie du travail a consisté en l'évaluation des propriétés antioxydantes des différents extraits ainsi qu'à la recherche de corrélation entre activité antiproliférative et antioxydante. Dans la quatrième partie du travail, l'extrait de *X. aethiopica* a été fractionné et la fraction la plus active identifiée et caractérisée.

D'après le test de prolifération cellulaire, l'extrait de *X. aethiopica* inhibe la prolifération des différentes cellules cancéreuses, particulièrement les cellules Capan 2PC ($1 \pm 0,5$ % du contrôle) et U 937 (1 ± 0 % du contrôle) où l'inhibition est complète. *X. aethiopica* a également montré une inhibition de la prolifération des cellules HCT 116 d'après le test d'unités formant colonies ($7,38 \pm 3,01$ % de colonies à $3,1$ $\mu\text{g/ml}$) et les tests de viabilité ($12,03 \pm 4,76$ % du contrôle à 25 $\mu\text{g/ml}$). *F. leprieuri* a montré une activité antiproliférative sur HCT 116 ($69,70 \pm 17,52$ % du contrôle) et U2OS ($72,85 \pm 6,72$ % du contrôle). *F. xanthoxyloides* a inhibé la prolifération des cellules de cancer du sein MDA-

MB 231 et MCF 7 de manière concentration et temps dépendant. Les autres extraits ont montré des activités peu significatives sur la plupart des lignées cellulaires. L'étude du mécanisme qui soutend l'activité antiproliférative a montré une activation de la caspase 3 et une condensation temps dépendant de l'ADN par tous les extraits. Sur la mitochondrie ces extraits ont induit une baisse du potentiel membranaire associée à une hausse de la consommation d'oxygène non couplée à la synthèse d'ATP. Les résultats des tests antioxydants ont montré que *X. aethiopica* est le plus riche en antioxydants (phénols : $68,62 \pm 0,16$ mg équivalent catéchine/g de poudre pour l'extrait méthanol 1% HCl, α et β -carotènes : $2,74 \pm 0,13$ et $2,85 \pm 0,22$ ng/mg de poudre respectivement, γ -tocophérols : $7,05 \pm 0,16$ ng/mg de poudre, lutéine : $20,18 \pm 0,70$ ng/mg), renferme la meilleure activité anti-radicalaire ($90,04 \pm 1,07$ % d'inhibition du DPPH° pour l'extrait méthanol 1% HCl) et réductrice des ions ferriques ($375,67 \pm 0,23$ mM FeSO₄/g de matière sèche). La caractérisation de l'activité cytotoxique de l'extrait total éthanol 70% de *X. aethiopica* (extrait le plus actif) a montré qu'il entraîne la fragmentation de l'ADN et une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire. Par HPLC (UV et SM) quatre fractions ont été isolées de l'extrait éthanol 70% de *X. aethiopica* et le test de viabilité a révélé le composé du pic 1 comme étant le plus actif. Ce dernier induit la fragmentation de l'ADN (dans 37,5% des cellules après 8 h de traitement) et un arrêt des cellules en G1 et a été identifié comme étant un diterpène : l'acide ent -15- oxokaur-16-èn-19-oïque de formule brute C₂₀H₂₈O₃.

Le présent travail montre l'activité antiproliférative et antioxydante des extraits de *X. aethiopica*, *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides*. Les résultats obtenus confirment les épices et les plantes comme sources de nouvelles molécules anticancéreuses.

Mots clés : Plantes (*X. aethiopica*), activité antiproliférative, mitochondrie, cycle cellulaire, dommages à l'ADN, acide ent -15- oxokaur-16-èn-19-oïque.

ABSTRACT

Fruits of *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (*F. leprieuri*, Rutaceae) and *Fagara xanthoxyloides* Waterm. (*F. xanthoxyloides*, Rutaceae), almonds of *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (*M. myristica*, Annonaceae), leaves of *Leea guineensis* G. Don (*L. guineensis*, Leeaceae) and cloves of *Xylopia aethiopica* Dunal A. Rich (*X. aethiopica*, Annonaceae) are used as spices in traditional local foods (except *L. guineensis*) and in traditional medicine to treat various diseases and infections. The present work aimed to study the antiproliferative properties of the 70% ethanol plants extracts on several cancer cell lines by various methods and identify the compound responsible for the most important antiproliferative activity. To achieve this objective, the study was organized in four main points. Firstly, the screening of antiproliferative activity of plants extracts was done on the one hand by the cell proliferation assay of human osteosarcoma (U2OS), colorectal cancer cells (HCT 116), breast carcinoma cells (Sum PT 159), pancreas adenocarcinoma cells (Capan-2 PC) and of leukemia cells KG1a and U937, and on the other hand using clonogenic test and cell viability tests (using WST-1 and sulforhodamine B reagents). Secondly, the mechanism of the antiproliferative activity of extracts was investigated through evaluation of the activity of caspase-3, DNA condensation and mitochondria functions (membrane potential and oxygen consumption). In the third part of the study, antioxidant properties of different extracts was evaluated by determining their antioxidant contents and activities. Finally, *X. aethiopica* extract was analyzed by HPLC coupled to mass spectrometry and the activity of different collected fractions analyzed using the cell viability test using the WST-1 reagent. The most active fraction was identified and characterized.

For the antiproliferative activity, using the cell proliferation assay, *X. aethiopica* extract inhibited the growth of the different cell lines with a highly significant effect on pancreatic cells Capan 2PC (1 ± 0.5 % of the control) and U 937 (1 ± 0 % of the control) which showed no growth upon treatment with that extract. The clonogenic test and the cell viability test revealed significant cytotoxic effects of *X. aethiopica* on HCT 116 (7.38 ± 3.01 % of colonies at $3.1 \mu\text{g/ml}$ and $12.03 \pm 4.76\%$ at $25 \mu\text{g/ml}$). *F. leprieuri* extract also showed an antiproliferative activity mainly on HCT 116 ($69.70 \pm 17.52\%$ of the control) and U2OS ($72.85 \pm 6.72\%$ of the control), while *F. xanthoxyloides* inhibited growth of

breast cancer cell lines MDA-MB 231 and MCF 7. Antioxidant analyses revealed *X. aethiopica* as having the highest antioxidant content (phenols: 68.62 ± 0.16 mg equivalent catechin/g of powder for methanol 1% HCl extract, α and β -carotene : 2.74 ± 0.13 et 2.85 ± 0.22 ng/mg of powder respectively, γ -tocopherols : 7.05 ± 0.16 ng/mg of powder, lutein : 20.18 ± 0.70 ng/mg) and significant free radical scavenging activity (90.04 ± 1.07 % DPPH° inhibition for methanol 1% HCl extract) and ferric reducing power (375.67 ± 0.23 mM FeO₄/g of dry material). The study of the mechanism of the antiproliferative activity showed time dependent activation of caspase 3 and DNA fragmentation by the extracts. In addition, the extracts disrupted the mitochondria membrane potential and increased respiration non-coupled to ATP synthesis. This finding indicates a stimulatory effect of the extracts on the opening of mitochondria transition pore followed by the release out of the mitochondria apoptotic activating compounds. Characterization of *X. aethiopica* 70% ethanol extract showed the induction of DNA fragmentation and cell cycle arrest in S phase. Four fractions were isolated through HPLC analysis of *X. aethiopica* extract and their effects on HCT 116 cells viability showed the compound present in the peak 1 as the most active. The latter caused more DNA fragmentation (in 37.5% of cells after 8 h of treatment) than the total extract and induced cell arrest in G1 phase. It was identified as terpenoid, ent-15-oxokaur-16-en-19-oic acid (EOKA, C₂₀H₂₈O₃).

These findings demonstrate the significant antiproliferative activities and antioxidant properties of *X. aethiopica*, *F. leprieuri* and *F. xanthoxyloides* extracts. Furthermore, a pure compound was isolated from *X. aethiopica* extract and its antiproliferative mechanism delineated. Taken together our study confirms spices and plants as sources of anticancer drugs.

Key words: Plants (*X. aethiopica*), antiproliferative activity, mitochondria, cell cycle, DNA fragmentation, ent-15-oxokaur-16-en-19-oic acid (EOKA).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AIF :	Facteurs inducteurs d'apoptose (<i>Apoptosis inducing facteur</i>)
ASB :	Albumine de sérum bovin
ATP:	Adénosine triphosphate
BHT :	Hydroxytoluène butylé
CHAPS :	3-[(3-Cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
Doxo :	Doxorubicine
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DTT :	Dithiothreitol
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA :	Acide acétique -N,N,N',N'-tétra éthylène glycol-bis (béta-aminoéthyl ether)
F. :	<i>Fagara</i>
FCCP:	Carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone
FL :	Fluorochrome
HEPES:	Hydroxyéthyl Piperazine -2, 2- Ethanesulfonique
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IC50 :	Concentration inhibitrice 50 (<i>Inhibitory concentration 50</i>)
L. :	<i>Leea</i>
L-DOPA :	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
M. :	<i>Monodora</i>
PARP:	Poly(ADP-ribose) polymérase
PMSF :	Phénylméthanesulfonylfluoride
pNA :	p-Nitroaniline
RCR :	Rapport de contrôle respiratoire
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
Smac:	Second activateur mitochondrial des caspases (<i>Second Mitochondrial Activator of Caspases</i>)
SRB :	Sulforhodamine B
TBST :	Tris-Buffered Saline Tween-20
TIC :	courant ionique total (<i>Total ion current</i>)
TLCK :	Tosyllysine Chloromethyl Ketone (hydrochloride)
TNF :	Facteurs nécrotic de tumeurs (<i>Tumor necrosis Factor</i>)
UV :	Ultra-violet
Vit C :	Vitamine C
WST:	Tétrazolium hydrosoluble (<i>Water soluble tetrazolium</i>)
X.:	<i>Xylopi</i>

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I: Quelques composés cytotoxiques isolés des plantes (Mans <i>et al.</i> , 2000 ; Thirumaran <i>et al.</i> , 2007).....	3
Tableau II: Effet des extraits à la concentration de 25 µg/ml sur la croissance des différents types de cellules.....	55
Tableau III: Effet des extraits à différentes concentrations sur la croissance des colonies des cellules HCT 116.....	57
Tableau IV: Effet des extraits à différentes concentrations sur la viabilité des cellules	58
Tableau V: Concentrations inhibitrices 50 (IC50) par analyse au WST-1.....	59
Tableau VI: Concentrations inhibitrices 50 (IC50) par analyse à la SRB.....	65
Tableau VII : Effet des extraits sur la membrane mitochondriale.....	71
Tableau VIII: Phénols totaux dans les plantes.....	77
Tableau IX: Teneur en tocophérols, caroténoïdes et vitamine C.	78
Tableau X: Phénols identifiés par HPLC	79
Tableau XI: Activité antiradicalaire des extraits sur DPPH°	79
Tableau XII: Pouvoir réducteur des extraits sur les ions ferriques.....	80
Tableau XIII : Prolifération cellulaire en présence du composé du pic 1.	88

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: Etapes principales du développement des cancers (Bacac et Stamenkovic, 2008).	18
Figure 2: Points de contrôle activés en cas de dommages à l'ADN (Fischer, 2008).	21
Figure 3: Mitochondrie et mort cellulaire (Tait et Green, 2012).	24
Figure 4: Chaîne respiratoire (Sevin et Girard, 1999).	26
Figure 5: Viabilité des MDA-MB 231 en présence des extraits de <i>F. leprieuri</i> (A), <i>F.</i>	60
Figure 6: Viabilité des cellules MCF 7 en présence des extraits de <i>F. leprieuri</i> (A), <i>F.</i>	62
Figure 7: Viabilité des cellules MCF 12A en présence des extraits <i>F. leprieuri</i> (A), <i>F.</i>	64
Figure 8: Effet de <i>F. leprieuri</i> (A), <i>F. xanthoxyloides</i> (B), <i>X. aethiopica</i> (C) sur l'activité de la caspase 3 des cellules MDA-MB 231.	69
Figure 9: Effet des extraits sur la condensation de l'ADN des cellules MDA-MB 231.	70
Figure 10 : Effet des extraits sur la respiration mitochondriale.	73
Figure 11: Viabilité des fibroblastes normaux en présence de l'extrait 70%EtOH de <i>X.</i> <i>aethiopica</i>	82
Figure 12: Effet de <i>X. aethiopica</i> sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN.	83
Figure 13: Chromatogramme d'ionisation (A), UV (B) de <i>X. aethiopica</i> et collection des différentes fractions (C).	85
Figure 14: Effet des fractions de <i>X. aethiopica</i> sur la viabilité cellulaire de HCT 116.	86
Figure 15: Effet des fractions de <i>X. aethiopica</i> sur le cycle cellulaire et fragmentation de l'ADN après 24h de traitement.	87
Figure 16 : Croissance des colonies des cellules HCT 116 en présence du pic 1.	89
Figure 17 : Effet du pic 1 sur la fragmentation de l'ADN et le cycle cellulaire.	90
Figure 18 : Effet du composé du pic 1 sur la condensation et fragmentation de l'ADN.	91
Figure 19: Effet du composé du pic 1 sur la PARP clivée par Western blot.	92

INTRODUCTION

De nos jours, les maladies chroniques parmi lesquelles les cancers affectent aussi bien les populations des pays en voie de développement que ceux des pays développés. Le cancer est un terme utilisé pour désigner les maladies caractérisées par la division anormale et incontrôlée des cellules. Ces cellules se multipliant anormalement ont la capacité d'envahir d'autres tissus proches ou éloignés via le sang et le système lymphatique. Le cancer constitue une préoccupation profonde de santé publique en raison de son incidence et de ses diverses causes et symptômes (WHO, 2007). En 2007, le cancer a été à l'origine de 7,3 millions de décès ; soit 13% de mortalité mondiale. Environ 80 % de ces décès se sont produits dans les pays à faible revenu ou à revenu intermédiaire et d'après les projections, ce nombre devrait augmenter pour atteindre 12 millions en 2030 à l'échelle mondiale (OMS, 2008, 2009). Aussi, à l'échelle mondiale, le cancer du sein est le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes (soit 23% des nouveaux cas), il est également la cause première de décès par cancer chez les femmes (soit 14%). Ces statistiques concordent avec ceux du Service d'Oncologie Médicale de l'hôpital Général de Yaoundé (SOMHGY) au Cameroun qui montrent en 2011 le cancer du sein comme le plus diagnostiqué, soit 29,8% des cas (SOMHGY, 2012). 50% de cancer du sein et 70% de décès enregistrés se retrouvent dans les pays en développement (Institute of Medicine, 2007). Chez l'homme, le cancer du poumon est le plus diagnostiqué (soit 17% des nouveaux cas), et est responsable d'une grande proportion de décès (23%) (Jemal *et al.*, 2011 ; IARC, 2011). Cependant d'après les données de SOMHGY (2012), les cancers des vaisseaux, des ganglions et du sang sont les plus diagnostiqués chez les hommes et représentent respectivement 13,5 ; 9,9 ; 8,5% des cas de cancers diagnostiqués. Toutefois les diagnostics tardifs dus à des facteurs tels que l'ignorance des populations, l'inaccessibilité des principaux centres de prise en charge, le faible ratio oncologues-patients (2 oncologues pour 18,8 millions de personnes) pourraient justifier les données statistiques du Cameroun (Price *et al.*, 2012). A ceci il faut ajouter le coût relativement élevé du traitement comparé aux revenus moyens des ménages dans les pays en développement (dont le Cameroun) qui retarde ou rend impossible ce diagnostic (Ekortarl *et al.*, 2007).

En clinique, la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie sont les méthodes les plus employées pour le traitement des cancers; mais elles présentent plusieurs effets secondaires et dans la plupart des cas, la prolifération de cellules cancéreuses survivantes continue. Le recours aux produits naturels et extraits de plantes pour se soigner reste

d'actualité dans de nombreuses régions du monde. En effet, les plantes médicinales constituent une source importante de diverses molécules chimiques et principes actifs utilisés comme médicaments parmi lesquels des agents anticancéreux (Nassr-Allah *et al.*, 2009). Au vu de ce qui précède, la recherche de nouveaux cytotoxiques issus des plantes s'avère nécessaire et importante pour une amélioration de la prise en charge des malades du cancer.

I REVUE DE LITTÉRATURE ET PROBLEMATIQUE

I.1 LES PLANTES MÉDICINALES COMME SOURCES DE MOLECULES CYTOTOXIQUES

I.1.1 Médicaments utilisés en chimiothérapie provenant des plantes

L'homme a pendant longtemps utilisé les substances naturelles pour se soigner. Les plantes en particulier ont représenté et représentent encore les substances naturelles les plus utilisées en médecine traditionnelle dans la plupart des cultures (Bakar *et al.*, 2010). Avec le développement de la chimie à la fin du 19^{ème} siècle, les plantes ont été minutieusement étudiées pour la découverte et la compréhension de leurs propriétés thérapeutiques (Beutler, 2009).

Les plantes médicinales se sont ainsi révélées comme étant une source importante de molécules utilisées dans la lutte contre diverses maladies parmi lesquels les cancers. Le tableau I fait la description de quelques cytotoxiques développés à partir des plantes.

Tableau I: Quelques composés cytotoxiques isolés des plantes (Mans *et al.*, 2000 ; Thirumaran *et al.*, 2007)

Composés cytotoxiques	Type de tumeurs cibles	Mécanismes d'action	Plantes sources
Vinblastine, vincristine	Hématologique et solide	Inhibition de la polymérisation de la tubuline	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)
Etoposide, teniposide	Hématologique et solide	Inhibition de la topoisomérase 2	<i>Podophyllum peltatum</i> , <i>P. emodi</i> (Berberidaceae)
Paclitaxel, docetaxel	Solide	Promotion de la stabilisation de la tubuline	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)
Irinotecan, topotecan, 9-aminocamptothecin, 9-nitrocamptothecin	Solide	Inhibition de la topoisomérase 1	<i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)
Homoharringtonine	Hématologique	Inhibition de l'ADN alpha polymérase	<i>Harringtonia cephalotaxus</i> (Cephalotaxaceae)
Elliptinium	Solide (cancer sévère du sein)	Inhibition de la topoisomérase 2	<i>Bleekeria vitensis</i> (Apocynaceae)
Flavopiridol	Solide et hématologique	Inhibition des kinases dépendantes des cyclines.	<i>Amoora rohituka</i> (Maliaceae), <i>Dysoxylum binectariferum</i> (Maliaceae)

Les différents agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie atteignent les cellules cancéreuses au moment de la division cellulaire. Ces cytotoxiques peuvent agir de manière spécifique ou non à une étape ou l'autre de la division cellulaire, ce qui constitue un inconvénient dans l'usage de ces molécules. En effet, les cellules normales très actives du point de vue de la division cellulaire (cellules sanguines ou de la peau ou des muqueuses du tube digestif) seront également des cibles des cytotoxiques. Les cytotoxiques utilisés peuvent avoir divers mécanismes d'action :

- La gencitabine (un anti-pyrimidique) est un cytotoxique ressemblant à la cytosine qui une fois absorbée par la cellule, va inhiber la biosynthèse des acides nucléiques nécessaires à la division cellulaire.

- Les sels de platine parmi lesquels la cisplatine se fixent par leur atome de chlore à l'atome d'azote en position 7 de la guanine de part et d'autre des deux chaînes de l'ADN formant des ponts inter ou intra brins qui sont réparables très lentement.

- L'irinotécan et le topotécan sont des anti-topoisomérases 1 qui empêchent la duplication appropriée de l'ADN. Couplés à d'autres cytotoxiques, ils induisent l'apoptose (Chauhan et Anderson, 2005). Il est à noter que ce sont les métabolites de ces molécules qui sont responsables de l'activité cytotoxique observée.

- L'étoposide encore appelé VP 16 est l'un des cytotoxiques les plus utilisés en chimiothérapie. C'est un anti-topoisomérase 2 qui empêche l'ADN de se dérouler pour la duplication en vue de la division cellulaire. Il induit également la mort cellulaire par apoptose qui se produirait par activation de la cascade des caspases (Düringer *et al.*, 2005).

- La doxorubicine quant à elle est un agent qui s'intercale dans les espaces plats entre les bases de l'ADN double brin rendant rigide sa structure. Il bloque l'activité de la topoisomérase 2 et agit également de manière non spécifique sur le cycle cellulaire en empêchant la transcription et la replication de l'ADN (Thirumaran *et al.*, 2007).

- Le paclitaxel entraîne un arrêt des cellules en phase G2M. Il se fixe aux microtubules et entraîne une polymérisation de la tubuline conduisant à la stabilisation des microtubules. Pendant la mitose, il perturbe la dynamique du fuseau mitotique empêchant son fonctionnement normal, bloquant ainsi la division cellulaire (Hu et Kavanagh, 2005 ; Thirumaran *et al.*, 2007).

- Le flavopyridol, agent anticancéreux utilisé en clinique (en termes de nanomolaire), est une molécule inhibitrice des kinases CDK2, CDK4 et CDK6. Cette action se traduit par un arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G1/S et G2/M. A côté de l'inhibition du cycle

cellulaire, il induit également la mort cellulaire par apoptose via l'activation des caspases et l'inhibition de gènes codant pour la cycline D (Thirumaran *et al.*, 2007).

Notons qu'en clinique, les molécules cytotoxiques sont souvent utilisées en combinaison soit pour une meilleure efficacité du traitement ou pour parer à la résistance développée par les cellules due à l'utilisation d'un seul cytotoxique.

La recherche de nouvelles molécules cytotoxiques pour des cellules cancéreuses reste d'actualité pour une plus grande compréhension de leur valeur biologique et de leur diversité structurale (Conforti *et al.*, 2008). Il s'agit aussi de la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses qui détruiraient les cellules cancéreuses avec une toxicité minimale sur les cellules normales (Lee *et al.*, 2009). Plusieurs plantes sont encore utilisées de manière basique pour le traitement et la prévention des cancers. Ainsi, plusieurs plantes sont décrites dans la littérature comme ayant des propriétés antiprolifératives.

I.1.2 Plantes médicinales et cancers

Plusieurs plantes sont décrites dans la littérature comme douées d'activité antiproliférative sur diverses cellules cancéreuses. Il s'agit de plantes ou de parties de plantes utilisées en médecine traditionnelle ou de plantes utilisées dans l'alimentation comme fruits, légumes ou épices.

I.1.2.1 Plantes non comestibles

Les extraits éthanol sont les plus utilisés pour l'étude des propriétés antiprolifératives. C'est le cas des racines de *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk (Umbelliferae) dont l'extrait éthanol montre une activité cytotoxique sur les cellules humaines de cancer du sein MCF 7, MDA-MB-468 et est également doué d'activité antioxydante (Tai et Cheung, 2007). Il en est de même pour l'extrait des racines de *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae) qui, jusqu'à la dose 100 µg/ml, n'inhibe pas la prolifération des cellules de cancer du sein MCF 7. Mais l'analyse de ces fractions montre que l'une inhibe la prolifération de ces cellules tandis que l'autre active plutôt leur croissance (Wang *et al.*, 2010). L'activité antiproliférative de l'extrait éthanol des rhizomes de *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae) est également décrite sur les cellules leucémiques HL 60. Celle-ci se caractérise par une inhibition de la division cellulaire précédé d'une accumulation des cellules en prophase, entraînant une induction de l'apoptose (Majewska *et al.*, 2006). *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae) est une autre

plante dont l'extrait éthanol des fruits est également décrit comme doué de propriétés antiprolifératives sur les cellules humaines de cancer hépatique MHCC97H. Cette activité s'effectue par une induction dose-dépendante de l'apoptose accompagnée d'une baisse du potentiel de la membrane mitochondriale, libération de la cytochrome C et activation des caspases 9 et 3 (Li *et al.*, 2009).

L'extrait méthanol est un peu moins utilisé comme solvant d'extraction pour la préparation des extraits de plantes. C'est le cas d'*Agapetes megacarpa megacarpa* W.W. Smith (Ericaceae) dont l'extrait méthanol des rhizomes montre une activité antiproliférative sur les cellules de cancer du sein MCF-7 et MDA-MD-231 et sur les cellules de cancer du poumon NCI-H1299 ; la mort cellulaire se faisant par apoptose (Alongkornsopit *et al.*, 2011). A côté des plantes non comestibles, des plantes couramment utilisées dans l'alimentation font également l'objet de détermination d'activités antiprolifératives.

I.1.2.2 Plantes comestibles

La consommation des fruits, légumes et épices est souvent associée à la baisse ou à la réduction des risques de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers (Sun *et al.*, 2002 ; Boivin *et al.*, 2009). Comme pour les plantes non comestibles, divers extraits sont très souvent préparés pour l'étude des propriétés antiprolifératives. Tout d'abord, l'activité antiproliférative de quelques fruits est décrite sur les cellules de cancer de foie HepG 2. Ainsi, dans l'ordre décroissant, les extraits phénols du lemon, de la pomme, de la fraise, des raisins rouges, de la banane et du pamplemousse sont antiprolifératifs (Sun *et al.*, 2002). En plus, les produits dérivés de la pomme (jus de pomme, extrait de polyphénols de pomme) présentent un potentiel préventif des cancers puis une activité antimutagénique et antiproliférative par induction de l'apoptose *in vitro*. Enfin, ces produits dérivés de la pomme préviennent les cancers de la peau, du sein et du colon *in vivo* sur des animaux de laboratoire (Gerhauser, 2008). De même, les extraits phénols d'épinards, de choux, de poivron rouge et d'oignon sont antiprolifératives par ordre décroissant sur les cellules HepG 2 (Chu *et al.*, 2002). Le jus de diverses variétés d'oignons, des crucifères (choux) et d'ail inhibent la prolifération des cellules de glioblastomes U87 et la croissance des fibroblastes normaux NHDF même si l'inhibition de la croissance de ces dernières est moins importante comparée à celle des U87 (Boivin *et al.*, 2009). Une étude effectuée sur plusieurs plantes méditerranéennes utilisées dans l'alimentation révèle après 48h de traitement que *Cynara*

cardunculus L. subsp. *cardunculus* (Asteraceae) est antiproliférative sur les cellules de cancer de la peau C32 et du rein ACHN tandis que *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) (utilisée comme épice) est cytotoxique sur les cellules de cancer du sein MCF7. *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) quant à elle est antiproliférative sur C32 (Conforti *et al.*, 2008). Les propriétés antiprolifératives des champignons comestibles sont également démontrées et varient en fonction de leur couleur : les extraits méthanoliques de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) et de *Pleurotus salmoneostramineus* (Pleurotaceae) inhibent la prolifération des cellules de cancer du colon HT 29 ; ces extraits sont également antioxydantes (Kim *et al.*, 2009). Le miel, aliment consommé partout dans le monde, est aussi important dans la prévention des cancers. En effet, une étude *in vitro* montre que le miel issu de *Koompassia excelsa* (Fabaceae) empêche la prolifération des cellules de cancer du sein (MCF 7, MDA-MB 231) et du cancer cervical (Hela) ; aucune cytotoxicité n'étant observée sur les cellules normales du sein (MCF 10A). La mort cellulaire observée se fait par apoptose et est accompagnée par une baisse du potentiel membranaire mitochondriale et une activation des caspases 3, 7 et 9 (Fauzi *et al.*, 2011). La pellicule de son brun du riz (aliment essentiel de près de la moitié de la population mondiale) attire également l'attention des chercheurs. L'extrait méthanolique de la pellicule de son du riz Njavara du sud de l'Inde (riz utilisé pour ses propriétés médicinales) se révèle également comme antiprolifératif. En fait, ces extraits méthanoliques sont riches en polyphénols, possèdent une activité antioxydante importante et inhibent de manière significative la prolifération des cellules de gliomes C6 (Rao *et al.*, 2010).

Ainsi, l'alimentation se révèle comme étant une réserve de nombreuses molécules phytochimiques pouvant effectivement participer à la prévention non seulement des cancers mais aussi d'autres maladies. La nécessité de s'intéresser aux propriétés des fruits, légumes, épices et autres consommés localement s'avère donc nécessaire et importante.

I.1.3 Ethnobotaniques des plantes d'intérêt

Les fruits secs de *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (Rutaceae) et *Fagara xanthoxyloides* (Rutaceae), les gousses de *Xylopia aethiopica* (Annonaceae), les amandes de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (Annonaceae) et les feuilles de *Leea guineensis* G. Don (Leeaceae) sont les plantes utilisées dans cette étude. Les quatre premières sont couramment utilisées comme épices au Cameroun et dans d'autres pays d'Afrique. Aussi, toutes ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle dans différentes régions contre diverses affections. Pour

cette étude, les plantes ont été identifiées à l'Herbier National Camerounais par Monsieur Nana.

I.1.3.1 *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (Rutaceae)

Fagara leprieuri Guill. & Perr (spécimen 42993/HNC Herbier National Camerounais) est une plante de la famille des Rutaceae que l'on rencontre en forêt dense humide et dans les lieux de transition forêt - savane. Il s'agit d'un arbre dressé de 8 à 15 m de hauteur, possédant un tronc de couleur grisâtre ayant à sa base des aiguillons dont les pointes sont tournées vers le haut. Les fruits de 3 mm environ de diamètres sont de couleur brune une fois mature, et après séchage, ils sont utilisés comme épices (Aké et Jérémie, 2009). En pharmacopée traditionnelle au Cameroun, *F. leprieuri* est utilisée pour le traitement du « cancer » (Kuété *et al.*, 2011)

I.1.3.2 *Fagara xanthoxyloides* Waterm. (Rutaceae)

Fagara xanthoxyloides Waterm. (spécimen N° 21793/Société des réserves forestières du Cameroun) est une plante de la famille des Rutaceae. C'est un arbre qui pousse de manière naturelle dans les régions tropicales du globe. Il mesure 12 m environ dont le tronc est parsemé d'épines et les feuilles composées, alternes et imparipennées. Le fruit sec utilisé comme épice est une capsule de 4 à 6 mm qui laisse entrevoir une graine noire et brillante. Son utilisation en pharmacopée traditionnelle varie d'une région à l'autre. Les vapeurs de feuilles sont utilisées contre les migraines et les douleurs au Mali (Malgras, 1992), les pousses et jeunes feuilles contre les caries dentaires et les problèmes buccodentaires. Les décoctions d'écorces ou de feuilles sont utilisées pour le traitement de l'hypertension, des maux d'estomac et les ulcères dans plusieurs pays en Afrique (Adjanohoun *et al.*, 1985).

I.1.3.3 *Xylopia aethiopica* Dunal A. Rich. (Annonaceae)

Xylopia aethiopica Dunal A. Rich. (spécimen N° 39485 /Herbier National Camerounais) encore appelée « graine de Selim » est une plante de la famille des Annonaceae. C'est une plante aromatique mesurant 15 à 20 m de hauteur et 60 à 75 cm de diamètre. Les fruits sont des gousses de couleurs brunes sombre mesurant 1,5 à 6 cm de long et 4 à 7 mm d'épaisseur. A l'intérieur des gousses se trouvent des graines de couleurs brunes noirs. *X. aethiopica* se rencontre en forêt humide et en zone de savane dans les régions centrales, ouest et sud-est de l'Afrique (Burkill, 1985 ; Noudjou *et al.*, 2007). En

pharmacopée traditionnelle, le fruit de *X. aethiopica* est utilisé sous forme de décoction pour guérir les douleurs dentaires, les douleurs gastriques, les bronchites, l'asthme, le cancer, le rhumatisme et pour stimuler la lactation (Burkill, 1985, Orwa *et al.*, 2009 ; Nwozo *et al.*, 2011 ; Kuété *et al.*, 2011).

I.1.3.4 *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (Annonaceae)

Monodora myristica (Gaertn.) Dunal (spécimen N° 30747 /Herbier National Camerounais) est un arbre de la forêt tropicale humide mesurant 30 à 35 m de haut et 70 cm de diamètre et appartenant à la famille des Annonaceae. Le fruit est suspendu à une longue tige verte et contient de nombreuses graines ou amandes. Ces amandes sont utilisées principalement en cuisine pour la préparation de plats traditionnels dans plusieurs pays d'Afrique. Elles sont utilisées au Cameroun pour le traitement des maladies oculaires, de la fièvre et contre la constipation. En Centrafrique, elles sont également utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des parasites intestinaux, des diarrhées, de l'hypertension artérielle, de la fièvre et des maux de ventre, des maux de tête, de même que les cancers. Elles sont très riches en lipides (44,9% environ) (Tchatat *et al.*, 1999 ; Koudou *et al.*, 2001 ; Kuété *et al.*, 2011).

I.1.3.5 *Leea guineensis* G. Don (Leeaceae)

Leea guineensis G. Don (spécimen N° 11971 /Herbier National Camerounais) est une plante de la forêt tropicale humide africaine de la famille des Leeaceae. Elle nécessite beaucoup d'espace pour sa croissance. Elle peut mesurer jusqu'à 10 m de hauteur. Ses feuilles sont utilisées au Cameroun en médecine traditionnelle pour soigner les inflammations pelviennes. Au Nigéria, elle est utilisée dans le traitement de diverses maladies inflammatoires. Les feuilles sont également utilisées pour le traitement de la diarrhée, de la dysentérie, des convulsions et contre l'épilepsie (Burkill, 1985 ; Falodun *et al.*, 2007).

I.1.4 Travaux antérieurs

I.1.4.1 *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (Rutaceae)

Des études sur *F. leprieuri* ont révélé la présence d'alcaloïdes dont 4 acridones isolés des fruits. Deux d'entre eux ont montré une activité anti-plasmodial sur la lignée 3D7 de *Plasmodium falciparum* (Tchinda *et al.*, 2009). De nouveaux alcaloïdes ont par la suite été

isolés des fruits et racines de *F. leprieuri* dont 3 possèdent des propriétés antiprolifératives modérées sur les cellules cancéreuses du poumon (A549) et sur les cellules cancéreuses colorectales (DLD-1) ainsi que sur les cellules normales (WS1) (Ngoumfo *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de ces fruits a été décrite (Etoundi *et al.*, 2010).

I.1.4.2 *Fagara xanthoxyloides* Waterm (*F. xanthoxyloides*, Rutacée)

L'extrait des racines de *F. xanthoxyloides* a révélé une activité antiproliférative sur *Plasmodium falciparum in vitro* (Kassim *et al.*, 2005). En outre, l'étude de la toxicité de l'extrait méthanolique des écorces et racines sur des souris révèle une dose létale 50 de 5 g/Kg de poids corporel, avec des signes d'irritation cérébrale, des congestions viscérales et des nécroses au niveau du foie et des reins (Ogwal-Okeng *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'acide hydroxy-2-méthyl-benzoïque y a été isolé, formulé et vendu par un laboratoire au Togo pour le traitement de la drépanocytose (Pousset, 2002). Les propriétés analgésiques de l'extrait aqueux de l'écorce des racines de *F. xanthoxyloides* ont été démontrées chez les souris (Prempeh et Mensah-attipoe, 2008).

I.1.4.3 *Xylopi aethiopica* Dunal A. Rich. (Annonaceae)

En laboratoire, l'activité antimicrobienne et antifongique de l'huile essentielle ainsi que celle de l'extrait aqueux et éthanol des feuilles et des fruits de *X. aethiopica* ont été montrées sur plusieurs types de bactéries Gram positive ou négative (Tatsadjieu *et al.*, 2003; Konning *et al.*, 2004 ; Ezeifeke *et al.*, 2004). Son huile essentielle a également révélé une activité anti-*plasmodium falciparum* (Boyom *et al.*, 2003).

Les propriétés antiprolifératives des extraits au méthanol des fruits de *X. aethiopica* ont été montrées sur des cellules cancéreuses pancréatique MiaPaCa-2, sur des cellules leucémiques CCRF-CEM ainsi que sur des cellules humaines de cancer cervical C-33A. En outre, les activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* de ces extraits ont été décrites, elles augmentent la défense antioxydante et protègent les rats des effets adverses des irradiations (Adaramoye *et al.*, 2010a, 2011 ; Kuété *et al.*, 2011).

I.1.4.4 *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (Annonaceae)

Des travaux effectués sur l'amande de *M. myristica* révèlent une teneur importante en lipides (21,79 %), protéines (20,57 %) et hydrates de carbone (44,29%). Elles sont aussi

riches en minéraux tels que le potassium (64,96 ppm), magnésium (8,58 ppm) et fer (8,40 ppm) (Ajayi *et al.*, 2004). Elles renferment aussi des flavonoïdes. L'huile essentielle de *M. myristica* présente également une activité anti-contractionnelle sur l'iléon de cobaye (Koudou *et al.*, 2001)

I.1.4.5 *Leea guineensis* G. Don (Leeaceae)

Op de Beck *et al.* (2003) ont décrit la présence de quercétin et d'acide gallique dans cette plante ainsi que son activité antiradicalaire contre le radical libre DPPH. Aussi, les propriétés antimicrobiennes sur des bactéries Gram positive et négative ainsi que l'activité antifongique ont été évaluées (Pieme *et al.*, 2008a). En outre, les activités anticonvulsivante, anxiolytique et anti-oedématogénique de l'extrait aqueux des feuilles de *L. guineensis* ont été décrites (Falodun *et al.*, 2007 ; Woode *et al.*, 2011). Enfin, les propriétés antiprolifératives *in vitro* sur des tumeurs induites chez des souris ainsi que l'activité antioxydante de *L. guineensis* ont été montrées (Pieme *et al.*, 2008b).

I.2 LES CANCERS

Chez les organismes métazoaires, les cellules individuelles sont douées d'une grande autonomie et d'une grande versatilité, et la plupart d'entre elles portent le génome complet de l'organisme qui les abrite. Ces cellules conservent aussi l'habileté à croître et à se diviser même après que le développement du tissu ou de l'organe soit achevé. Cette habileté à proliférer et à participer à la morphogénèse des tissus rend possible le maintien des tissus adultes et permet la réparation des tissus lésés. Les cellules de part leur caractère autonome et versatile, peuvent par divers mécanismes subir des dommages dans leur génome et acquérir de nouveaux phénotypes hautement anormaux. L'un de ces dommages est l'altération du programme de croissance cellulaire qui, à son tour peut conduire à l'apparition d'une large population de cellules qui n'obéissent plus aux règles qui gouvernent la synthèse et la maintenance de tissus normaux. Ce phénomène appelé « prolifération cellulaire » donnera plus tard naissance à une tumeur ou cancer. De ce fait malgré les mécanismes de contrôle et de régulation de l'organisme pour prévenir l'apparition des tumeurs, les cellules cancéreuses parviennent à prospérer. Ainsi, alors que les cellules normales sont strictement programmées pour participer à la construction de divers tissus et rendre possible la vie de l'organisme, les

cellules cancéreuses ont un tout autre objectif : faire plusieurs copies d'elles mêmes (Weinberg, 2007).

I.2.1 Historique des cancers

Bien avant les avancées scientifiques du 19^e siècle, bon nombre de chercheurs pensaient que les tumeurs étaient des organismes étrangers qui d'une manière ou d'une autre s'enracinaient et proliféraient dans un organisme vivant. Il a par la suite été découvert que la formation des tissus et organismes complexes se fait au départ d'un œuf fertilisé suivit de nombreux cycles de croissances cellulaires, divisions et différenciation. L'analyse de coupe de tissus normaux, puis de masses tumorales a alors révélé que les deux types de tissus étaient composés de cellules et que les tissus tumoraux ont une architecture moins organisée et structurée comparée aux tissus normaux. Il a ainsi été apporté la preuve que les tumeurs sont issues des cellules qui ont perdu l'habileté à s'assembler et à créer des tissus de forme et fonction normales. Aussi, il a été montré que des tumeurs de plusieurs types présents dans un organisme donné dérivent toujours des tissus normaux dans lesquels elles ont été découvertes pour la première fois. Le cancer peut alors être défini comme une maladie du mauvais fonctionnement des cellules. Il résulte de la prolifération anormale des cellules quelque soit leur localisation dans l'organisme (Cooper, 2000).

I.2.2 Processus moléculaires de cancérogénèse

La plus petite tumeur est susceptible d'être cliniquement décelable lorsqu'elle est d'environ 1 cm et contient environ 10^9 cellules. En général, toutes les cellules de la tumeur proviennent d'une seule cellule à travers le processus de cancérogénèse (Henri et Thompson, 2004).

La cancérogénèse est subdivisée en trois étapes majeures : l'initiation, la promotion et la progression / invasion (angiogénèse et formation de métastases) (Brigelius-Flohé et Kipp, 2009).

I.2.2.1 Phase d'initiation

Première phase de la cancérogénèse, l'initiation ne s'effectue qu'au niveau d'une cellule normale. Durant l'initiation, la cellule cible subit des modifications génétiques irréversibles qui la prédisposent à l'immortalité et à une différenciation autre que celle d'une cellule

normale (Trosko 2001, 2003 ; Oliveira *et al.*, 2007). En effet, à la phase d'initiation, les carcinogènes tels que les radiations ionisantes, les ultra-violets, les espèces oxygénées réactives (eau oxygénée H₂O₂ et hydroperoxydes ROOH) ou les erreurs spontanées dans le mécanisme de réplication de l'ADN (insertion, délétion, duplication ou substitution) induisent ou provoquent des dommages à l'ADN qui, si elles ne sont pas réparées peuvent entraîner des mutations permanentes. Des mutations importantes telles que la perte ou l'inactivation des gènes de suppression des tumeurs (par exemple p53 qui est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains) ou la surexpression (hyperactivité) des proto-oncogènes favorisent la prolifération cellulaire (Chopin *et al.*, 2001; Witsch *et al.*, 2009). Ces dommages peuvent être réparés de manière enzymatique (Jeng *et al.*, 2001) ; mais la difficulté est qu'en pleine multiplication (division) les cellules disposent de peu de temps pour la réparation de dommages à l'ADN. Si la division cellulaire intervient avant que le système de réparation des dommages à l'ADN n'ait été mis en jeu, les dommages subits par l'ADN deviennent permanents et irréversibles ; l'initiation devient alors un processus irréversible. On obtient à l'issue de cette phase des cellules dites initiées qui peuvent rentrer dans un état latent pour une durée plus ou moins longue ou se multiplier de façon autonome et clonale (Oliveira *et al.*, 2007).

Leur passage à l'état de prolifération cellulaire se fait sous l'action d'un promoteur ou d'autres mécanismes cellulaires.

I.2.2.2 Phase de promotion

L'étape de promotion dans la cancérogenèse est caractérisée par l'expansion clonale des cellules initiées induites par des promoteurs. Ces derniers augmentent la prolifération des cellules sensibles, contribuent à l'accentuation et à la non réparation des mutations provoquant ainsi des changements dans le contrôle de la croissance cellulaire (Oliviera *et al.*, 2007). La promotion nécessite que la prolifération cellulaire puisse avoir lieu à de faibles taux de ROS (Sauer *et al.*, 2001) maintenus constant dans les cellules cancéreuses grâce à l'action stimulatrice des facteurs de croissance. La promotion de la cancérogenèse peut également être soutenue par l'inhibition de l'apoptose. (Dreher et Junod, 1996 ; Brigelius-Flohé et Kipp, 2009). Par ailleurs, une régression de la prolifération cellulaire est possible si le promoteur est enlevé ; la promotion étant une étape réversible. Aussi toutes les cellules exposées aux agents promoteurs ne rentrent pas obligatoirement dans cette étape de la cancérogenèse ; seules les

cellules indifférenciées, stimulées pour la division et ayant échappées à l'apoptose seront à même de contribuer au déséquilibre de l'homéostasie en faveur de la prolifération cellulaire (Oliveira *et al.*, 2007 ; Trosko, 2011).

I.2.2.3 Phases de progression et invasion

Il s'agit de l'étape la plus longue de la cancérogenèse. C'est la transformation en lésion maligne des cellules ayant précédemment subi l'initiation et la promotion. Dans cette étape la prolifération cellulaire est entièrement indépendante de la présence ou non de stimulus. Elle est aussi caractérisée par l'irréversibilité, l'instabilité génétique, la croissance rapide, l'invasion, l'apparition de métastases et un changement des propriétés métaboliques, biochimiques et morphologiques des cellules (Lutz, 2000 ; Oliveira *et al.*, 2007). Sous l'influence de l'accumulation d'altérations génétiques, la tumeur progresse d'abord localement puis envahit les tissus avoisinants et distants (métastase).

L'angiogenèse tumorale est la prolifération d'un réseau de vaisseaux sanguins qui pénètrent à l'intérieur des masses tumorales de plus de 3 mm³ en croissance, apportant oxygène et nutriments et débarrassant ces cellules de déchets du métabolisme (Chung et Ferrara, 2011). Le point de départ de l'angiogenèse est la libération par les cellules tumorales de molécules qui se fixent aux récepteurs des cellules du tissu environnant la tumeur. Ces signaux vont activer des gènes particuliers (dans le tissu environnant) qui vont promouvoir la synthèse de protéines impliquées dans la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (Gupta et Qin, 2003). Une fois irriguée par les vaisseaux sanguins, la tumeur va rentrer dans la phase d'invasion.

L'invasion se caractérise par une infiltration de cellules tumorales dans les tissus avoisinants et distants. Les cellules tumorales se détachent de la masse tumorale primaire et se déversent dans la circulation sanguine ou lymphatique et vont se retrouver dans d'autres tissus ou elles peuvent développer des tumeurs secondaires encore appelées métastases.

Du point de vue moléculaire, la prolifération normale des cellules est induite par quatre grands types de protéines : les facteurs de croissance, les récepteurs des facteurs de croissance, les protéines des voies de signalisation véhiculant l'information et les facteurs de transcription. Des mutations dans les gènes codant ces protéines peuvent leur conférer un caractère oncogénique et entraîner une prolifération incontrôlée des cellules. Néanmoins, la perte du contrôle de la prolifération ne suffit pas à transformer une cellule normale en cellule

tumorale. Encore faut-il qu'elle puisse échapper aux signaux d'arrêt de prolifération enclenchés par la suractivation de la croissance. Ainsi, des gènes suppresseurs de tumeur codent pour des protéines pouvant inhiber la croissance cellulaire mais dans de nombreuses cellules cancéreuses, ces protéines sont absentes ou inactivées.

En résumé pour devenir cancéreuse, une cellule dont la croissance devient incontrôlée doit également acquérir des mutations la protégeant des mécanismes de mort programmée ou apoptose. Cette dernière apparaît désormais comme un processus très finement régulé et lié de manière étroite à celui du contrôle de la prolifération. Ceci montre que la carcinogénèse est un phénomène plurifactoriel mettant notamment en jeu des désordres dans les machineries du cycle cellulaire et de l'apoptose. Si le processus de cancérogénèse est le même dans la plupart des cas, la classification des cancers se fait en fonction de l'impact de la tumeur sur l'organisme, du type de tissu ou de l'organe dans lequel ils apparaissent.

I.2.3 Classification des cancers

I.2.3.1 Tumeurs bénignes et malignes

Les tumeurs peuvent être classées en fonction de leur degré d'agressivité, de leur développement ou croissance. Celles qui se développent localement sans envahir les tissus adjacents sont dites bénignes, tandis que celles qui envahissent les tissus voisins et engendrent les métastases sont dites malignes.

La plupart des tumeurs primaires qui apparaissent chez l'homme sont bénignes et inoffensives pour leurs hôtes sauf dans des cas où l'expansion de ces tumeurs comprime certains organes et tissus vitaux. Aussi, les tumeurs bénignes peuvent causer des problèmes cliniques à cause de leur activité exocrine qui peut se révéler dangereuse pour l'organisme. C'est le cas de l'adénome thyroïdien qui peut provoquer une libération excessive de l'hormone thyroïdienne dans la circulation entraînant l'hyperthyroïdisme. Des décès dus aux tumeurs bénignes sont rares, la grande majorité des décès dus aux cancers dérivent des tumeurs malignes. Plus spécifiquement les métastases engendrées par ces tumeurs malignes sont responsables de 90% de décès dû au cancer (Weinberg, 2007).

I.2.3.2 Les cancers épithéliaux : carcinome et adénocarcinome

Les épithéliums sont des couches de cellules qui tapissent les parois des cavités et des canaux. Dans le cas de la peau, ils servent au revêtement du corps. Ils sont d'un intérêt particulier ici parce qu'ils sont à l'origine des cancers les plus fréquents chez l'homme : les carcinomes. Ces derniers sont responsables de plus de 80% des décès liés au cancer dans le monde occidental. Parmi ces carcinomes, nous avons les tumeurs issues des couches de cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (bouche, œsophage, estomac, petit et gros intestins), de la peau, des glandes mammaires, du pancréas, des poumons, du foie, des ovaires, de la vésicule biliaire et de la vessie. On distingue :

- Les carcinomes à cellules squameuses issus des cellules épithéliales formant une couche protectrice pour les populations cellulaires sous-jacentes.
- Les adénocarcinomes provenant des cellules épithéliales faites de cellules spécialisées sécrétant des substances dans les vaisseaux ou cavités.

Les cellules épithéliales dans certains organes jouent à la fois le rôle de protection des cellules sous-jacentes et de sécrétion de substances protectrices ou des hormones ; c'est le cas des poumons et de l'estomac. Dans de tels organes (poumon, estomac, utérus), on peut observer la naissance de pures adénocarcinomes ou de pures carcinomes à cellules squameuses et plus fréquemment les deux types de cellules cohabitent dans des tumeurs de ces organes (Weinberg, 2007 ; Ravindran *et al.*, 2009 ; Plzak *et al.*, 2010).

I.2.3.3 Les cancers non épithéliaux

La première classe majeure des cancers non épithéliaux dérive de divers tissus de connexion (muscle, os, cartilage et tissu fibreux) et sont appelés sarcomes (Cooper, 2000). Les sarcomes sont des tumeurs solides (1% des tumeurs rencontrées) qui dérivent des cellules mésenchymateuses : fibroblastes, adipocytes, ostéoblastes et les myocytes.

Le second groupe de cancers non épithéliaux naissent des différents types de cellules qui constituent le tissu à partir duquel se forme le sang (tissu hématopoïétique), de même que les cellules du système immunitaire (érythrocytes, lymphocytes T et B). On distingue ainsi:

- La leucémie qui désigne les tumeurs malignes dérivant de plusieurs lignées de cellules hématopoïétiques qui se déplacent librement à travers la circulation et, contrairement aux globules rouges, sont non pigmentées.
- Les lymphomes qui sont des tumeurs des lignées lymphoïdes qui s'agrègent pour former des masses tumorales solides, le plus souvent dans les ganglions lymphatiques

- Les neuroectodermes qui sont des cancers non épithéliaux qui naissent des cellules formant les différents compartiments du système nerveux central et périphérique. Dans ce groupe de tumeur on rencontre les gliomes, les glioblastomes, les neuroblastomes les schwannomes et les médulloblastomes (Weinberg, 2007).

Cette classification majeure n'est pas exhaustive de tous les types de cancers. En fonction de leur origine, les tumeurs peuvent être monoclonales (présence dans la tumeur de cellules génétiquement identiques) ou polyclonales (présence dans la masse tumorale de cellules d'origine génétique différente d'où la présence de plusieurs sous populations). La classification peut enfin être faite selon le site d'origine, l'histologie ou l'étendue de la maladie.

Chaque cancer présente des caractéristiques qui lui sont propres. Par contre les mécanismes qui les engendrent sont communs.

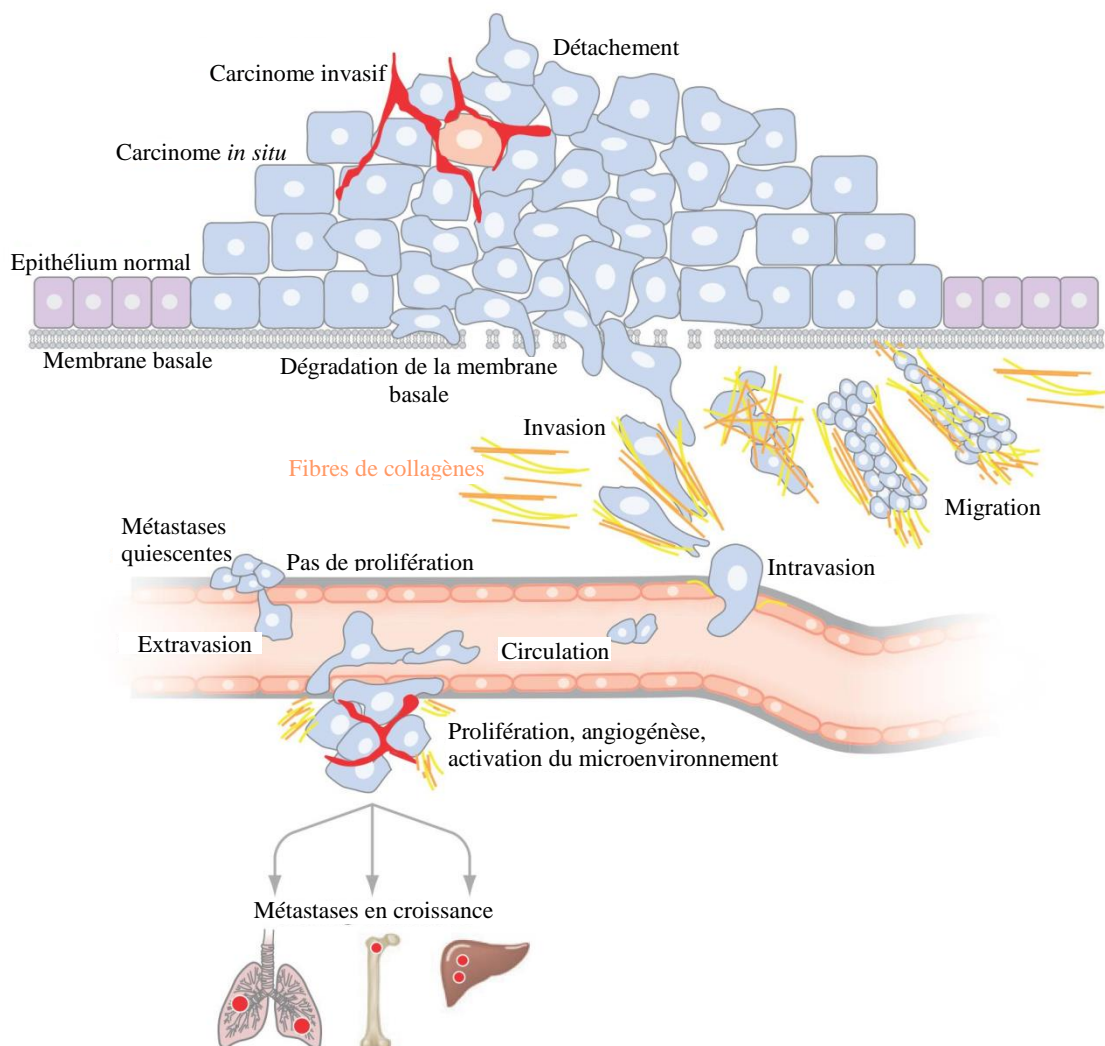


Figure 1: Etapes principales du développement des cancers (Bacac et Stamenkovic, 2008).

I.2.4 Le cycle cellulaire

I.2.4.1 Généralités

Dans un organisme pluri-cellulaire adulte, il existe une hétérogénéité de cellules. Certaines cellules une fois différenciées ne se divisent plus (cas des cellules du muscle), d'autres cellules se divisent pendant toute la vie de l'organisme (cas des cellules souches hématopoïétiques) tandis que d'autres ne se divisent que pour réparer une lésion ou pour remplacer des cellules mortes (cas des cellules de la peau). Cette différence observée entre les types de cellules s'explique par l'existence de mécanisme de contrôle de la division cellulaire. Les cellules humaines se divisent approximativement toutes les 24 h (Cooper, 2000).

Chez les mammifères, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases (G1, S, G2, M). Le passage d'une phase du cycle à l'autre (en réponse à des stimuli intra ou extracellulaires) est un processus régulé par une famille de protéines : les kinases sérine – thréonine encore appelées protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK pour *cyclin dependent kinase*). L'activité de ces kinases est dépendante de leur association avec d'autres protéines, les cyclines dont la synthèse et la dégradation sont régulées tout au long du cycle cellulaire.

a) La phase G1 (*gap1*) ou *pause 1* est la phase dans laquelle se trouve les cellules se préparant à la division sous l'action des mitogènes extrinsèques ou intrinsèques. Au cours de la phase G1, les cellules se préparent à la synthèse de l'ADN et le point au-delà duquel les cellules ne répondent plus aux mitogènes tels que les facteurs de croissance et poursuivent cependant leur avancée dans le cycle pour la division est appelé point de restriction (Schafer, 1998 ; Viillard *et al.*, 2001). Ce point de restriction est principalement régulé par la protéine du rétinoblastome (protéine nucléaire codée par un gène suppresseur de tumeur). En effet, au cours de leur progression dans le cycle cellulaire, les cellules peuvent retourner à l'état quiescent (G0) à la suite d'un retrait du milieu (de culture) des facteurs de croissance et de l'arrêt de la synthèse protéique. Mais une fois le point de restriction passé, les cellules vont progresser dans le cycle cellulaire et rentrer en phase S même en absence des facteurs de croissance. Ainsi, l'on distingue deux types de cellules en phase G1 :

- Des cellules dites **G1-pm** qui sont des cellules post-mitotiques ne pouvant évoluer dans le cycle cellulaire sans facteurs de croissance,

- Des cellules dites **G1-ps** ou pré-phase S qui peuvent rentrer dans la phase S même en absence de facteurs mitogènes comme les facteurs de croissance. Le point de transition qui permet le passage d'une cellule de la phase G1-pm à G1-ps, est le point de restriction précédemment décrit (Zetterberg *et al.*, 1995 ; Cooper, 2000 ; Viallard *et al.*, 2001).

Chez les mammifères, la transition des cellules de la phase G1 à la phase S est régulée par le couple CDK2 / cycline E ou A (Johnson et Walker, 1999). La durée de la phase G1 est de 11 h.

b) La phase S suit directement la phase G1 et est encore appelée phase de synthèse.

C'est l'étape du cycle cellulaire au cours de laquelle s'effectue la synthèse de l'ADN. En fait, pour qu'il y ait division cellulaire, le matériel génétique de la cellule doit être dupliqué pour les deux cellules filles à venir (Park et Lee, 2003). Elle dure 8 h.

c) La phase G2 ou *gap 2 (pause 2)* est la phase qui suit la phase S et correspond à la phase du cycle préparant la cellule à rentrer en mitose. C'est donc la phase de synthèse des protéines qui seront nécessaires à la mitose et sa durée est de 4h. Dans cette phase se trouve un point de contrôle qui permet l'arrêt des cellules en cette phase en cas de dommages à l'ADN et d'ADN non répliqué. La mise en œuvre de ce point de contrôle empêche l'entrée en phase de mitose sans que la duplication de l'ADN ne soit totalement effectuée. La transition de la phase G2 à la phase M est assurée par le complexe cycline A ou B/CDK2 (Cooper, 2000).

d) La phase M est la phase de mitose ou de division cellulaire proprement dite.

Elle est divisée en quatre principales étapes :

- La prophase pendant laquelle les chromosomes se condensent et les centrosomes (issues de la duplication du centrosome de la cellule mère pendant l'interphase) migrent vers les deux pôles de la cellule initiant la formation du fuseau mitotique. Il se produit ensuite la rupture de la membrane nucléaire permettant aux microtubules de se lier aux kinotochores des chromosomes (prométaphase).

- La métaphase où les chromosomes sont ramenés au centre de la cellule par les microtubules et alignés sur le plan équatorial de la cellule.

- L'anaphase, phase où les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les deux pôles opposés de la cellule.

- La télophase, dernière étape de la mitose caractérisée par la formation de la membrane nucléaire autour de chaque matériel génétique présent dans chaque pôle et la division de la cellule mère donnant naissance à deux cellules filles identiques ; cette phase de la mitose dure 1 h.

e) **La phase G0** est la phase du cycle dans laquelle se trouve la plupart des cellules quiescentes ou cellules adultes et différenciées à même de rentrer dans le cycle cellulaire. En effet, la mitose donne naissance à deux cellules filles, qui si elles ne rentrent pas dans le cycle cellulaire entrent dans un état quiescent qui constitue donc la phase G0. Les cellules en phase G0 peuvent y rester pour de longues périodes sans proliférer tout en étant actives. Ainsi, la plupart des cellules des organismes animaux se trouvent en phase G0 sauf si elles sont stimulées par des facteurs de croissance appropriés ou d'autres signaux extracellulaires pour entrer en prolifération. C'est le cas des fibroblastes de la peau qui ne sortent de la phase G0 que si leur multiplication est requise pour la réparation de lésions (Cooper, 2000 ; Meijer, 2003).

I.2.4.2 Points de contrôle du cycle cellulaire

La division cellulaire chez les mammifères est un processus hautement régulé pour un bon fonctionnement de l'organisme. La progression des cellules dans le cycle est donc accompagnée par l'activation et l'expression de complexes spécifiques. Les principales protéines régulatrices du cycle cellulaire sont les CDK (kinases dépendantes des cyclines). Ces protéines CDK forment avec les cyclines correspondantes des complexes qui permettent l'évolution des cellules dans le cycle. Il existe 8 cyclines dont l'expression de chacune se fait de manière spécifique à différentes phases du cycle cellulaire. Les cyclines D sont synthétisées au début de la phase G1 et se lient au CDK (4 et 6) pour favoriser la progression des cellules en phases G1. En outre, le point de restriction se trouvant en G1 est régulé par la protéine du rétinoblastome et cette régulation se fait de deux manières : lorsqu'elle est phosphorylée, cette protéine active la division cellulaire et lorsqu'elle ne l'est pas, elle arrête la division cellulaire en formant un complexe avec la protéine E2F. La phosphorylation de la protéine du rétinoblastome se fait par les complexes cyclines D/CDK4 et cycline D/CDK6. Cette phosphorylation entraîne une libération de la protéine E2F et permet l'entrée des cellules en phase S (Clurman et Roberts, 1995 ; Sherr, 1996). Le complexe cycline E/CDK2 assure le passage à la phase S. En cas de dommages à l'ADN et si la taille de la cellule n'est pas satisfaisante, il se produit un arrêt des cellules G1. Une fois en phase S, la progression des cellules est assurée par le complexe CDK2/cycline A. Si la réplication de l'ADN ne s'effectue pas normalement et si le centrosome n'est pas dupliqué, il y aura arrêt des cellules en phase S. Le complexe CDK1/cycline A assure quant à lui la progression des cellules en phase G2 et la

transition G2/M est assurée par ce même complexe ou le complexe CDK1/cycline B. En cas de lésions à l'ADN, la voie de signalisation des protéines kinases ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM and Rad3-related*) est activée et il s'en suit une inactivation du complexe CDK1/cycline B et un arrêt des cellules en G2. Une fois en mitose, les cellules rentrent en phase de division proprement dite mais en cas de mauvais alignement des chromosomes, il y aura arrêt des cellules en phase M (Cooper, 2000 ; Meijer, 2003 ; Vermeulen *et al.*, 2003 ; Stewart *et al.*, 2003).

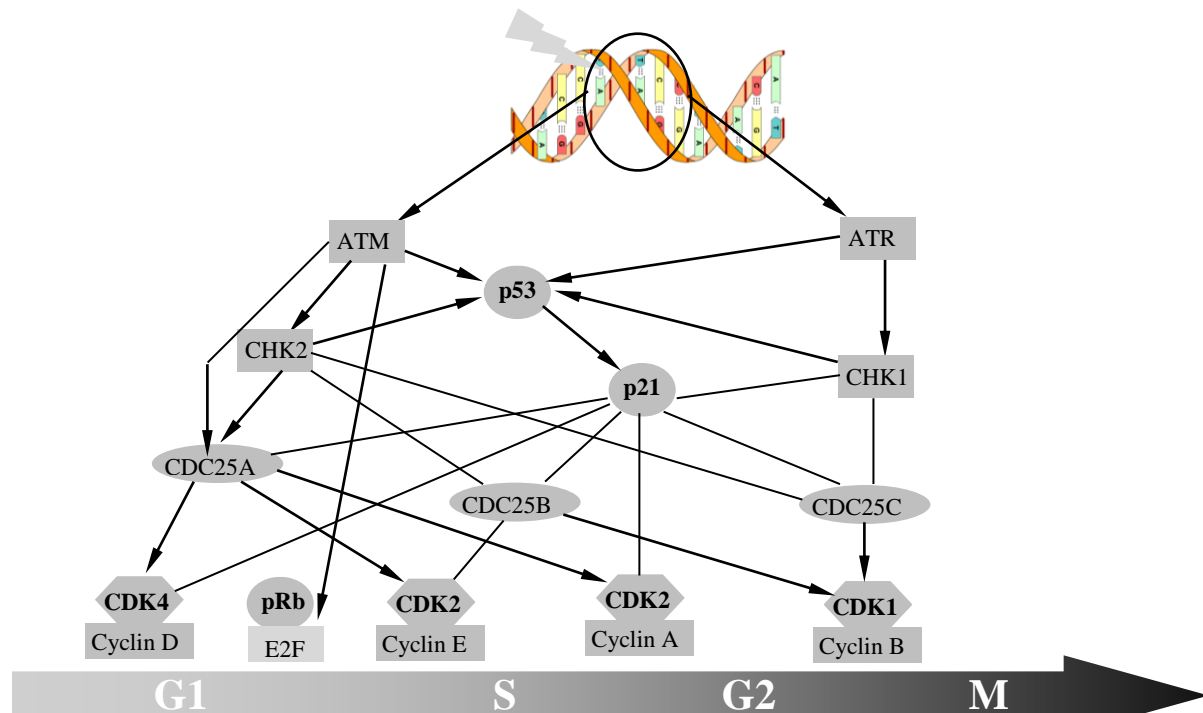


Figure 2: Points de contrôle activés en cas de dommages à l'ADN (Fischer, 2008).

ATM: *ataxia telangiectasia mutated*, ATR: *ataxia telangiectasia et Rad-3-related*, CDC25 (A, B & C) : phosphatases, CDK (1, 2 & 4): kinase dépendante des cyclines, CHK (1 & 2) : Check point kinases.

I.2.4.3 Cycle cellulaire et cancers

Le cancer est fréquemment considéré comme étant une maladie du cycle cellulaire. La transition entre les différentes phases du cycle est un processus hautement régulé qui implique des points de contrôle qui vérifient la taille de la cellule et l'intégrité de l'ADN. Il y a généralement arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2 en cas d'activation de ces points de contrôle (Park et Lee, 2003). L'analyse moléculaire des tumeurs humaines montre que les régulateurs du cycle cellulaire (cyclines et CDK) sont fréquemment mutés dans les tumeurs humaines montrant ainsi l'importance du bon déroulement du cycle cellulaire pour la

prévention des cancers. Ainsi, une surexpression des cyclines D1 et E est fréquemment observée dans les cancers du sein, du colon, de la prostate et autres (Ioachim, 2008 ; Malumbres et Barbacid, 2007). Par contre, une amplification ou une surexpression des CDK est rarement observée en cancérogénèse. Il existe donc une corrélation entre le dysfonctionnement des protéines de contrôle du cycle cellulaire et le cancer. Le cycle cellulaire dont la régulation est généralement perturbée dans les cancers humains constitue ainsi une cible pour le traitement des cancers via les CDK qui jouent un rôle central dans le contrôle de la progression dans le cycle (Malumbres et Barbacid, 2007). Ainsi, une restauration des points de contrôle peut permettre un retour à l'état quiescent des cellules cancéreuses ou un arrêt suivi de la mort cellulaire. En fait, les inhibiteurs qui bloquent l'activité des CDK sont de bons agents antitumoraux d'une part parce qu'ils peuvent entraîner un arrêt des cellules en G1 ou en G2M (Soni *et al.*, 2001). D'autre part, ces inhibiteurs des CDK peuvent déclencher l'apoptose seul ou avec d'autres cytotoxiques (Boutis *et al.*, 2006) et enfin, ils contribuent à la différenciation cellulaire, stoppant ainsi le cycle de division cellulaire (Matushansky *et al.*, 2000).

Des études précliniques révèlent que les cellules présentant des dysfonctionnements des points de contrôle sont plus vulnérables à certaines molécules anticancéreuses. C'est ainsi que plusieurs molécules anticancéreuses ciblent différentes protéines régulatrices du cycle cellulaire et entraîne au cas où les dommages ne peuvent pas être réparés, la mort cellulaire par apoptose.

I.2.5 L'apoptose

I.2.5.1 Généralités

L'apoptose encore appelée mort programmée de la cellule est un processus cellulaire ordonné qui décrit la situation dans laquelle la cellule suit activement un parcours vers la mort après avoir reçu des stimuli spécifiques (Wong, 2011). Il s'agit d'une fonction importante de la cellule qui permet un développement adéquat des tissus normaux tout en détruisant les cellules anormales. Aussi, l'apoptose assure l'homéostasie et l'intégrité des tissus normaux. Elle se caractérise par la condensation de l'ADN, la fragmentation de l'ADN, le rétrécissement de la cellule et les invaginations de la membrane; il s'en suit un bourgeonnement cellulaire et la formation des corps apoptotiques (Sluyser, 2005). Le tissu est ensuite débarrassé de ces corps apoptotiques par phagocytose et il ne se produit aucune

inflammation. L'apoptose qui peut se dérouler dans des conditions physiologiques normales ou dans des conditions pathologiques, peut être activée par voie intrinsèque (mitochondriale) ou par voie extrinsèque (récepteurs de mort cellulaire).

a) Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose

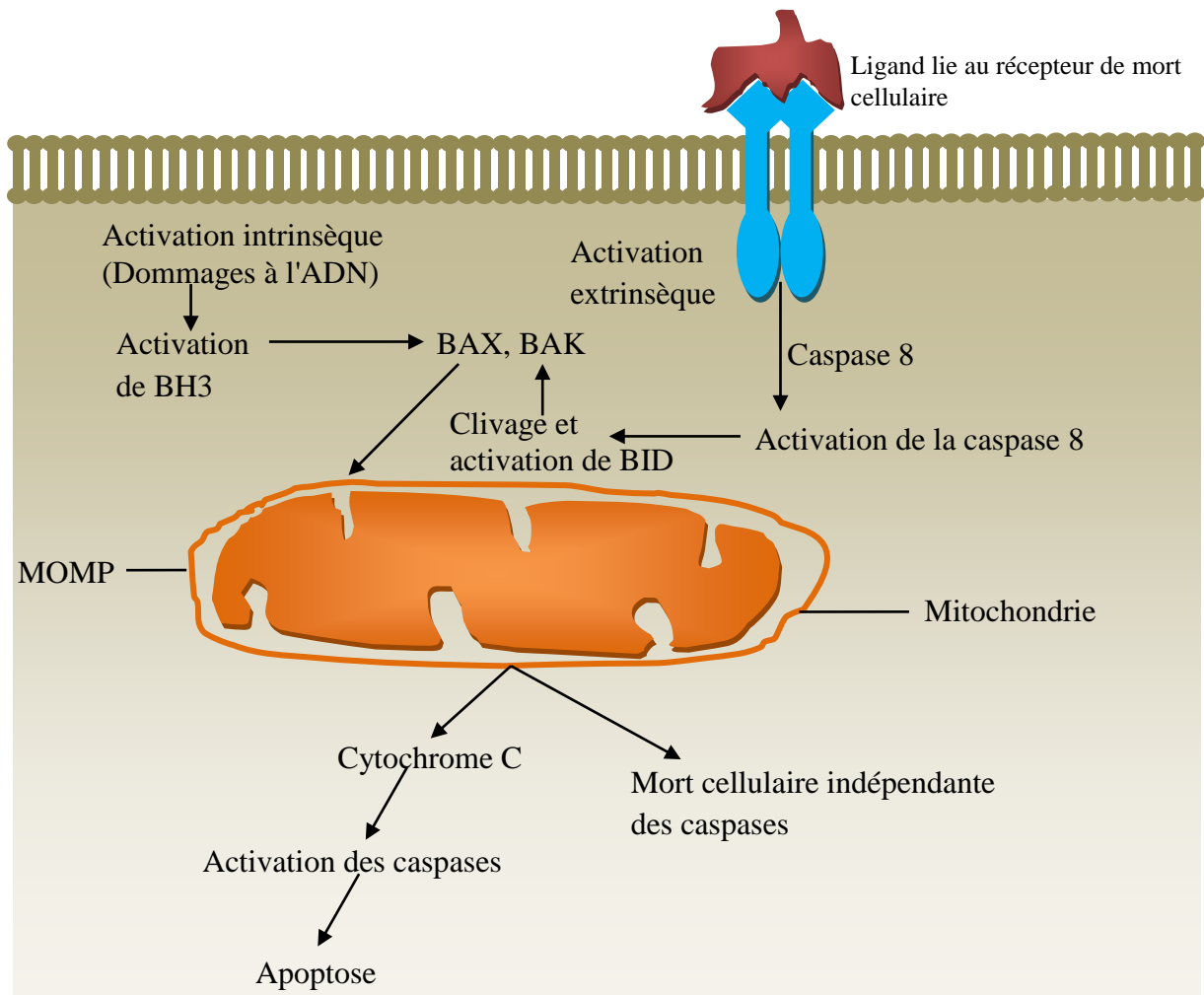
Différents facteurs peuvent activer la voie extrinsèque : l'appauvrissement du milieu environnant de la cellule en facteurs de croissance, les hormones, les radiations (gamma généralement) et d'autres ligands des récepteurs de mort cellulaire. Les récepteurs de mort cellulaire impliqués ici sont de la famille des *Tumor Necrosis Factor Receptors* (TNF receptors) ou récepteurs des facteurs de nécrose des tumeurs. Une fois activée, la partie interne (appelé domaine de mort) de ces récepteurs transmet le signal de mort par apoptose et via un complexe multiprotéique cytoplasmique active la procaspase 8 ou 10. En fonction du type cellulaire, l'apoptose peut être induite ou non via la mitochondrie : la caspase 8 peut directement activer la suite de la cascade des caspases ou la caspase 8 peut activer une protéine proapoptotique BID par clivage et libération d'un fragment C terminal qui migre dans la mitochondrie et entraîne une libération de molécules activatrices de la mort cellulaire par apoptose (Solary, 2006 ; Kaufmann *et al.*, 2011).

La voie intrinsèque d'activation de l'apoptose se fait toujours via la mitochondrie qui est un organite essentiel au bon fonctionnement de la cellule de part sa chaîne respiratoire, principale source d'ATP. La mitochondrie joue un rôle important dans la mort cellulaire par apoptose parcequ'elle renferme dans son espace intermembranaire de nombreuses molécules solubles qui une fois hors de la mitochondrie induisent l'apoptose. La première de ces molécules est le cytochrome C qui une fois libéré dans le cytoplasme active la caspase initiateur 9, laquelle va activer à son tour les caspases effectrices 3 et 7. La perméabilisation de la membrane mitochondriale s'avère donc importante pour la mise en place du processus intrinsèque de mort cellulaire par apoptose.

b) Les caspases

Les caspases ou protéases à cystéine nécessitant l'aspartate (*cysteine-requiring aspartate protease*) sont des protéases médiatrices de la mort cellulaire par apoptose. Elles sont produites sous forme de pro-caspases possédant un pro-domaine, une grande sous-unité et une petite sous-unité. Leur activation passe par la rupture de la petite sous-unité puis celle du pro-domaine, il se forme ensuite un hétérodimère correspondant à la caspase active. Les

caspases peuvent être divisées en deux groupes : les caspases 2, 8, 9 et 10 qui sont des caspases initiatrices, et les caspases 3, 6 et 7 qui sont des caspases effectrices. Les caspases effectrices clivent des protéines (structurales ou régulatrices) telle que la Poly (ADP-ribose) polymérase dans la suite de la signalisation de mort cellulaire par apoptose (Ray *et al.*, 2010).



c) Les poly (ADP-ribose) polymérases (PARP)

Les poly (ADP-ribose) polymérases sont un groupe d'enzymes qui catalysent la conversion du NAD en polymères de poly(ADP-ribose) ; la PARP-1 étant la principale responsable de cette conversion. Ces polymères sont produits en réponse aux dommages à l'ADN et leur accumulation dans le noyau conduit à la mobilisation des facteurs de réparation de l'ADN. Les dommages de l'ADN peuvent ainsi être très rapidement corrigés et l'intégrité de l'ADN retrouvée. En présence de cytotoxique, la mort cellulaire par apoptose est activée par la perte de fonction de la PARP (notamment la PARP-1) par clivage. Ce clivage est un

indicateur de l'irréversibilité du processus de mort cellulaire (Heeres et Hergenrother, 2007). En effet, cet enzyme de réparation de l'ADN est une protéine de 116 KDa qui une fois clivée libère une protéine de 86 KDa encore appelée signature PARP (Ray *et al.*, 2010). Cette lyse se fait très souvent sous l'action de la caspase 3. Les cellules, engagées dans le processus de mort cellulaire par apoptose montrent après séparation et identification, l'apparition en fonction du temps du peptide de 86 KDa, qui s'accompagne de la disparition progressive de la PARP 116 KDa. Ceci traduit l'importance de la mort cellulaire par apoptose dans une population cellulaire et l'activation de la cascade des caspases (Tinley *et al.*, 2003).

L'analyse du taux et de l'activité des effecteurs, inhibiteurs et régulateurs de l'apoptose montre qu'il y a toujours un dysfonctionnement des différentes voies d'induction de l'apoptose dans la plupart des cellules de cancers humains. Ainsi, les cellules tumorales échappent à la mort par apoptose en échappant aux différents processus de mort par apoptose (Sluyser, 2005).

d) Les mitochondries

- Description

Les mitochondries sont des organites cellulaires de 1 à 2 μm de diamètre, possédant une membrane externe et une interne qui est fortement repliée. Ces membranes délimitent l'espace inter-membranaire et la matrice (Sévin et Girard, 1999). Dans la cellule, les mitochondries interviennent également dans le processus de mort cellulaire soit par voie intrinsèque (lorsque l'induction est intracellulaire) ou extrinsèque (lorsque l'induction est extracellulaire). Au cours de l'apoptose, la participation des mitochondries est importante car elles vont activer la cascade des caspases qui à leur tour vont cliver de nombreuses protéines et entraîner une mort rapide. Ceci s'accompagne d'autres modifications morphologiques telles que la perméabilité de la membrane nucléaire et la condensation de l'ADN (Taylor *et al.*, 2008).

- La respiration mitochondriale et potentiel membranaire

La synthèse d'ATP par la mitochondrie est la principale source d'ATP de la cellule et est principalement couplée à la consommation d'oxygène. Ainsi, la synthèse d'ATP et la respiration mitochondriale sont les deux principaux processus au centre du métabolisme énergétique de la cellule. La respiration mitochondriale est une suite de réaction d'oxydoréduction mettant en jeu des donneurs d'électrons ($\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 issus de la dégradation des hydrates de carbone, acides aminés et acides gras) à l'accepteur final qu'est

l'oxygène. Ce transfert des électrons se fait au sein de la chaîne respiratoire constituée de quatre complexes : le complexe I ou NADH déshydrogénase, complexe II ou la succinate déshydrogénase, complexe III ou le cytochrome c réductase et le complexe IV ou cytochrome c oxydase.

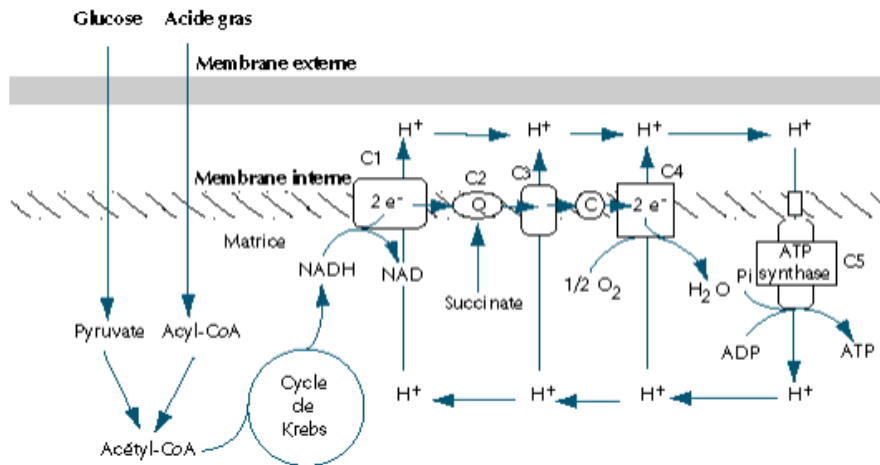


Figure 4: Chaîne respiratoire (Sevin et Girard, 1999).

C1 (NADH déshydrogénase), C2 (succinate déshydrogénase), C3 (ubiquinone-cytochrome C-oxydoréductase), C4 (cytochrome oxydase), C5 (ATP synthase); Q : ubiquinone ; C : cytochrome C.

Les complexes I, III et IV permettent le transfert des protons à travers la membrane interne mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique de protons ou force proton-motrice (Δp) qui est la somme du gradient de pH (ΔpH) et du potentiel membranaire ($\Delta \Psi$). Une autre pompe à protons, le complexe F₀-F₁/ATP-synthétase, utilise l'énergie de la force proton-motrice pour coupler le retour des protons vers la matrice mitochondriale avec la phosphorylation d'ADP en ATP (Sévin et Girard, 1999).

La respiration mitochondriale peut également être une cible de cytotoxique. En effet, il peut y avoir un découplage extrinsèque de la phosphorylation oxydative en présence d'agent découplant. Ce découplage extrinsèque contrairement au découplage intrinsèque entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux protons induisant une diminution de la force proton-motrice et donc du potentiel membranaire. Il en résulte une production de chaleur indiquant que ce processus participerait à la régulation de la température corporelle (Harper *et al.*, 2001).

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie est aussi une autre cible des cytotoxiques dans le processus d'induction de la mort cellulaire. En effet, son intégrité est

assurée par l'interaction entre les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille BCL2 (Chipuk *et al.*, 2010). En présence d'un signal intracellulaire (dommage à l'ADN par exemple), les protéines BAX et BAK sont activées et induisent une perméabilisation de la membrane mitochondriale dont l'un des effets physiologiques est l'ouverture des canaux membranaires encore appelés pores de transition mitochondriaux (*mtPTP*, *mitochondrial permeability transition pore*). L'ouverture de ces canaux peut également être la résultante de la perte du potentiel membranaire. Il en résulte la libération dans le cytosol du cytochrome C et autres molécules (SMAC). Ces dernières vont activer les caspases et ainsi entraîner la mort cellulaire par apoptose (Tait et Green, 2012).

I.2.5.2 Apoptose et cancers

L'analyse en culture cellulaire, les molécules cytotoxiques induisent la mort cellulaire principalement par voie intrinsèque ; la cascade de réaction engendrée variant d'une molécule à l'autre. Les molécules entraînant des dommages à l'ADN activent la protéine p53 qui à son tour va activer les systèmes de réparation de l'ADN; mais si les dommages ne sont pas réparés, la p53 active le processus de mort par apoptose. Les cytotoxiques entraînant des dommages aux microtubules (taxol) activent des protéines qui entraînent une perméabilisation de la membrane mitochondriale suivie de la libération de molécules activant d'une part la cascade des caspases et entraînant la mort cellulaire par apoptose d'autre part. De manière générale, les molécules cytotoxiques activent plusieurs voies ou cascades de mort cellulaire par apoptose à la fois, toutefois, les caractéristiques de cette mort cellulaire sont les mêmes.

La mort cellulaire par apoptose a des caractéristiques propres :

a) Condensation de l'ADN

La condensation de l'ADN est un processus cellulaire qui revêt une importance biologique importante et se caractérise par une réduction significative du volume occupé dans le noyau par l'ADN (Hof *et al.*, 2005). Cette condensation de l'ADN se fait généralement à la suite de la migration dans le noyau de la flavoprotéine mitochondriale AIF (apoptosis inducing factor) et à la protéine Acinus activée par clivage par la caspase 3. Toutes ces protéines sont libérées de la mitochondrie à la suite de la baisse du potentiel membranaire et de l'ouverture des pores de transitions mitochondriaux qui entraîne la libération dans le

cytoplasme du contenu de l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Solary, 2006 ; Tait et Green, 2012).

b) Fragmentation de l'ADN

A la suite de la condensation de l'ADN, il peut se produire la fragmentation qui active les points de contrôle conduisant à l'arrêt de la cellule dans une phase du cycle cellulaire avant, pendant ou après la synthèse ou réplication de l'ADN. La fragmentation de l'ADN peut se faire soit par action directe (au moment de la réplication ou pas de l'ADN) des molécules cytotoxiques, soit par action de molécules provenant de la mitochondrie. La fragmentation active le système d'alerte en cas de dommages à l'ADN qui est principalement constitué de deux kinases ATM (*ataxia telangiectasia mutated*, spécifiques des dommages physiques de l'ADN) et ATR (*ataxia telangiectasia and Rad-3-related*, spécifique de la réplication incomplète ou incorrecte de l'ADN). Ces kinases transmettent le message des dommages de l'ADN à plusieurs effecteurs parmi lesquels la P53, les kinases des points de contrôle CHK 1 et CHK 2 (CHK pour *check-point kinase*). Une fois activée par les kinases ATM et ATR, la protéine p53 active à son tour la synthèse de la protéine p21 ; laquelle protéine va inhiber les complexes CDK/cycline (CDK pour *cyclin depending kinase*) entraînant un arrêt du cycle cellulaire (Cooper, 2000 ; Neidle, 2008). La protéine p21 peut également inhiber une sous unité de l'ADN polymérase δ empêchant ainsi la réplication de l'ADN. Tous ces mécanismes visant l'arrêt des cellules ont pour but la réparation de l'ADN mais si les dommages sont importants et la réparation difficile ou impossible, le processus de mort cellulaire par apoptose se met en place (Meijer, 2003). La mesure de la fragmentation de l'ADN se fait par la quantification d'une protéine, la gamma H2AX phosphorylée en sa sérine 139. En effet, la chromatine est le principal élément constitutif du noyau, son unité de base est le nucléosome qui est l'association de l'ADN et de protéines appelées histones. Les inhibiteurs de la réplication de l'ADN, d'autres molécules cytotoxiques ou même des facteurs cellulaires atteignant l'ADN, peuvent entraîner la cassure de l'ADN double brin avec formation des fragments doubles brins d'ADN. Ces fragments doubles brins d'ADN entraînent la phosphorylation en position gamma de la sérine 139 conservée de l'extrémité C terminale de l'histone H2AX (Chiu *et al.*, 2009 ; Gagou *et al.*, 2010). Il est à noter que des molécules en provenance de la mitochondrie peuvent être à l'origine de la cassure de l'ADN, c'est le cas de l'endonucléase G qui après libération de la mitochondrie migre dans le noyau. La nucléase

CAD (*caspase activated DNase*) qui est activée par la caspase 3 peut également entraîner une fragmentation de l'ADN (Solary, 2006).

I.3 RELATION POUVOIR ANTIOXYDANT ET ACTIVITÉ ANTIPROLIFÉRATIVE

Lorsque les radicaux libres parmi lesquels des espèces oxygénées réactives sont présents dans la cellule, ils peuvent entraîner des dommages multiples au sein de la cellule principalement sur les protéines, les lipides ou l'ADN. Pour s'en protéger, l'organisme ou la cellule dispose non seulement d'un système antioxydant endogène mais aussi exogène très souvent constitué d'antioxydants apportés par l'alimentation. Le système endogène est principalement constitué des enzymes: superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion. Le système antioxydant exogène regroupe quant à lui l'acide ascorbique, les tocopherols, les carotènes et les phénols. Qu'ils soient endogènes ou exogènes les antioxydants protègent la cellule des dommages en éliminant les espèces oxydantes (Young et Woodside, 2001 ; Pittella *et al.*, 2009), tels que les radicaux libres qui sont impliqués dans les phases d'initiation et de promotion de la cancérogenèse. Ce faisant, ces molécules préviennent l'apparition de dommages principalement à l'ADN et maintiennent l'intégrité de la cellule.

La littérature montre que les proanthocyanidines, les flavonoles, les glucosides anthocyanines et les triterpénoïdes ainsi que d'autres antioxydants présents dans les extraits de plantes agissent de manière complémentaire pour limiter la carcinogenèse. L'activité antitumorale de ces composés peut également s'exercer par induction de l'apoptose (Neto *et al.*, 2008). En effet, l'alpha et la bêta-carotène et la bêta-cryptoxanthine (qui sont toutes convertibles en vitamine A dans les organismes humains) ont montré une activité anticarcinogénique sur des animaux d'expérimentation. La lutéine et la zéaxanthine sont des xanthophylles de couleur jaune appartenant à la famille des caroténoïdes. Ils protègent la rétine contre des dommages dus à la photooxydation et réduisent l'incidence des cancers du poumon. Il a également été montré que la lutéine inhibe le processus de cancérogenèse sur des tumeurs induites chez des animaux de laboratoire et sur des cellules cancéreuses humaines. Des études effectuées sur des souris révèlent des propriétés préventives de l'alpha-carotène contre l'apparition des cancers de la peau, du poumon et du foie. Enfin, l'action préventive de l'alpha tocophérol est également décrite notamment contre l'apparition des cancers du poumon (Murakoshi *et al.*, 1992 ; Wright *et al.*, 2004 ; Key, 2011 ; Sayori, 2012). Par ailleurs, il a été montré que l'activité antiproliférative de certains fruits, légumes et épices

n'est ni principalement ni uniquement dûe aux vitamines (carotènes, tocophérols, acide ascorbique), mais est le résultat de l'effet synergique des métabolites secondaires qui s'y trouvent (Lee et Lee, 2002).

Un large éventail de paramètres peut donc être étudié lors de la détermination de l'activité antiproliférative de divers extraits ou molécules. Au vu de la nécessité de coupler la radiothérapie et la chirurgie à la chimiothérapie, et sachant que le protocole de chimiothérapie à appliquer varie d'un patient à l'autre et d'un type de cancer à l'autre, la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses reste d'actualité. Au Cameroun et dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie, des plantes ou partie de plantes sont abondamment utilisées en médecine traditionnelle pour les soins de diverses maladies dont le cancer. C'est le cas pour *Xylopiya aethiopica* Dunal A. Rich (Annonaceae), *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (Annonaceae), *Fagara xanthoxyloides* Waterm. (Rutaceae) et *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (Rutaceae) et *Leea guineensis* G. Don (Leeaceae).

I.4 PROBLEMATIQUE

Le cancer affecte une très large frange de la population mondiale avec une forte incidence dans les pays en voie de développement et plus particulièrement ceux d'Afrique (Jemal *et al.*, 2011 ; OMS, 2009).

En clinique, plusieurs méthodes sont utilisées pour la prise en charge des cancers dont la plus ancienne est la chirurgie (Veronesi *et al.*, 2002) à laquelle il faut ajouter la radiothérapie (Chang *et al.*, 2008). Pour une efficacité et un meilleur rendement dans le traitement des cancers, ces méthodes sont souvent combinées à la chimiothérapie (du fait de l'action locale des deux précédentes techniques). Ces traitements sont non seulement difficiles d'accès, mais également coûteux. En plus, ils présentent de nombreux effets indésirables (Ekortarl *et al.*, 2007). Depuis la nuit des temps, les plantes sont largement utilisées pour le traitement des maladies. En effet, leur disponibilité et leur coût relativement bas font d'elles le premier mode de traitement traditionnel et de prévention des maladies (Rates, 2001, OMS, 2002 ; Cragg et Newman, 2005; Pandey et Madhuri, 2009). Scientifiquement, de nombreuses plantes se sont révélées efficaces dans la prévention et la thérapie du cancer dans des modèles induits *in vitro* et *in vivo* (Huerta *et al.*, 2002 ; El-Shemy *et al.*, 2007). De même, de nombreuses molécules anticancéreuses couramment utilisés en chimiothérapie ont été isolées pour la première fois dans des plantes. A titre d'exemples, nous pouvons citer:

Catharanthus roseus (Apocynaceae) de laquelle a été isolée la vinblastine, *Podophyllum pelatum* (Berberidaceae) de laquelle a été isolé l'étoposide, *Taxus brevifolia* (Taxaceae) de laquelle a été isolé le paclitaxel (Hostettmann *et al.*, 2000, Mans *et al.*, 2000).

Hypothèse de recherche

Les gousses de *Xylopiya aethiopica* Dunal A. Rich (Annonaceae), les amandes de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (Annonaceae), les fruits de *Fagara xanthoxyloides* Waterm. (Rutaceae) et *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (Rutaceae) et les feuilles de *Leea guineensis* G. Don (Leeaceae) sont utilisées en médecine traditionnelle contre divers maux (Pieme *et al.*, 2008a ; Kuété *et al.*, 2011). *In vitro*, leurs propriétés antibactériennes et antifongiques ont été montrées (Tatsadjieu *et al.*, 2003 ; Pieme *et al.*, 2008a et b).

Certains travaux ont montré que des extraits renfermant des activités antimicrobiennes avaient également des activités antiprolifératives (Mitrović *et al.*, 2011). Des activités antimicrobiennes de nos différentes plantes pourraient découler des activités antiprolifératives ou cytotoxiques sur les cellules cancéreuses. Aussi une possible corrélation pourrait exister entre les activités antiproliférative et antioxydante des extraits des plantes.

Objectif du travail

Le présent travail a donc consisté en l'étude de l'activité antiproliférative des extraits des gousses de *Xylopiya aethiopica* Dunal A. Rich (*X. aethiopica*, Annonaceae), des amandes de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (*M. myristica*, Annonaceae), des fruits de *Fagara xanthoxyloides* Waterm (*F. xanthoxyloides*, Rutaceae) et *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (*F. leprieuri*, Rutaceae) et des feuilles de *Leea guineensis* G. Don (*L. guineensis*, Leeaceae).

De façon spécifique, nous avons successivement :

- Etudié l'activité antiproliférative de *X. aethiopica*, *M. myristica*, *F. xanthoxyloides*, *F. leprieuri* et *L. guineensis*,
- Caractérisé l'activité antiproliférative des extraits de *X. aethiopica*, *F. xanthoxyloides* et *F. leprieuri*,
- Déterminé la teneur en antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de *X. aethiopica*, *F. xanthoxyloides* et *F. leprieuri*,
- Défini le mécanisme d'activité antiproliférative de l'extrait de *X. aethiopica* et isolé la molécule responsable de cette activité.

II MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 MATÉRIEL

II.1.1 Matériel végétal

Les fruits secs de *Fagara xanthoxyloides* Waterm. (*F. xanthoxyloides*, Rutaceae) et *Fagara leprieuri* Guill. & Perr (*F. leprieuri*, Rutaceae), les amandes de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal (*M. myristica*, Annonaceae) et les gousses de *Xylopia aethiopica* Dunal A. Rich (*X. aethiopica*, Annonaceae) en provenance de la ville de Bafoussam ont été achetés à Yaoundé (Centre – Cameroun). Les feuilles de *Leea guineensis* G. Don (*L. guineensis*, Leeaceae) quant à elles ont été récoltées à Elok Ngo Souma par Obala-Cameroun. Les feuilles, fruits, amandes et gousses ont été séchés à température ambiante puis broyés séparément et les poudres obtenues conservées à 4°C jusqu'à préparation des extraits.

II.1.2 Cellules utilisées

Plusieurs types de cellules cancéreuses ont été utilisés pour les différentes expérimentations. Ces cellules ont été achetées auprès de l'*American Tissue Culture Collection* (ATCC) et entretenues à 37°C sous 5% de CO₂ d'une part au laboratoire de l'équipe IP3D de l'Institut des Technologies Avancées du Vivant – Université de Toulouse (France) et d'autre part au laboratoire du Centre de Neurosciences et de Biologie Cellulaire de l'Université de Coimbra (Portugal).

➤ Les cellules humaines Capan 2PC, adénocarcinome du pancréas ont été cultivées dans le milieu de culture constitué de 450 ml de milieu *Dulbecco modified Eagle* (DMEM/F12 + Glutamax (1:1)), 50 ml de sérum de veau fœtal et 5 ml de mélange pénicilline / streptomycine (100 unités/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine).

➤ Les cellules humaines cancéreuses colorectales HCT 116, de carcinome du sein Sum PT159, d'ostéosarcome (U2OS) et les fibroblastes normaux ont été cultivées dans un milieu de culture constitué de 450 ml de milieu *Dulbecco modified Eagle* (DMEM + Glutamax + 4,5 g/l glucose – pyruvate), 50 ml de sérum de veau fœtal et 5 ml de mélange pénicilline / streptomycine.

➤ Les cellules leucémiques KG1a ont été cultivées dans un milieu *Iscove's modified Dulbecco's Medium* (IMDM) avec 1% (4 mM) L-glutamine, 20% de sérum de veau fœtal et 1% pénicilline / streptomycine.

➤ Les cellules leucémiques U937 quant à elles ont été cultivées dans du *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPIM) 1640, 10% sérum de veau fœtal et 1% pénicilline / streptomycine.

➤ Les cellules humaines MDA-MB 231, carcinome du sein (récepteur d'œstrogène négatif), ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco modified Eagle*. Pour un litre de milieu DMEM, on ajoute 1,80 g bicarbonate de sodium, 0,11 g pyruvate de sodium, 1% antibiotiques / antimycotiques (10000 unités penicilline, 10 mg streptomycine et 25 µg amphotéricine pour 1 ml) et 10 % sérum bovin fœtal.

➤ Les cellules humaines MCF 7, adénocarcinome du sein (récepteur d'œstrogène positif) ont été cultivées dans un milieu identique que celui des cellules MDA-MB 231 additionné de 0,5 % d'insuline (2 mg/ml).

➤ Les cellules normales du sein MCF-12A ont été cultivées dans un milieu DMEM/F 12. Pour un litre de milieu, on ajoute 0,5% insuline (2 mg/ml), 0,01% facteur de croissance épidermique humain (HEGF, 1 mg/ml), 1% hydrocortisone (50 µg/ml) et 5 % sérum bovin fœtal et 1% antibiotiques / antimycotiques.

II.1.3 Animaux d'expérience

Des rats mâles de souche *Wistar-Han* âgés de 8 à 10 semaines de poids compris entre 250 et 300g ont été élevés à l'animalerie du Centre de Neurosciences et de Biologie cellulaire de l'Université de Coimbra (Portugal) dans des cages de types III-H à 22°C et 45-65 % d'humidité. Ils ont un accès libre à l'eau et à l'aliment pour rongeur (4RF21 certificat GLP, Mucedola, Italy) et à l'eau acidifiée (pH 2,6) pour éviter des contaminations bactériennes. Les expérimentations menées sur ces animaux ont été effectuées en se référant à la loi européenne pour la recherche sur les animaux vertébrés et en accord avec les standards éthiques pour la manipulation des animaux au Centre de Neurosciences et de Biologie cellulaire de l'Université de Coimbra (Portugal) (Pereira *et al.*, 2007).

II.1.4 Réactifs

Tous les réactifs utilisés au cours de ce travail sont de grade supérieur et de pureté supérieure à 96%. Les méthodes de leur préparation sont résumées en annexes.

II.2 MÉTHODES

II.2.1 Préparation des différents extraits

En fonction des expérimentations à mener, différents extraits ont été préparés : l'extrait éthanol 70% pour les études d'activité antiprolifératives et les extraits eau, méthanol 1% HCl, acide phytique et L-DOPA pour les études antioxydantes.

II.2.1.1 Extraction de l'acide phytique

L'acide phytique a été extrait des poudres de plantes à l'aide d'une solution HCl 2,4 % dans de l'eau bi-distillée. Un gramme de poudre de chaque échantillon a été délipidé par traitement à 10 ml d'éther de pétrole, puis le mélange a été vortexé et passé dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes. L'éther de pétrole a été ensuite enlevé et la délipidation reprise suivant le même protocole. La poudre délipidée a été séchée et mélangée à 10 ml de HCl 2,4% (ce qui correspond à 0,65 N). Le mélange a été homogénéisé et incubé dans un bain d'ultrason pendant 20 minutes, puis centrifugé (4600 g, 25°C, 10 minutes) et le surnageant collecté. L'extraction a été reprise deux fois sur le résidu, les surnageants mis ensemble et le volume de l'extrait ramené à 30 ml pour tous les échantillons. Les extraits ont été ensuite lyophilisés et des aliquots préparés à 10 mg/ml dans de l'eau bi-distillée et conservés à 4°C (Vadivel et Biesalski, 2012).

II.2.1.2 Extraction de la L-DOPA

La L-DOPA a été extraite des poudres de plantes à l'aide de 10 ml d'une solution de HCl 0,1N ajoutés à 1 g de poudre délipidée. L'ensemble a été homogénéisé et incubé au bain à ultrasons (contenant de la glace) pendant 20 minutes, puis agité pendant une heure à température ambiante. L'homogénat a été centrifugé (4600g, 25°C, 15 minutes), le surnageant collecté et l'extraction reprise deux fois sur le résidu. Les surnageants obtenus ont été mélangés et le volume d'extrait ajusté à 30 ml. Ces extraits ont été ensuite lyophilisés et des aliquots préparés à 10 mg/ml dans de l'eau bi-distillée et conservés à 4°C (Vadivel et Biesalski, 2012).

II.2.1.3 Extraction des phénols totaux par le méthanol 1% HCl

Un gramme de poudre délipidée à l'éther de pétrole a été traité par 10 ml de MeOH 1% HCl. L'ensemble a été passé au vortex puis au bain à ultrasons pendant 20 minutes et centrifugé (4600 g, 25°C, 15 minutes). Les surnageants ont été collectés et la densité optique

après analyse des phénols déterminée à 765 nm. L'extraction a été reprise plusieurs de fois sur le même résidu jusqu'à l'obtention de la densité optique du surnageant après analyse des phénols inférieure à 0,1. Les surnageants mis ensemble ont été ensuite passés à l'évaporateur rotatif (25°C, 1h) et les extraits secs obtenus dissouts dans du méthanol à 10 mg/ml et conservés à 4°C (Astadi *et al.*, 2009).

II.2.1.4 Extractions à l'éthanol 70 % et à l'eau

Les extraits ont été préparés à la concentration 100 mg/ml. A cet effet les poudres ont été pesées et les volumes appropriés d'éthanol 70% ou d'eau bi-distillée ajoutés. Le mélange a été homogénéisé puis incubé au bain-marie à 55°C pendant 2 h avec homogénéisation toutes les 30 minutes. Il a été ensuite centrifugé (4000g, 10 minutes, 25°C) et le surnageant (extraits éthanol 70% ou H₂O) collecté. Ces extraits ont été séchés à l'évaporateur rotatif et des solutions 10 mg/ml préparées dans l'EtOH 70% ou dans l'H₂O. Les différents échantillons ont été conservés à -20°C (Tai et Cheung, 2007 ; Wang *et al.*, 2010).

II.2.2 Evaluation de l'activité antiproliférative

II.2.2.1 Effet des extraits éthanol 70% sur la prolifération des cellules cancéreuses

a) Principe

Dans les conditions normales de température et de teneur en CO₂, les cellules cancéreuses se multiplient sans l'intervention d'un signal inducteur extérieur. Ainsi, la présence dans le milieu de culture d'un agent antiprolifératif entraîne la baisse, voir l'arrêt de la prolifération cellulaire. Cette dernière a été évaluée par comptage au microscope des cellules (McCann *et al.*, 2007).

b) Mode opératoire

i. Ensemencement

Des boîtes de culture contenant des cellules ont été sorties de l'incubateur, débarrassées du milieu de culture, lavées au PBS, puis traitées par 1 ml de trypsine pendant une minute à 37°C sous 5% CO₂. La trypsine a été ensuite enlevée par aspiration, et 3 ml de milieu de culture ajoutés. Après agitation, les cellules ont été récoltées et comptées à la cellule de Malassez. Un volume approprié de suspension cellulaire a été ensuite ajouté au volume équivalent de milieu de culture. L'ensemble a été homogénéisé et réparti dans les puits

(plaques de 6 puits) à raison de 50 000 cellules/ 2 ml/ puits. Les plaques ont été ensuite agitées en 8 et placées dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ pour 24 h.

ii. Traitement et comptage

Vingt quatre heures après l'ensemencement, les cellules ayant adhéré au fond des puits, le milieu de culture a été enlevé et remplacé par un autre, contenant respectivement pour les puits tests et témoins, les différents extraits à la concentration 25 µg/ml et l'éthanol 70 %. Les plaques ont été délicatement agitées et incubées à 37°C sous 5% CO₂ pendant 4 jours. Les cellules sont observées tous les jours, puis, quantifiées par ajout de 10µl de bleu trypan à 10 µl de suspension cellulaire au compteur automatique de cellule de marque *countess* (ou à la cellule de Malassez si la densité est inférieure à 10000 cellules / ml/ puits). Le nombre total de cellules vivantes a été déterminé et estimé en pourcentage par rapport au nombre total de cellules dans les puits contrôles (McCann *et al.*, 2007).

II.2.2.2 Étude de la relation concentration – effet

II.2.2.2.1 Test de clonogénie sur plastique

a) Principe

Il s'agit du test d'unité formant colonie. Les cellules cancéreuses humaines du colon (HCT 116) ont étéensemencées à très faible densité et la cytotoxicité des extraits éthanol 70% a été évaluée à leur capacité à inhiber la formation des colonies. Après traitement et fixation, les colonies constituées d'au moins cinquante cellules ont été comptées après coloration au cristal violet (Chung *et al.*, 2009). Le cristal violet traverse la membrane des cellules vivantes et l'excès de colorant est enlevé à l'eau distillée. Les colonies marquées par le cristal violet ont été alors identifiées en fonction de leur taille et comptées (Saotome *et al.*, 1989).

b) Mode opératoire

Les cellules HCT 116 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 2000 cellules par puits, et incubées à 37°C sous 5% CO₂. Après 24h, le milieu de culture a été enlevé puis remplacé par 2 ml de milieu contenant l'extrait préparé à différentes concentrations (25; 12,5; 6,2; 3,1; 0 µg/ml) et les plaques ont été à nouveau incubées pour 8 jours. A la fin de l'incubation, le milieu de culture a été enlevé et les plaques lavées au PBS (pH 7,4 ; 1%). Un ml de cristal violet 0,5% a été ajouté dans chaque puits, puis l'ensemble incubé pendant 20 minutes à 25°C. Le colorant (cristal violet) est ensuite enlevé et les cellules

rincées à l'eau distillée puis séchées. Les colonies constituées d'au moins cinquante cellules ont été comptées à la loupe binoculaire (1 ×10) de marque *Paralux (optique de précision)*.

II.2.2.2.2 Test de viabilité des cellules cancéreuses du colon HCT 116 et des cellules leucémiques KG1a et U937 par le réactif WST-1

a) Principe

Ce test colorimétrique de mesure de la viabilité et de la prolifération cellulaire est basé sur le clivage des sels tétrazoliums (4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzene disulfonate) incolore en formazan (de couleur jaune orangé) par les déshydrogénases mitochondriales (Berridge *et al.*, 1996). La viabilité des cellules est indiquée par une augmentation de l'activité des déshydrogénases mitochondriales dans le milieu. Cette augmentation de l'activité enzymatique se traduit par l'accroissement de l'intensité de la coloration de formazan formée, et est proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives. La coloration de formazan produite par les cellules métaboliquement actives est quantifiée au spectrophotomètre à balayage multipuits en mesurant la densité optique à 450 nm.

b) Mode opératoire

Au jour 1, les cellules cancéreuses humaines cancéreuses (HCT 116, KG1a et U937) ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à fond plat à raison de 3000 cellules/ 90 µl/puits. Après 24 h (jour 2), 10 µl d'extrait EtOH 70% ont été ajoutés pour des concentrations finales dans le milieu de culture de 25 ; 12,5 ; 6,2 ; 3,1 ; 0 µg/ml. Toutes les plaques ont été incubées à 37°C, 5% CO₂. Au jour 6, 10 µl de réactif WST-1 sont ajoutés dans chaque puits et les plaques incubées pendant 2 h à 37°C, 5% CO₂. Les densités optiques ont été ensuite lues à 450 nm au spectrophotomètre à balayage multipuits (statuts, labsystems multiskan RC). La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage en se référant au contrôle et calculée par la formule suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire} = \frac{\text{DO}_{\text{essai}} \times 100}{\text{DO}_{\text{témoin}}}$$

Ces données ont été utilisées pour le calcul des concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀).

II.2.2.2.3 Test de viabilité par coloration des protéines à la sulforhodamine B

a) Principe

Cette méthode est basée sur la coloration *in vitro* des cellules adhérentes. Le marqueur utilisé (sulforhodamine B) se fixe aux acides aminés basiques des protéines cellulaires et la

densité optique lue permet d'estimer la masse de protéines totales qui est proportionnelle au nombre total de cellules viables (Papazisis *et al.*, 1997).

b) Mode opératoire

Les cellules de cancer du sein MDA-MB 231, MCF 7 et les cellules normales du sein MCF 12A ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 10000 cellules/ 0,5 ml/puits, et incubées à 37°C sous 5% CO₂. Après 24 h, le milieu de culture a été remplacé par 0,5 ml de milieu contenant l'extrait préparé à différentes concentrations (30 ; 15 ; 7,5 ; 3,7 µg/ml) et l'ensemble a été à nouveau incubé à 37°C sous 5% CO₂. L'expérimentation a été arrêtée pour les différents groupes de cellules après 24, 48 et 96 h d'incubation. Les cellules ont été ensuite fixées par 1% d'acide acétique (préparé dans 100% de méthanol) à 4°C pendant une heure. Après fixation des cellules, l'acide acétique a été enlevé puis les plaques rincées à l'eau bi-distillée et asséchées à l'étuve à 37°C. Deux cent cinquante microlitres de 0,5 % (poids /volume) de sulforhodamine B (préparée dans une solution 1% d'acide acétique dans l'eau bi-distillée) ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 1 h. La sulforhodamine B a été ensuite enlevée et les plaques rincées 5 fois par une solution d'acide acétique 1 % puis asséchées à l'étuve à 37°C. La sulforhodamine B fixée aux protéines cellulaires a été ensuite solubilisée par ajout dans chaque puits de 500 µl de Tris (10 mM, pH 10) sous agitation douce pendant 30 minutes. Deux cent microlitres du contenu de chaque puits ont été ensuite transférés sur une plaque de 96 puits et les densités optiques lues à 565 nm au spectrophotomètre. Les concentrations inhibitrices 50 (IC50) ont été estimées après calcul de la viabilité cellulaire par la formule :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Moyenne DO échantillon} - \text{moyenne DO blanc}}{\text{Moyenne DO contrôle} - \text{moyenne DO blanc}} \times 100$$

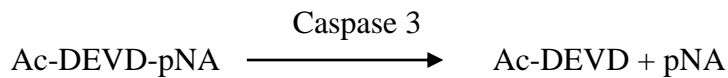
II.2.3 Evaluation du mode d'action antiprolifératif des extraits

II.2.3.1 Activité de la caspase -3

a) Principe

L'activité enzymatique de la caspase -3 est mesurée par l'hydrolyse du peptide substrat acetyl-Aspartate-Glutamate-Valine-Aspartate- p-nitroaniline (Ac-DEVD-pNA) par

cette enzyme qui libère le para-nitroaniline (pNA) dont la concentration est déterminée par lecture de la densité optique à 405 nm (Sardao *et al.*, 2009).



b) Mode opératoire

i. Préparation des lysats cellulaires

Les cellules cancéreuses du sein MDA-MB 231 ont étéensemencées dans des boîtes de culture cellulaire de 60 mm à raison de 3×10^5 cellules/ boîte, et incubées à 37°C sous 5% CO₂. 24 h après ensemencement des cellules, le milieu a été remplacé par un autre contenant les extraits de plantes à 30; 15 ; 7,5 ; 3,7µg/ml et les cellules ont été à nouveau incubées à 37°C sous 5% CO₂. L'expérimentation a été arrêtée 24 et 48 h après traitement, et le milieu de culture collecté tandis que les cellules ont été trypsinisées et collectées par ajout du milieu de culture puis centrifugées (800 g, 10 minutes, 4°C). L'expérimentation se déroulant sur la glace, le surnageant a été enlevé et le culot cellulaire ressuspendu dans 1 ml de PBS froid. Les suspensions cellulaires obtenues ont été à nouveau centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et le surnageant éliminé. Les culots cellulaires obtenus ont été traités par 50 µl de tampon de lyse et incubés sur la glace pendant 30 minutes. Les lysats obtenues ont été conservées à -80°C jusqu'à l'analyse.

ii. Quantification des protéines

Les protéines totales des lysats cellulaires ont été quantifiées par la méthode de Bradford (1976). Brièvement 995 µl d'eau bi-distillée ont été introduits dans des tubes de verre et 5 µl de lysat cellulaire (dilué au 1/2) y ont été ajoutés. Parallèlement, le standard a été préparé par mélange de 1999 à 1920 µl d'eau bi-distillée et 1 - 80 µl de ASB (1 mg/ml). Ensuite 1ml du réactif de Bradford a été ajouté et les tubes ont été homogénéisés, puis 200 µl de leur contenu transférés dans une plaque 96 puits pour la lecture de la densité optique à 595 nm de longueur d'onde. Les quantités de protéines ont été déduites en se référant à la courbe standard et le volume de lysat cellulaire équivalent à 25 µg de protéines déterminé pour chaque échantillon.

iii. Activité de Caspase 3

Dans les tubes tests, le volume de lysat cellulaire équivalent à 25 µg de protéines a été introduit et le volume complété à 195 µl par le tampon d'analyse (25 mM HEPES pH 7,5; 0,1% CHAPS; 10% Sucrose et 10 mM DTT). Par la suite, 5 µl de substrat ont été ajoutés dans chaque tube pour une concentration finale de 100 µM. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 2 h à l'abri de la lumière. Le blanc a été préparé de la même manière en absence d'échantillon. Pour la courbe standard, le pNA a été préparé à différentes dilutions dans le tampon d'analyse pour un volume final de 200 µl (pour les concentrations 0, 1, 10, 50, 250, 500, 750 µM) et 300µl (pour la concentration de 1 mM). Cent microlitres du contenu de chaque tube ont été ensuite transférés dans les plaques de 96 puits et la densité optique a été lue à 405 nm. L'activité de la caspase -3 a été exprimée en concentration de pNA libéré par µg de protéines.

II.2.3.2 Analyse de la condensation de l'ADN

a) Principe

La méthode utilisée pour la détection de la condensation de l'ADN est basée sur la fixation du marqueur fluorescent (Hoechst 33342) sur le matériel génétique de la cellule, permettant ainsi à l'observation au microscope à fluorescence de caractériser l'aspect morphologique de l'ADN de la cellule (Sardao *et al.*, 2009).

b) Mode opératoire

Les cellules du cancer du sein MDA-MB 231 ont étéensemencées dans des boites de culture de 60 mm (contenant des lamelles) à 3×10^5 cellules/ boîtes et incubées à 37°C, 5% CO₂. 24 h plus tard, les cellules ont été traitées à différentes concentrations pour chaque extrait ou à la doxorubicine 10 µM (contrôle positif) et incubées pendant 24 h. Trente minutes avant la fin de l'incubation, les cellules ont été traitées avec le marqueur Hoechst 33342 à la concentration de 2 µg/ml (à l'abri de la lumière). Les lamelles ont été ensuite rincées au PBS, asséchées et montées sur les lames à l'aide de la solution de montage. Des images ont été obtenues après observation des lamelles à l'objectif 40X au microscope à fluorescence (*Zeiss Axioskop 2 Plus*) muni d'une caméra. Les images collectées permettent d'observer les différences dans l'apparence de l'ADN en comparant des cellules traitées et non traitées.

II.2.3.3 Effet des extraits sur la mitochondrie

II.2.3.3.1 Préparation de la fraction mitochondriale hépatique

Les mitochondries ont été isolées du foie de rat mâle adulte (300 g) par la méthode conventionnelle de centrifugation différentielle (Pereira *et al.*, 2007). Brièvement après sacrifice, le foie a été prélevé, trituré et lavé dans un tampon froid constitué de 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES-KOH, pH 7,4 et 0,1% ASB (Albumine de sérum bovin) délipidé. Par ce lavage le tissu hépatique a été débarrassé de sang et a été ensuite broyé à l'aide d'un homogénéisateur de Teflon-Potter (7g/ 50 ml) dans la glace. Les homogénats hépatiques obtenus ont été centrifugés à 800 g pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse de marque Sorvall RC-5C, plus, SS 34 rotor). Le surnageant collecté a été centrifugé (10000 g, 10 minutes, 4°C) et le culot obtenu contenant les mitochondries a été resuspendu et centrifugé deux fois dans la solution de lavage (pH 7,2) dépourvu d'EGTA et ASB délipidé. Le culot ou fraction mitochondriale a été récupéré puis resuspendu dans un volume approprié de solution de lavage. Tout au long de l'expérimentation, le matériel utilisé a été maintenu sur la glace. La quantité de protéines de la fraction mitochondriale a été déterminée par la méthode de Biuret (Gornall *et al.*, 1949) avec le ASB comme standard.

II.2.3.3.2 Effet des extraits sur le potentiel mitochondrial transmembranaire

a) Principe

Le potentiel mitochondrial transmembranaire a été mesuré de manière indirecte par l'accumulation mitochondriale du cation lipophile tétraphénylphosphonium TPP^+ qui est détecté par une électrode sélective TPP^+ couplée à une électrode de référence Ag/AgCl saturée. Le signal issu de la cuve d'expérimentation a été consigné par un enregistreur potentiométrique et les valeurs absolues pour le potentiel membranaire (en millivolt) déterminées.

b) Mode opératoire

La mesure du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi$) s'effectue dans une chambre thermostatée maintenue dans un bain à 30°C, munie d'un agitateur magnétique. Le milieu réactionnel est constitué de 1 ml de la solution (130 mM sucrose; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl_2 ; 5 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM EGTA et 5 mM HEPES pH 7,2; 30° C) supplémentée par ajout de 3 μl TPP^+ (1 mM). Pour l'activation du complexe II, 5 μl succinate (1 M) et 1,5 μl de roténone (3 μM) ont été ajoutés. L'enregistreur a été calibré et les mitochondries

(équivalent à 1 mg de protéines) ont été ajoutées et le potentiel membranaire normal des mitochondries a été enregistré. Pour le contrôle négatif, 10 µl de Calcium (CaCl₂ 10 mM) ont été ajoutés, et après une première dépolarisation et repolarisation, le même volume de calcium a été de nouveau ajouté et la seconde dépolarisation et repolarisation ont été enregistrées. Pour le contrôle positif, 1 µl de cyclosporine A 1µM a été ajouté avant l'apport de mitochondries et l'expérimentation a été menée de la même manière que précédemment décrite. Concernant les échantillons à analyser le potentiel membranaire normal a été préalablement enregistré puis les extraits ont été introduits à différentes concentrations (1,5; 2 ; 2,5; 3 µg/ml). En fonction de la dépolarisation et de la repolarisation obtenues, 10 µl de calcium ont été ajoutés et les effets sur le potentiel membranaire enregistrés. Entre deux expérimentations, la chambre a été lavée à l'eau bi-distillée. Les valeurs du potentiel membranaire exprimé en millivolts ont été calculées par la formule de Kamo *et al.* (1979) :

$$\Delta\Psi = 59 \log (v/V) - 59 \log 10 (\Delta E)/59 - 1$$

où v, V, et ΔE représentent respectivement le volume mitochondrial, le volume du milieu d'incubation et la déflexion du potentiel de l'électrode à partir de la ligne de base.

II.2.3.3.3 Effet des extraits sur la respiration / consommation d'oxygène

a) Principe

La mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries hépatiques pendant les différents états de la respiration est basée sur la réduction d'oxygène au niveau de l'électrode de platine, réduction qui est proportionnelle à la concentration d'oxygène dans le tampon de respiration (Delieu et Walker, 1972).

b) Mode opératoire

La mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries a été réalisée dans une chambre fermée maintenue dans un bain à 30°C tout au long de l'expérimentation. Cette dernière a été réalisée grâce à un équipement constitué d'une électrode d'oxygène de type Clark (*Yellow Springs Instruments, Modèle YSI 5331*) connecté à un enregistreur (*Kipp & Zonen, modèle BD 121*). Au cours de l'expérimentation, un millilitre du milieu de réaction, les mitochondries (1 mg) et 1,5 µl de roténone ont été successivement introduits dans la chambre qui a été ensuite fermée et 5 µl de succinate (1 M) y ont été ajoutés. Lorsque l'enregistreur a été mis en marche, la respiration à l'état de 2 a été enregistrée. La

consommation d'oxygène a été ensuite activée par ajout de 5 µl d'ADP (25 mM) et la respiration à l'état 3 enregistrée. Après la consommation complète de l'ADP, il se produit une baisse de la consommation d'oxygène, ce qui correspond à la respiration à l'état 4. Puis 1 µl d'oligomycine (1 mg/ml, inhibiteur de la phosphorylation de l'ADP) et 5 µl d'ADP ont été simultanément ajoutés et la respiration à l'état-oligomycine enregistrée. Enfin, 1 µl d'agent découplant FCCP (1 mM) a été ajouté pour dissiper le potentiel membranaire entraînant une consommation maximum d'oxygène non couplée à la synthèse d'ATP. La respiration à cet état a été aussi enregistrée. Pour les extraits, les différentes concentrations (1,5; 2; 2,5; 3 µg/ml) ont été ajoutées dans la chambre avant la fermeture et l'ajout du succinate (5 µl, 1 M), puis, les différentes étapes ont été enregistrées. Entre deux expérimentations, la chambre a été lavée à l'éthanol 70% puis à l'eau bi-distillée. Les valeurs de chacune des étapes et le rapport de contrôle respiratoire (RCR *respiratory control ratio* ; mesure du couplage de la phosphorylation oxydative et représente le rapport de la respiration à l'état 3 sur celle à l'état 4) ainsi que le rapport ADP/O (indiquant l'efficacité de la phosphorylation oxydative au moment de la respiration à l'état 3) ont été déterminés en utilisant la méthode décrite par Chance et Williams (1956). Ces différents calculs ont été effectués en considérant que l'air a été saturé en eau / oxygène à 236 µM à 30°C.

II.2.4 Propriétés antioxydantes de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica*

Les propriétés antioxydantes des échantillons ont été évaluées d'une part par l'analyse de leur teneur en antioxydants et d'autre part l'étude de leur pouvoir antioxydant.

II.2.4.1 Quantification des antioxydants présents dans les échantillons

II.2.4.1.1 Acide phytique

a) Principe

La quantification de l'acide phytique est basée sur sa précipitation sous forme de phytate ferrique en solution acide. Le réactif de Wade a une coloration violette due à la réaction entre l'ion ferrique (provenant du Fer (III) chlorure hexahydraté : $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et l'acide sulfosalicylique (acide sulfo-5-salicylique dihydraté). En présence d'acide phytique, les ions ferriques se détachent de l'acide sulfosalicylique et forment une liaison phosphoester avec l'acide phytique. Il en résulte une baisse de la coloration mesurée à 500 nm (Latta et Eskin, 1980).

b) Mode opératoire

A un ml d'extrait acide phytique 10 mg/ml de chaque échantillon a été ajouté 2 ml du réactif de Wade (0,03g FeCl₃; 0,3g acide sulfosalicylique). Le mélange a été ensuite homogénéisé et centrifugé (4655g, 5 minutes), le surnageant a été récupéré et sa densité optique a été mesurée à 500 nm de longueur d'onde. Parallèlement, différentes concentrations d'acide phytique permettent d'obtenir une courbe standard, à partir de laquelle l'acide phytique des échantillons a été déterminé et exprimé en µg/mg de poudre de plante.

II.2.4.1.2 L-DOPA

a) Principe

Le dosage de la L-DOPA dans les extraits est basé sur l'absorption UV à 283 nm de longueur d'onde du noyau de la L-DOPA (Brain, 1976).

b) Mode opératoire

Les extraits (10 mg/ml) préparés pour le dosage de la L-DOPA ont été directement soumis à la lecture de la densité optique à 283 nm de longueur d'onde. La quantité de L-DOPA contenu dans les extraits a été déterminée et exprimée en µg/g de poudre de plante en se référant la courbe standard réalisée à partir de la L-DOPA standard.

II.2.4.1.3 Phénols totaux

a) Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) qui sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) au cours de l'oxydation des phénols. L'intensité de la coloration bleue obtenue est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés et la densité optique est lue à 765 nm de longueur d'onde (Singleton *et al.*, 1999).

b) Mode opératoire

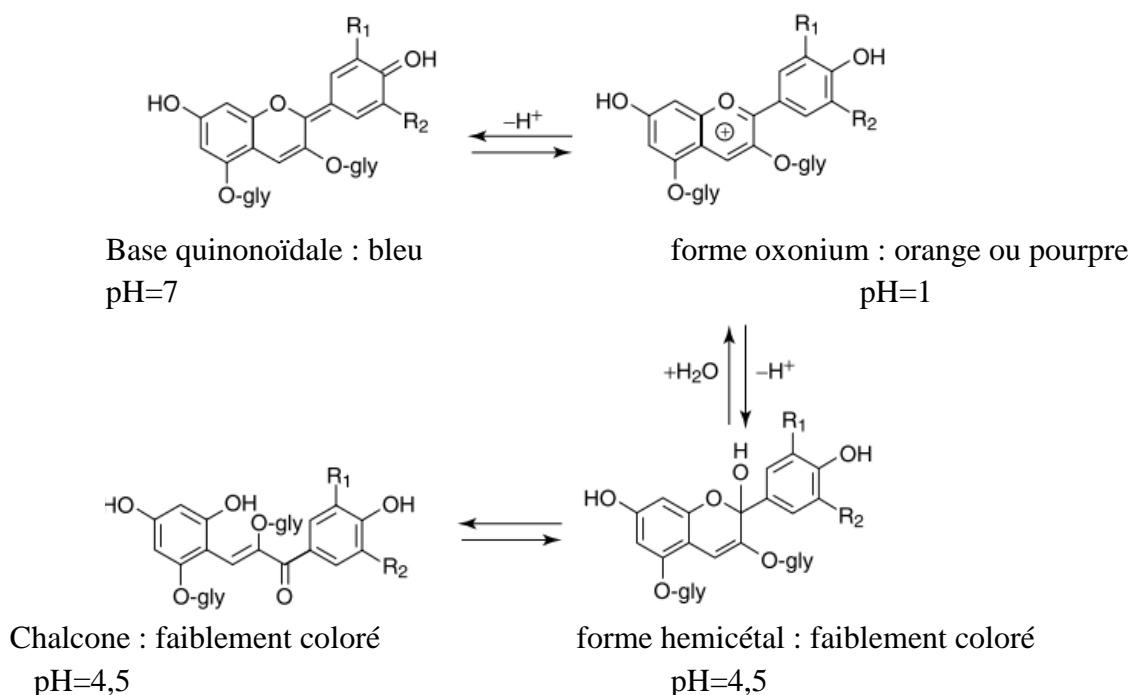
Les extraits MeOH 1%HCl, EtOH 70% et H₂O ont été utilisés. Cinq cent microlitres de réactif de Folin- Ciocalteu (1 : 1 dans l'eau bi-distillée) ont été ajoutés à 100 µl d'extrait 10 mg/ml, et l'ensemble a été homogénéisé et incubé 8 minutes à température ambiante. Un volume de 2,5 ml de carbonate de sodium Na₂CO₃ (2%) a été ensuite ajouté et le mélange homogénéisé et incubé une heure à l'obscurité. La densité optique a été lue à 765 nm contre le

blanc préparé avec 100 µl de solvant d'extraction. La quantité de phénols totaux dans chaque extrait a été calculée en se référant à la courbe standard préparée à partir de la (+)-catéchine et exprimée en mg équivalent catéchine/g de poudre de plante.

II.2.4.1.4 Anthocyanines

a) Principe

La méthode de quantification des anthocyanines est basée sur la transformation structurale des chromophores des anthocyanines en fonction du pH. L'oxonium, forme très colorée prédomine à pH 1 tandis que l'hémicétal, forme moins colorée prédomine à pH 4,5 (Giusti et Wrolstad, 2001).



b) Méthode

Les extraits MeOH 1% HCl, EtOH 70% et H₂O 10 mg/ml ont été utilisés pour cette expérimentation. Au début, le facteur de dilution approprié pour chaque extrait a été déterminé pour des densités optiques comprises entre 0,1 et 0,8. Deux solutions sont utilisées : le chlorure de potassium (0,025M, pH 1) et l'acétate de sodium (0,4 M, pH 4,5). Les échantillons ont été dans un premier temps dilués dans la solution de pH 1 et les densités optiques lues à 513 puis 700 nm de longueur d'onde. Ils ont été par la suite préparés dans le tampon pH 4,5 dans les mêmes rapports de dilution et les densités optiques lues à 513 et 700

nm de longueur d'onde. La densité optique traduisant la proportion d'anthocyanines monomérique dans chaque extrait a été calculée selon la formule :

$$DO = [(DO_{513} - DO_{700})_{pH\ 1}] - [(DO_{513} - DO_{700})_{pH\ 4,5}]$$

L'équation $DO = \epsilon Cl$ a été ensuite utilisée pour déduire la quantité d'anthocyanines en μg (cyanidin-3-glucoside) équivalent/mg de poudre dans chaque extrait ; avec $\epsilon = 269000$ et la masse moléculaire 449,2 g/mol.

II.2.4.1.5 Tocophérols et carotènes

a) Principe

L'analyse de la teneur en tocophérols et en carotènes des échantillons est basée sur la séparation par chromatographie liquide haute performance des constituants des extraits. Cette analyse est effectuée en apportant des modifications aux méthodes décrites par Ching et Mohamed (2001) et Abdul et Majeed (2012) respectivement.

b) Méthode

L'expérimentation se réalise à l'obscurité afin d'éviter tout effet oxydatif de la lumière. À 100 mg de poudre de chaque échantillon ont été successivement ajoutés 500 μl d'éthanol 70%, 400 μl de n-hexane et 400 μl de standard interne (oxime préparé dans l'éthanol 70 %). Les tubes ont été alors passés au vortex et agités pendant 15 minutes à température ambiante à l'obscurité. Ils ont été ensuite centrifugés (10000g, 10 minutes, 4°C), et la fraction à l'hexane a été recueillie, puis 400 μl de n-hexane ont été rajoutés. L'extraction a été reprise trois fois et les fractions d'hexane collectées puis mises ensemble. L'hexane a été ensuite éliminé par évaporation sous nitrogène pendant 20 minutes. À l'extrait sec obtenu ont été ajoutés 300 μl d'une solution acétonitrile 85%, dioxane 11% et MeOH 4% (solvant d'élution). L'ensemble a été passé au vortex et centrifugé (10000 g, 10 minutes, 4°C), puis 180 μl de surnageant prélevés et soumis à l'analyse par HPLC isocratique. Les carotènes ont été analysés par un détecteur UV/visible à 450 nm de longueur d'onde. Les tocophérols quand à eux ont été analysés par un détecteur à fluorescence. La longueur d'onde d'excitation étant 298 nm et la longueur d'onde d'émission 328 nm. Des carotènes et tocophérols standards ont été injectés au début et à la fin de chaque cycle d'analyse. La teneur de chaque échantillon en ces micronutriments a été exprimée en ng/mg de poudre.

II.2.4.1.6 Vitamine C

a) Principe

La vitamine C dans les échantillons est dosée par séparation des constituants des extraits en fonction de leur activité oxydo-réductrice (la cellule électro-chimique étant utilisée comme détecteur) par chromatographie liquide haute performance tel que décrite par Tesoriere *et al.* (2007) avec quelques modifications.

b) Méthode

L'expérimentation se réalise à l'obscurité. A 100 mg de poudre de chaque échantillon ont été ajoutés 800 µl d'acide perchlorique 5%, les tubes ont été passés au vortex, agités pendant 30 minutes à température ambiante, centrifugés (10000 g, 10 minutes, 4°C) et le surnageant collecté et centrifugé une nouvelle fois. Après cette seconde centrifugation, les surnageants ont été collectés puis évaporés et les extraits obtenus soumis à l'analyse par HPLC. A cet effet les extraits ont été préparés en présence ou non de TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine chlorhydrate ou acide-3,3',3''-phosphanetriyltripropanoïque), un agent réducteur qui empêche l'oxydation de l'acide ascorbique. Les tubes ont été constitués d'une part de 100 µl d'extrait + 10 µl TCEP + 40 µl H₂O et d'autre part de 100 µl d'extrait + 50 µl d'H₂O. Une gamme standard (20-100 µM) a été préparée à partir de l'acide ascorbique synthétique et l'analyse effectuée par HPLC isocratique avec le tampon phosphate de sodium (pH 2,5 ; 5 mM) comme éluant. Les composés dans l'éluat passent au détecteur qui est une cellule électrochimique permettant la séparation des molécules actives du point de vue électrochimique parmi lesquels la vitamine C. La teneur de chaque échantillon en vitamine C a été calculée en ng/mg de poudre de plante à partir de la courbe standard.

II.2.4.1.7 Identification et quantification des phénols par HPLC

a) Principe

L'analyse de la teneur des échantillons en phénols particuliers est basée sur la séparation par HPLC des constituants de l'extrait méthanol et d'un mélange de standards préparés dans le tampon d'éluion à 278 nm de longueur d'onde (Trox *et al.*, 2011).

b) Méthode

A cent mg de poudre de chaque échantillon ont été ajoutés 800 µl de éthanol, et le mélange a été passé au vortex et agité pendant 30 minutes. Après centrifugation (10000 g, 10 minutes), le surnageant a été collecté et le résidu re-extrait deux fois par ajout de 800 µl de

éthanol. Les surnageants collectés ont été ensuite mis ensemble, et l'éthanol a été évaporé sous nitrogène pendant 20 minutes. Le résidu obtenu a été redissout dans 300 µl d'éthanol 5% acide formique et centrifugé (10000 g, 10 minutes), et le surnageant ou extrait a été collecté. 180 µl de cet extrait ont été ensuite analysés par HPLC à gradient d'élution (A : 95% H₂O, 5% acide formique ; B : 85% acétonitrile, 10% H₂O, 5% acide formique). Le gradient utilisé a été le suivant : 0-10 minutes, 0%B; 10-17 minutes, 15%B; 17-36 minutes, 15%B; 36-45 minutes, 60%B; 45-46 minutes, 100%B; 46-50 minutes, 0%B; 50 minutes, 0%B. Une solution standard constituée de 11 phénols de référence (catéchine, acide cafféique, épicatechine, naringine, phlorizin dihydrate, rutin, resvératrol, quercetin, 4, 5, 7-trihydroxyflavone, apigénine et flavone) a été préparée et une gamme standard élaborée. Pour s'assurer de la stabilité des conditions d'analyse la gamme de standard a été analysée avant et après les extraits. La teneur en phénols déterminée par le détecteur UV à 278 nm de longueur d'onde en se référant à la courbe standard de chaque phénol et a été exprimée en ng/ml.

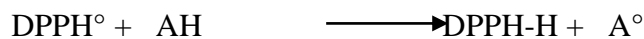
II.2.4.2 Evaluation de l'activité antioxydante

Les extraits acide phytique, L-DOPA et phénols totaux (MeOH 1% HCl) préparés précédemment ont été utilisés pour l'évaluation de leurs activités antioxydantes respectives.

II.2.4.2.1 Activité anti-radiaculaire sur le radical DPPH°

a) Principe

Ce test est basé sur l'habilité du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) à recevoir un électron d'un antioxydant. En effet, en présence d'antioxydant AH ou d'un radical R°, le radical synthétique DPPH° de coloration violette est stabilisé en DPPHH ou DPPHR ; et cette réaction se traduit par la baisse de la densité optique lue à 515 nm de longueur d'onde (Brand-williams *et al.*, 1995).



Plus la densité optique est faible, plus l'activité antioxydante de l'échantillon analysé est importante.

b) Méthode

Un volume de 100 µl d'échantillon (10 mg/ml) à analyser a été additionné à 3,9 ml d'une solution fraîchement préparée de DPPH° (0,025 g/l dans du méthanol) et l'ensemble a

été incubé pendant 30 minutes à 25°C à l'obscurité. Parallèlement le contrôle négatif constitué uniquement de réactif (4 ml) et le contrôle positif constitué de 100 µl de BHT ou de vitamine C (1 mg/ml) ont été également préparés. Après incubation, les densités optiques ont été lues à 517 nm contre le méthanol et l'activité antiradicalaire calculée suivant la formule ci-après :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \frac{\text{DO contrôle négatif} - \text{DO essai}}{\text{DO contrôle négatif}} \times 100$$

II.2.4.2.2 Évaluation du pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

a) Principe

Cette méthode est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire les ions ferriques Fe^{3+} en ions ferreux Fe^{2+} par transfert d'électron. Cette réduction conduit à la formation d'un complexe coloré bleu Fe^{2+} / 2, 4, 6-tripyridyl-S-triazine dont la densité optique est lue à 593 nm (Benzie et Strain, 1996 ; Pulido *et al.*, 2000).

b) Méthode

Le milieu réactionnel est constitué d'une solution de 2, 4, 6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ, 20 mM) préparée dans le HCl (40 mM), de chlorure ferrique (FeCl_3 , 20 mM) et du tampon acétate (pH 3,6 ; 0,3 M) selon le rapport 2,5/ 2,5/ 25. Neuf cent microlitres de milieu réactionnel fraîchement préparé ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C, et 90 µl d'eau distillée et 30 µl d'extrait 10 mg/ml (ou méthanol pour le blanc) y ont été successivement ajoutés. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis les densités optiques ont été lues à 593 nm de longueur d'onde contre le blanc. La vitamine C (1 mg/ml) et le BHT (1 mg/ml) ont été utilisés comme contrôles positifs. Le pouvoir réducteur des extraits a été calculé à partir de la courbe standard réalisée à partir du sulfate ferreux $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 – 100 µM) et exprimé en mM FeSO_4 /g de matière sèche.

II.2.5 Caractérisation de l'activité antiproliférative de *Xylopiya aethiopica* et purification de la molécule la plus active

II.2.5.1 Viabilité sur les fibroblastes normaux

Le test de viabilité a été effectué par le réactif WST -1 tel que décrit précédemment.

II.2.5.2 Effet de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN

a) Principe

La progression dans le cycle cellulaire est un processus hautement régulé. Le cycle cellulaire est arrêté lorsque les conditions ne sont pas bonnes, par exemple en cas de fragmentation (importante) de l'ADN.

Cette fragmentation est quantifiable à l'aide du cytomètre par répartition différentielle des cellules en phase G1 et G2M (M pour mitose) respectivement par marquage des antigènes spécifiques présents dans les cellules. Les cellules à différentes phases du cycle sont détectées par marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les cellules présentant une fragmentation de l'ADN seront révélées quant à elles par les anticorps anti-gamma H2AX (Coquelle *et al.*, 2006).

b) Mode opératoire

i. Ensemencement et traitement des cellules

Les cellules cancéreuses U2OS ont été ensemencées dans des boîtes de 60 mm à raison de 3×10^5 cellules/ 4 ml / boîte, et incubées à 37°C sous 5% CO₂. 24 h après ensemencement, les cellules ont été traitées par l'extrait de *X. aethiopica* à 25 µg/ml et incubées de nouveau pour 24 h. Après incubation les cellules ont été fixées et marquées pour analyse par cytométrie flux.

ii. Fixation des cellules

Le milieu de culture de chaque boîte a été récolté et les cellules lavées au PBS puis traitées par la trypsine et récupérées par ajout de milieu de culture. Les cellules ainsi récoltées ont été centrifugées (500 g, 4 minutes, 4°C) et le culot (constitué de cellules) récupéré puis resuspendu par ajout de 1 ml de PBS froid. Trois ml d'éthanol absolu à -20°C ont été ensuite ajoutés concomitamment avec homogénéisation douce et les tubes placés à -20°C pour 2 h.

iii. Marquage

Les cellules ont été réhydratées par ajout de 3 ml de PBS/ASB (1%) en homogénéisant lentement. Les homogénats ont été centrifugés (500 g, 5 minutes, 4°C) et le culot (constitué de cellules) récupéré. Les cellules ont été à nouveau suspendues dans 1 ml de PBS/ASB (1%) et centrifugées une seconde fois. Les cellules ont été ensuite perméabilisées par resuspension dans 1ml de PBS/ASB (1%) / Triton X-100 (0,25%) et incubation dans la glace pendant 7

minutes. Deux ml de PBS/ASB (1%) ont été ensuite ajoutés, l'ensemble a été centrifugé (500 g, 5 minutes, 4°C) et le surnageant éliminé. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-gamma H2AX de souris (utilisé pour la quantification des dommages à l'ADN) à la dilution 1/1000 dans du PBS/ASB (1%) pendant 1 heure à température ambiante. Un ml de PBS/ASB (1%) y a été ensuite ajouté puis l'ensemble a été centrifugé (500 g, 5 minutes, 4°C) et le culot constitué de cellules récupéré. Les cellules ont été resuspendues dans 50µl de PBS/ASB (1%) contenant l'anticorps secondaire anti-souris Alexa 647 à la dilution 1/500. L'ensemble a été alors incubé à température ambiante pendant 45 minutes à l'obscurité. Un ml de PBS/ASB (1%) a été ensuite ajouté, les cellules ont été centrifugées (500 g, 5 minutes, 4°C) et le culot récupéré. Les cellules ont été resuspendues dans 500 µl d'une solution PBS + RNase + iodure de propidium (solution de marquage de l'ADN) dans les rapports volume / volume : 500/10/5, et incubées pendant 20 minutes à température ambiante, puis soumises à l'analyse au cytomètre.

iv. Analyse au cytomètre ou FACS (*fluorescence activated cell sorter*)

Le cytomètre utilisé permet d'obtenir des graphes et des valeurs indiquant :

- Le pourcentage de cellules à différentes phases du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium)
- Le pourcentage de cellules ayant leur ADN fragmenté (marquage par les anticorps anti-gamma H2AX).
- La phase du cycle dans laquelle se trouvent les cellules ayant le plus de dommages à l'ADN.

II.2.5.3 Analyse HPLC de l'extrait éthanol 70% de *X. aethiopica*

A la suite des travaux précédents, l'analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC / SM) de l'extrait éthanol 70% de *X. aethiopica* a été réalisée.

a) Préparation de l'extrait sec

Vingt ml de l'extrait éthanol 70% ont été introduits dans un ballon stérile, puis passés à l'évaporateur rotatif à 40°C pendant 20 minutes sous 100 bars de pression. La stabilité de l'extrait sec obtenu a été évaluée par HPLC avant et après exposition à température ambiante.

b) Analyse HPLC / SM

Un gramme d'extrait sec a été solubilisé dans le mélange méthanol/ DMSO (10 : 1) et 500 µl de cet extrait ont été dilués dans 500 µl de méthanol. L'analyse au chromatographe et

au spectromètre de masse de l'extrait a été réalisée par injection de 10 µl d'extrait dans une colonne Xbridge C18 4,6 x 150mm, 5µm chargé négativement (colonne *LiChroCART® 250-4 Purosphere® star Si* (5 µm) 0,46cm X 25cm (*HPLC Jasco* muni de 2 pompes *pu-2080 plus*, d'un révélateur *rivelator md-210* et un autoinjecteur *as-2055 plus*). Le mélange eau / acétonitrile contenant 0,05% acide formique (en gradient) a été utilisé comme phase mobile et le débit de colonne étant de 1 ml/min. La longueur d'onde à laquelle les composés ont été identifiés au détecteur UV est de 260 nm.

II.2.5.4 Identification de la fraction la plus active par le réactif WST-1

À l'issue de l'analyse par chromatographie, les différentes fractions/ molécules présentes dans l'extrait ont été collectées et analysées par le test de viabilité au réactif WST-1 comme décrit précédemment. Ces différentes fractions ont été analysées aux doses 0; 2,5; 5; 10 et 20 µg/ml. L'étude de la fragmentation de l'ADN et l'effet sur le cycle cellulaire ont été effectués comme précédemment décrit pour l'extrait total.

Pour la fraction la plus active, le test de prolifération des cellules HCT 116, U2OS, Sum PT 159, Capan 2PC et fibroblastes normaux ainsi que le test de clonogénie sur plastique sur les cellules HCT 116 ont été effectués. Ensuite, les cellules HCT 116 ont été utilisées pour l'étude de la relation effet – concentration effectuée par l'analyse des effets de la fraction la plus active sur la fragmentation de l'ADN et le cycle cellulaire; les principes et modes opératoires étant les mêmes que ceux décrits précédemment pour les analyses similaires.

II.2.5.5 Analyse de la fraction la plus active sur des marqueurs de l'apoptose

II.2.5.5.1 Identification des noyaux apoptotiques par marquage DAPI

a) Principe

Cette méthode d'identification des noyaux apoptotiques est basée sur le marquage de l'ADN des cellules préalablement traitées par un agent intercalant fluorescent : le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). Les cellules ont été par la suite observées au microscope à fluorescence et l'apparence morphologique de l'ADN des cellules analysée.

b) Mode opératoire

Les cellules cancéreuses U2OS ont étéensemencées dans des plaques 6 puits contenant des lamelles préalablement stérilisées. Les cellules ont étéensemencées à raison de

5×10^4 cellules/ 2 ml de milieu de culture et incubées pendant 24 h à 37°C sous 5% CO₂. Après incubation, les cellules ont été traitées soit par la fraction la plus active à 20 µg/ml, soit par la doxorubicine (cytotoxique de référence) à 10 nM, soit par l'éthanol 70 % pour le contrôle et ré-incubées pour 24 h. Après cette incubation le milieu de culture a été enlevé et les cellules fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Elles ont été ensuite rincées au PBS, traitées au méthanol à -20°C et incubées pendant 6 minutes à -20°C. Le méthanol a été ensuite enlevé et les cellules réhydratées par incubation dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont été par la suite perméabilisées par le triton X-100 à 0,1% pendant 5 minutes à température ambiante puis rincées au PBS. L'ADN des cellules a été ensuite marqué par un agent intercalant, le DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole ((1 mg/ml) préparé à la dilution 1/10000 dans le PBS), et incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Les lamelles sur lesquelles se trouvent les cellules marquées ont été rincées au PBS puis à l'eau bi-distillée et séchées. Ces lamelles ont été par la suite montées sur des lames et observées au microscope à fluorescence.

II.2.5.5.2 Evaluation de la fraction la plus active sur la PARP clivé par western blot

a) Principe

La PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) est une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN en cas de dommages. Cette protéine est inactivée par les facteurs inducteurs d'apoptose qui entraînent son clivage protéolytique. Il en résulte la PARP clivée, un marqueur de l'irréversibilité et de l'engagement définitif de la cellule dans le processus de mort programmé (Melchini *et al.*, 2009).

L'identification de la PARP clivée dans les cellules traitées est basée sur la séparation des protéines cellulaires par Western blot.

b) Mode opératoire

Les cellules U2OS ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 3×10^5 cellules/ 2 ml de milieu et incubées pendant 24 h à 37°C sous 5% CO₂. Les cellules ont été ensuite traitées pour 8, 24 et 48 h soit par la fraction la plus active (20 µg/ml), soit par la doxorubicine (10 nM), soit par l'éthanol 70% pour le contrôle. Les cellules après traitement ont été lavées au PBS, puis lysées au tampon de lyse froid (Tris-HCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 50 mM fluorure de sodium, 1 mM sodium orthovanadate, 100 µg/ml PMSF, 50 µg/ml TLCK, 2 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatine et 1

µg/ml aprotinine). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de sodium dodécylsulfate- polyacrylamide) et transférées sur la membrane de nitrocellulose. Les sites non spécifiques sur la membrane ont été ensuite bloqués au TBST 5% lait, et la membrane a été hybridée par l'anticorps primaire anti-PARP de lapin monoclonal à la dilution 1/500. L'ensemble a été incubé à 4°C pendant 12 h sous agitation. La membrane a été ensuite lavée 3 fois pendant 10 minutes au TBST et incubée pendant 3h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire (anti-PARP de lapin 488 à la dilution 1/800) couplé à la peroxydase à la dilution 1/5000. Après incubation la membrane a été lavée 3 fois au TBST et la révélation des protéines effectuée par le réactif de luminescence (*West Dura extended duration substrat, thermoscientific*). Les résultats ont été analysés au G-Box Syngene lié à un ordinateur où la membrane a été visualisée. Pour vérifier que les puits ont été préparés de manière uniforme, l'actine a été révélée par marquage à l'anticorps anti-actine à la dilution 1/10000.

II.3 ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableaux ou figures. Les valeurs représentent les moyennes \pm déviation standard ($M \pm DS$) de 3 ou 5 expérimentations indépendantes. Les données ont été étudiées par analyse de la variance (ANOVA) à un facteur et les différences déterminées par le test 't' de Student. Les concentrations inhibitrices 50 (IC50) des extraits/ fractions ont été déterminées par le logiciel GraphPad Prism 5.

III RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1 ACTIVITÉ ANTIPROLIFÉRATIVE DES EXTRAITS

L'étude de l'activité antiproliférative de extraits a été effectuée sur différentes lignées cellulaires par diverses méthodes : l'effet de 25 µg/ml de chaque extrait sur la prolifération des cellules, l'effet de différentes concentrations d'extraits sur la prolifération des colonies des cellules HCT 116, l'effet de différentes concentrations d'extraits sur la viabilité des cellules HCT 116, U937 et KG1a évaluée par le test au WST-1, l'effet de différentes concentrations d'extraits sur la viabilité des cellules MDA-MB 231, MCF 7 et MCF 12A par le test à la sulforhodamine B (SRB).

III.1.1 Effet des extraits des plantes sur la prolifération de différentes lignées de cellules cancéreuses

Le tableau II ci-dessous représente l'effet de 25 µg/ml des différents extraits sur la prolifération (mesuré par comptage cellulaire après ensemencement de 50 000 cellules par puits) de différentes populations cellulaires après 4 jours de traitement.

Tableau II: Effet des extraits à la concentration de 25 µg/ml sur la croissance des différents types de cellules.

Prolifération cellulaire (% du contrôle)							
Cellules	25 µg/ml d'extrait de plante	Témoin	<i>F. leprieuri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>L. guineensis</i>	<i>M. myristica</i>	<i>X. aethiopica</i>
Capan 2 PC		100 ± 0	56,47 ± 20,41	133,06 ± 24,94	124,49 ± 18,81	103,12 ± 21,58	1,0 ± 0,5 ^c
U2OS		100 ± 0	72,85 ± 6,72 ^a	124,31 ± 18,70	113,29 ± 9,87	110,83 ± 20,44	10,04 ± 6,34 ^b
Sum PT 159		100 ± 0	81,98 ± 4,39 ^a	85,56 ± 9,08	102,58 ± 7,61	89,74 ± 6,00	8,61 ± 5,42 ^b
HCT 116		100 ± 0	69,70 ± 10,22 ^a	117,74 ± 17,30	126,79 ± 16,33	108,37 ± 12,81	12,40 ± 4,44 ^b
KG1a		100 ± 0	65,90 ± 17,52	90,04 ± 25,29	110,59 ± 41,74	95,38 ± 27,73	43,64 ± 0,95 ^c
U937		100 ± 0	73,82 ± 1,46 ^b	65,33 ± 6,99 ^a	61,81 ± 0,44 ^c	71,33 ± 4,51 ^a	1 ± 0 ^c

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes. ^(a) p<0,05 ; ^(b) p<0,005 ; ^(c) p<0,0005 ; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

Capan 2PC : adénocarcinome de pancréas, U2OS : ostéosarcome, Sum PT 159 : carcinome de sein, HCT 116 : cancer colorectal, KG1a, U937 : cellules leucémiques.

D'après le tableau II l'extrait de *X. aethiopica* inhibe totalement la prolifération des cellules Capan 2PC et U937. Cet extrait exerce également une activité antiproliférative significative sur la prolifération des cellules U2OS, Sum PT 159 et HCT 116 avec respectivement $10,04 \pm 6,34\%$ ($p \leq 0,005$); $8,61 \pm 5,42\%$ ($p \leq 0,005$) et $12,40 \pm 4,44\%$ ($p \leq 0,0005$) de cellules vivantes restantes. L'extrait de *F. leprieuri* montre une activité cytotoxique moins significative que celle de *X. aethiopica* avec respectivement $72,85 \pm 6,72\%$ ($p \leq 0,05$); $81,98 \pm 4,39\%$ ($p \leq 0,05$) et $69,70 \pm 10,22\%$ ($p \leq 0,05$) de prolifération des cellules U2OS, Sum PT 159 et HCT 116. Sur les cellules leucémiques, l'extrait de *X. aethiopica* inhibe significativement les deux types cellulaires testés avec une inhibition totale de la prolifération des cellules U937. Les autres extraits montrent une activité cytotoxique significative sur U937 ($p \leq 0,005$; $0,05$; $0,0005$; $0,005$ respectivement pour *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides*, *L. guineensis* et *M. myristica*). Ces résultats montrent que, comme les cellules issues de tumeurs solides, les cellules issues de tumeurs liquides sont sensibles aux effets antiprolifératifs des extraits étudiés. D'autre part ces résultats indiquent que la lignée KG1a, décrite dans la littérature comme résistante aux molécules cytotoxiques l'est aussi aux extraits étudiés.

III.1.2 Relation concentration – effet des extraits

Afin d'étudier la variation de l'activité antiproliférative des différents extraits en fonction de la concentration, la relation concentration – effet a été étudiée en utilisant deux tests : le test de clonogénie sur plastique, le test de viabilité par le réactif WST-1 et à la sulforhodamine B (SRB).

III.1.2.1 Test de clonogénie sur plastique

Le tableau III représente le nombre de colonies formées par des cellules HCT116ensemencées à faible densité et comptées après 8 jours de traitement à concentrations croissantes des différents extraits.

Tableau III: Effet des extraits à différentes concentrations sur la croissance des colonies des cellules HCT 116.

Nombre de colonie en % du contrôle					
	0 µg/ml	3,1 µg/ml	6,2 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml
<i>X. aethiopica</i>	100 ± 0	7,38 ± 3,01 ^c	0,00	0,00	0,00
<i>F. leprieuri</i>	100 ± 0	100,09 ± 22,94	97,24 ± 11,89	29,67 ± 8,14 ^b	7,03 ± 1,59 ^c
<i>F. xanthoxyloides</i>	100 ± 0	95,65 ± 24,78	98,37 ± 10,78	90,45 ± 4,10	66,53 ± 9,87 ^a
<i>L. guineensis</i>	100 ± 0	82,42 ± 10,67	95,31 ± 16,45	93,34 ± 6,13	84,66 ± 19,36
<i>M. myristica</i>	100 ± 0	97,04 ± 7,16	92,59 ± 23,63	74,18 ± 6,07 ^a	55,09 ± 11,07

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes. . ^(a) p<0,05 ; ^(b) p<0,005; ^(c) p<0,0005 ; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

Les résultats du tableau III montrent que l'extrait de *X. aethiopica* inhibe à très faible concentration (3,1 µg/ml) la formation des colonies de cellules HCT116 avec une IC50 de 1,63 ± 0,09 µg/ml. L'extrait de *F. leprieuri* présente également une activité cytotoxique significative puisqu'une activité cytotoxique importante est observée aux concentrations 12,5 et 25 µg/ml (p ≤ 0,005). Les autres extraits ont une activité cytotoxique significative essentiellement aux concentrations élevées.

III.1.2.2 Effet des extraits sur la viabilité par le test au WST-1

Nous avons mesuré la viabilité des cellules cancéreuses HCT116 et des cellules leucémiques (U937, KG1a) après 4 jours de traitement avec les différents extraits en utilisant le test WST-1. Les résultats sont présentés par le tableau IV.

Tableau IV: Effet des extraits à différentes concentrations sur la viabilité des cellules HCT 116, KG1a et U937 par le test au WST-1.

	0 µg/ml	3,1 µg/ml	6,2 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	
HCT 116	<i>F. leprieuri</i>	100 ± 0	109,13 ± 9,39	105,24 ± 2,56	109,54 ± 1,19	68,06 ± 25,87 ^a
	<i>F. xanthoxyloides</i>	100 ± 0	106,61 ± 5,13	107,58 ± 6,97	108,08 ± 9,41	104,78 ± 4,59
	<i>L. guineensis</i>	100 ± 0	104,80 ± 8,61	99,18 ± 5,36	89,54 ± 8,06	80,73 ± 3,94 ^a
	<i>M. myristica</i>	100 ± 0	114,86 ± 11,96	112,74 ± 9,04	111,61 ± 5,61	95,60 ± 5,90
	<i>X. aethiopica</i>	100 ± 0	111,8 ± 14,52	103,61 ± 9,67	44,71 ± 12,24 ^a	12,03 ± 4,76 ^b
KG1a	<i>F. leprieuri</i>	100 ± 0	101,70 ± 20,21	86,14 ± 11,29	91,97 ± 15,29	81,68 ± 19,69
	<i>F. xanthoxyloides</i>	100 ± 0	111,45 ± 12,20	91,82 ± 1,17	100,32 ± 12,73	98,72 ± 9,56
	<i>L. guineensis</i>	100 ± 0	75,67 ± 6,92	89,54 ± 8,77	84,77 ± 9,19	80,17 ± 11,39
	<i>M. myristica</i>	100 ± 0	84,54 ± 12,32	90,38 ± 18,97	77,27 ± 14,91	89,20 ± 11,08
	<i>X. aethiopica</i>	100 ± 0	96,24 ± 10,16	99,51 ± 18,53	103,83 ± 14,74	57,41 ± 4,80 ^b
U 937	<i>F. leprieuri</i>	100 ± 0	107,60 ± 10,77	96,03 ± 7,27	97,77 ± 9,45	76,92 ± 5,72 ^a
	<i>F. xanthoxyloides</i>	100 ± 0	97,10 ± 28,83	86,59 ± 28,30	75,74 ± 19,87	71,25 ± 10,12 ^a
	<i>L. guineensis</i>	100 ± 0	84,11 ± 16,33 ^a	73,45 ± 7,16	52,27 ± 9,60 ^a	54,51 ± 9,46 ^a
	<i>M. myristica</i>	100 ± 0	81,11 ± 11,42	59,82 ± 9,93 ^a	53,42 ± 14,23 ^a	54,32 ± 15,16 ^a
	<i>X. aethiopica</i>	100 ± 0	77,52 ± 14,86	62,02 ± 11,20	34,95 ± 14,60 ^a	5,79 ± 4,15 ^b

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes. . ^(a) p<0,05 ; ^(b) p<0,005; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

La viabilité des cellules HCT116 est significativement réduite par l'extrait de *X. aethiopica* à partir de la concentration 25 µg/ml avec seulement 12,03 ± 4,76% ($p \leq 0,005$) des cellules viables comparées à 100% de cellules contrôles. Cette activité de *X. aethiopica* est fonction de la concentration. Pour les extraits de *F. leprieuri* et *L. guineensis*, seule la concentration la plus élevée, 25 µg/ml, montre un effet inhibiteur sur la viabilité des cellules HCT116 ($p \leq 0,005$ et 0,05 respectivement).

Aussi, l'extrait de *X. aethiopica* inhibe significativement la viabilité des cellules KG1a uniquement à la concentration élevée (25 µg/ml) caractérisée par 57,40 ± 4,8% ($p \leq 0,005$) de cellules viables comparées au contrôle. Cependant le traitement des cellules KG1a par les autres extraits n'affecte pas significativement leur viabilité comparé au contrôle. Ces résultats montrent également la résistance des cellules KG1a aux différents extraits comparés aux cellules U937.

Sur les cellules leucémiques U937, l'extrait de *X. aethiopica* a un effet inhibiteur variant également en fonction de la concentration sur la viabilité cellulaire. Cet effet est significatif à partir de la concentration 12,5 µg/ml ou seulement $34,95 \pm 14,6\%$ ($p \leq 0,05$) de cellules viables sont quantifiées. Les extraits de *L. guineensis* et *M. myristica* montrent une activité cytotoxique significative à partir de la concentration 12,5 µg/ml ($p \leq 0,05$), tandis que ceux de *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* sont cytotoxiques à la concentration de 25 µg/ml ($p \leq 0,05$) uniquement.

Les concentrations inhibitrices 50 (IC50) de ces extraits obtenues de ce test de viabilité sont résumées dans le tableau V.

Tableau V: Concentrations inhibitrices 50 (IC50) par analyse au WST-1.

	IC50 (µg/ml)				
	<i>F. leprieuri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>L. guineensis</i>	<i>M. myristica</i>	<i>X. aethiopica</i>
HCT 116	> 25	> 25	> 25	> 25	12,02 ± 1,05
U937	> 25	> 25	> 25	> 25	7,5 ± 0,51
KG1a	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes. HCT 116 : cellules d'ostéosarcome, U937 et KG1a : cellules leucémiques

Il ressort de ce tableau que l'extrait de *X. aethiopica* a une activité cytotoxique sur les cellules HCT116 et U937 avec des IC50 respectives de $12,02 \pm 1,05$ et $7,5 \pm 0,51$ µg/ml (tableau V). Les autres extraits bien qu'inhibant la prolifération des cellules présentent des $IC50 \geq 25$ µg/ml.

III.1.2.3 Effet des extraits sur la viabilité des cellules MDA-MB 231, MCF 7 et MCF 12 A par coloration des protéines à la sulforhodamine B (SRB)

Nous avons complété l'étude de la relation effet-concentration des différents extraits en mesurant la viabilité cellulaire des cellules normales et cancéreuses du sein par le test à la sulforhodamine B. Les figures 5 (A, B, C, D et E), 6 (A, B, C, D et E) et 7 (A, B, C, D et E) indiquent l'effet des extraits sur les cellules MDA-MB 231, MCF7 et MCF 12A.

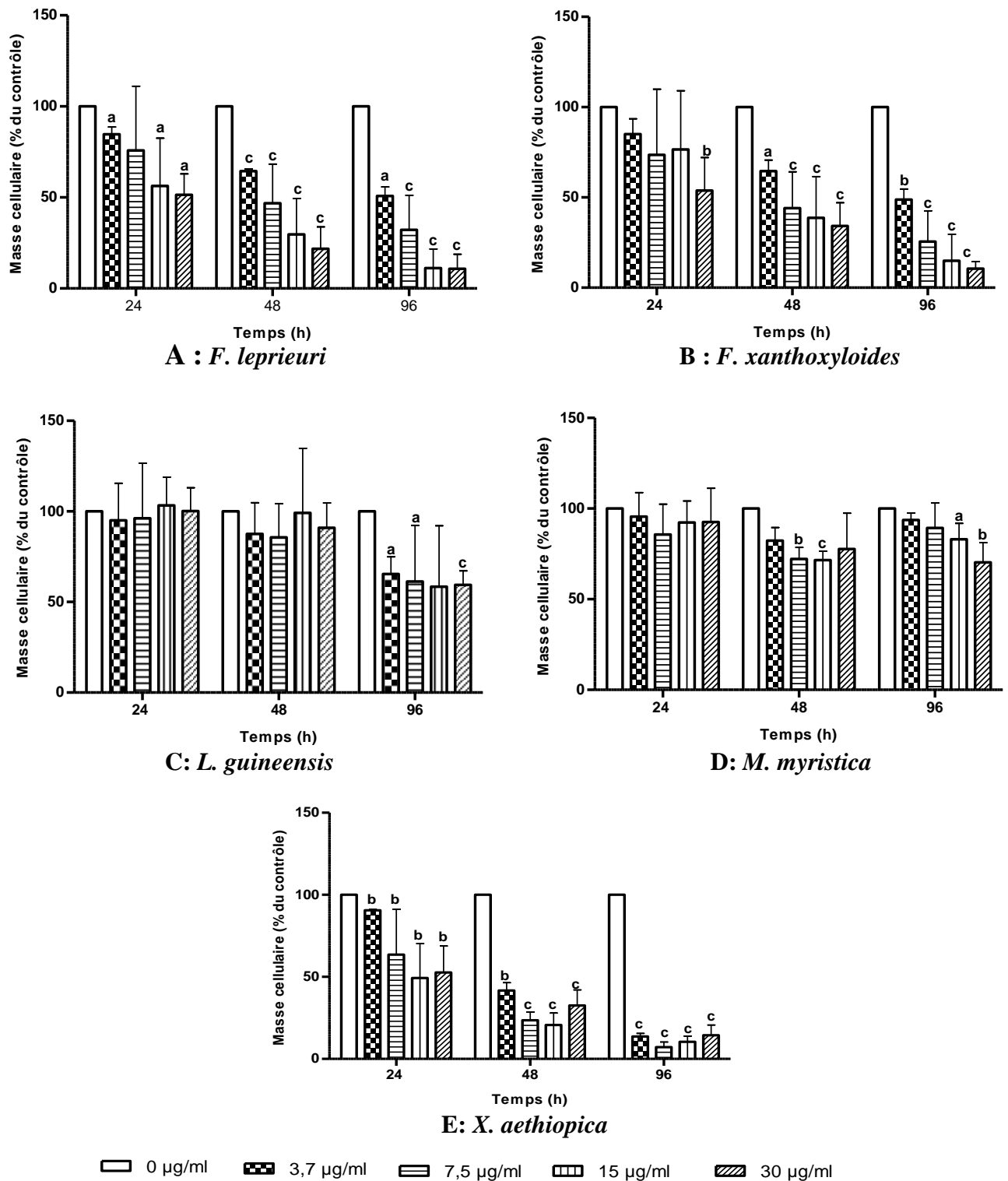


Figure 5: Viabilité des MDA-MB 231 en présence des extraits de *F. lepreuri* (A), *F. xanthoxyloides* (B), *L. guineensis* (C), *M. myristica* (D) et *X. aethiopica* (E).

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 5 expériences indépendantes. (a) $p < 0,05$; (b) $p < 0,005$; (c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student). MDA-MB 231 : carcinome du sein.

Le test par la sulforhodamine B sur les cellules de cancer du sein MDA-MB 231 montre une activité cytotoxique significative des extraits de *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* en fonction de la concentration et du temps (figure 5). Cet effet est nettement important à partir de la dose 3,7 µg/ml aux temps d'incubation 48 et 96 h ($p \leq 0,005$ et $p \leq 0,05$ respectivement *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides*). L'extrait de *X. aethiopica* quant à lui montre une activité antiproliférative significative en fonction du temps, avec le maximum d'activité observé à 96 h de traitement. Pour les extraits de *M. myristica* et *L. guineensis*, l'activité cytotoxique significative ($p \leq 0,005$) est observée en général après 96 h de traitement.

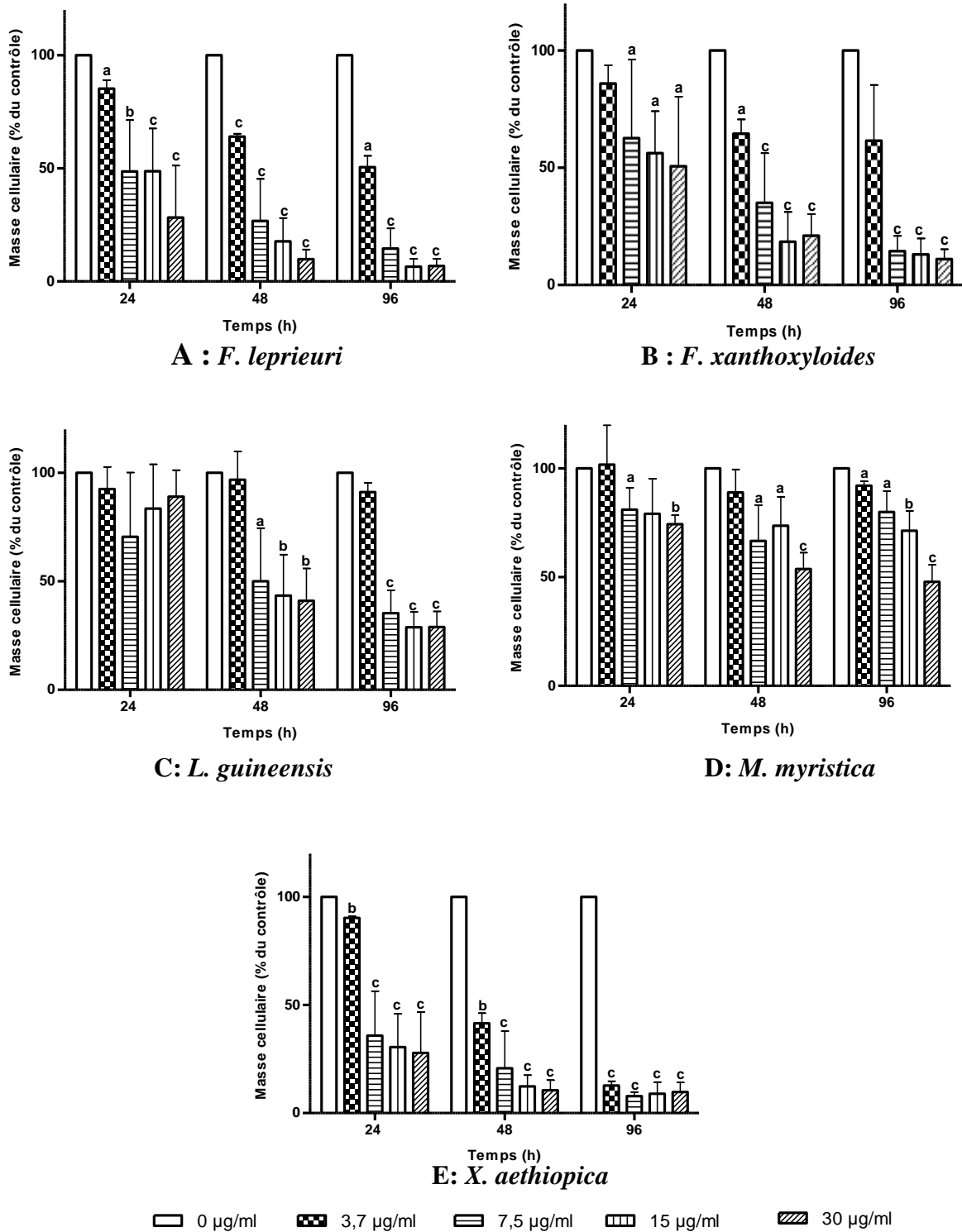


Figure 6: Viabilité des cellules MCF 7 en présence des extraits de *F. lepreuri* (A), *F. xanthoxyloides* (B), *L. guineensis* (C), *M. myristica* (D) et *X. aethiopica* (E).

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 5 expériences indépendantes. .^(a) $p < 0,05$; ^(b) $p < 0,005$; ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student). MCF 7 : adénocarcinome du sein.

Sur les cellules MCF 7, excepté *M. myristica*, les extraits montrent une inhibition de la prolifération cellulaire variant en fonction de la concentration et du temps (figure 6). Pour les extraits de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica*, cette inhibition est d'ores et déjà hautement significative après 24h d'incubation ($p < 0,0005$) uniquement. L'extrait de *M. myristica* présente une activité inhibitrice fonction de la concentration ($p < 0,005$) sans aucune influence du temps d'incubation; tandis que celui de *L. guineensis* est actif à partir de 48h ($p < 0,005$) d'incubation aux concentrations $\geq 7,5 \mu\text{g/ml}$. Ceci souligne l'importance d'une concentration et/ou d'un temps de traitement minimum pour l'activité de ces 2 extraits.

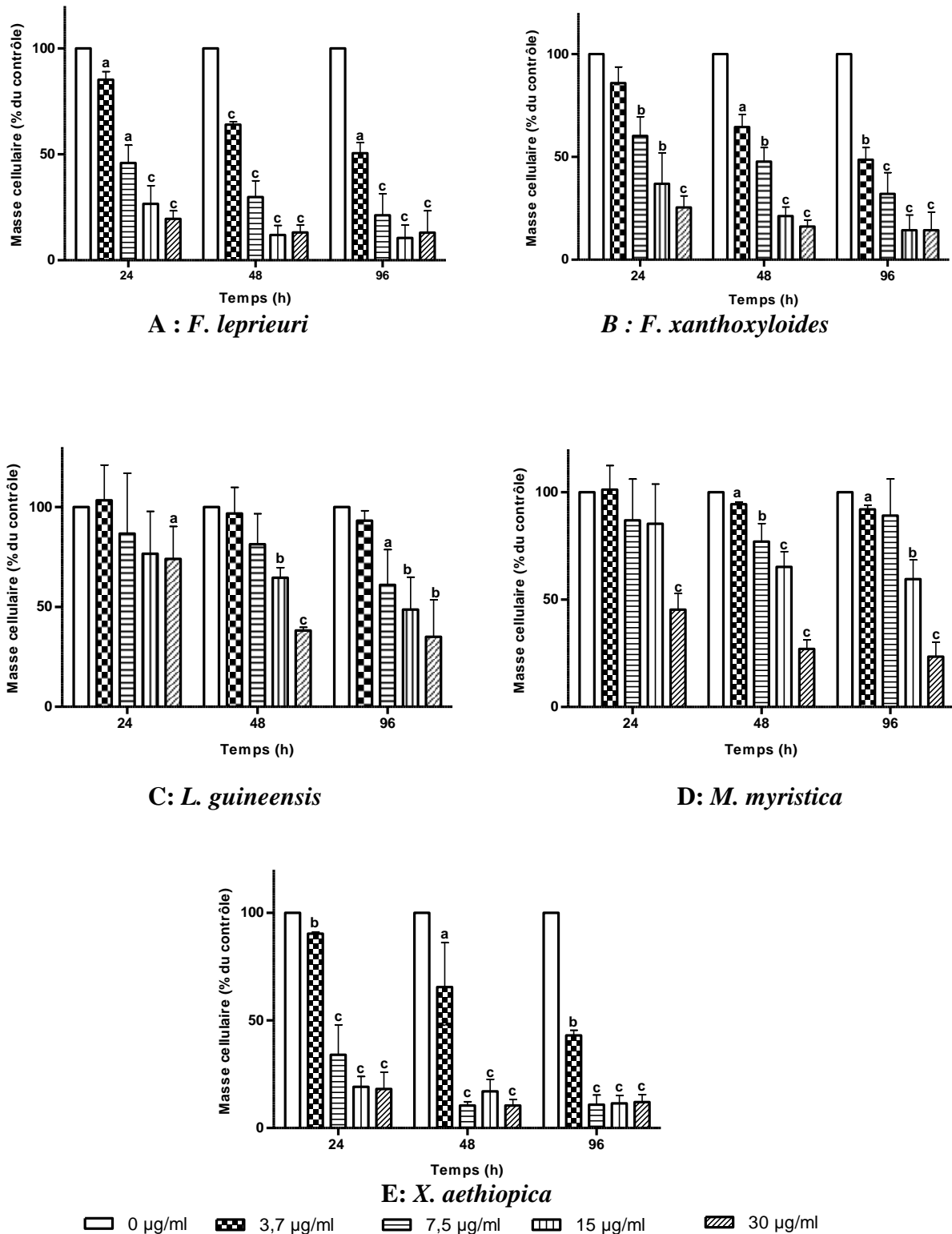


Figure 7: Viabilité des cellules MCF 12A en présence des extraits *F. leprieuri* (A), *F. xanthoxyloides* (B), *L. guineensis* (C), *M. myristica* (D) et *X. aethiopica* (E).

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 5 expériences indépendantes. ^(a) $p < 0,05$; ^(b) $p < 0,005$; ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student). MCF 12A : cellules normales du sein.

La prolifération des cellules normales MCF 12A est inhibée de manière significative et similaire à celle des cellules tumorales pour la plupart des extraits à l'exception de *X. aethiopica* qui semble avoir un effet moins important que celui observé sur les cellules tumorales (figure 7). Cette prolifération cellulaire après traitement par tous les extraits en général varie en fonction de la concentration et du temps. Cependant les extraits de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica* présentent une importante activité inhibitrice à partir de la plus petite concentration et à la plus courte durée d'incubation. Les extraits de *M. myristica* et *L. guineensis* ne sont efficaces qu'après un temps minimum d'incubation de 48h traduisant la nécessité d'un laps de temps pour leur activité.

Le tableau VI représente les concentrations inhibitrices 50 (IC50) des extraits sur les cellules MDA-MB 231, MCF7 et MCF 12A.

Tableau VI: Concentrations inhibitrices 50 (IC50) par analyse à la SRB.

		IC 50 (µg/ml)				
		<i>F. leprieuri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>L. guineensis</i>	<i>M. myristica</i>	<i>X. aethiopica</i>
MDA-MB 231	24 h	8,78 ± 5,38	> 30	> 30	> 30	> 30
	48 h	8,62 ± 3,87	6,72 ± 1,37	> 30	> 30	5,59 ± 0,23
	96h	6,46 ± 1,11	6,04 ± 0,88	13,01 ± 4,47	> 30	5,19 ± 0,89
MCF 7	24 h	7,20 ± 1,44	> 30	> 30	> 30	5,96 ± 0,57
	48 h	6,09 ± 1,41	6,85 ± 1,80	7,53 ± 0,44	> 30	5,74 ± 1,00
	96h	5,49 ± 0,26	5,47 ± 0,85	7,40 ± 0,44	28,53 ± 1,52	5,22 ± 0,09
MCF 12 A	24 h	7,33 ± 0,90	9,91 ± 2,50	> 30	28,72 ± 6,46	6,41 ± 0,90
	48 h	6,00 ± 0,42	7,18 ± 0,50	22,5 ± 5,03	22,50 ± 2,49	5,22 ± 0,09
	96h	5,70 ± 0,40	6,02 ± 0,33	13,90 ± 5,59	17,80 ± 2,64	5,32 ± 0,19

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes. MDA-MB 231 : carcinome du sein, MCF 7 : adénocarcinome du sein, MCF 12A : cellules normales du sein.

D'après le tableau VI, les extraits de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica* sont plus actifs et à activité comparable sur les cellules cancéreuses MDA-MB 231 et MCF 7. Mais sur les cellules normales MCF 12A, l'extrait de *F. leprieuri* a un effet inhibiteur proche de ceux de *X. aethiopica* et *F. xanthoxyloides*, avec des IC50 faibles. La meilleure activité de

l'extrait de *L. guineensis* est obtenue sur les cellules MCF7 ($IC_{50} = 7,40 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$ à 96 h d'incubation). L'extrait de *M. myristica* a une activité très modérée sur les cellules cancéreuses, mais semble baisser en fonction du temps la viabilité des cellules normales.

III.1.3 Discussion partielle

Dans cette première partie du travail, l'activité antiproliférative des extraits d'intérêt a été déterminée grâce à diverses méthodes.

Les résultats obtenus du test de prolifération cellulaire après traitement par les extraits à la concentration $25 \mu\text{g/ml}$ montrent une activité importante de *X. aethiopica* sur toutes les lignées, activité nettement plus significative sur les cellules Capan 2PC et U937. Cependant cet extrait s'est révélé d'efficacité modérée sur les cellules leucémiques KG1a, confirmant la résistance de ces cellules aux molécules cytotoxiques (Wu *et al.*, 1998). Cette résistance s'expliquerait par une défection de la voie de signalisation conduisant à la mort cellulaire par apoptose impliquant des protéines inhibitrices (Laurent et Jaffrezou, 2001).

La détermination de la relation concentration – effet a été effectuée par les tests de clonogénie sur plastique et de viabilité cellulaire. Le test de clonogénie sur plastique est un test sensible de l'activité cytotoxique et les résultats obtenus indiquent une activité cytotoxique fonction de la concentration pour presque tous les extraits. L'extrait de *X. aethiopica* s'est révélé être la plus active avec quelques colonies de cellules HCT116 seulement observées à la plus petite dose utilisée. Ce résultat démontre et confirme en se référant au test de croissance, les potentialités anticancéreuses de *X. aethiopica* (Moghe *et al.*, 2011 ; Baeshen *et al.*, 2012). La viabilité cellulaire, quant à elle, a été évaluée d'une part par le test au WST-1 sur les cellules HCT116, U937, KG1a (Melchini *et al.*, 2009). Sur les cellules HCT116, une activité significative à la concentration $25 \mu\text{g/ml}$ est observée pour tous les extraits à l'exception de *F. xanthoxyloides*, ceci concordant avec les résultats du test de prolifération cellulaire. Sur les cellules KG1a, la résistance au potentiel cytotoxique des extraits est à nouveau observée, corroborant ainsi les résultats obtenus avec le test de prolifération cellulaire (Haag *et al.*, 2009 ; Rao *et al.*, 2011).

La viabilité cellulaire a également été déterminée par le test à la sulforhodamine B (Papazisis *et al.*, 1997) sur les cellules cancéreuses du sein MDA-MB 231 (récepteur d'œstrogène négatif), MCF7 (récepteur d'œstrogène positif) et les cellules normales de sein MCF 12A. Les résultats obtenus après analyse sur ces cellules cancéreuses montrent une

activité antiproliférative variant en fonction de la concentration et du temps, des extraits de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica*.

L'effet cytotoxique de l'extrait de *L. guineensis* observé sur les cellules U937, HCT116, MDA-MB 237 et MCF 7 est en accord avec les travaux de Pieme *et al.* (2008b) qui ont montré les propriétés antiprolifératives de cet extrait sur des tumeurs induites sur des disques de pomme de terre et des tumeurs induites *in vivo* chez les souris (Pieme *et al.*, 2008b). Par ailleurs, les propriétés antiprolifératives de l'extrait de *F. xanthoxyloides* sur des cellules cancéreuses (U937, MDA-MB 237 et MCF 7) démontrées dans ce travail sont une première pour cette plante dont les propriétés antiprolifératives sur *plasmodium falciparum in vitro* et antidrépanocytoses ont été décrites respectivement par Kassim *et al.* (2005) et Pousset (2002). L'activité cytotoxique de l'extrait *M. myristica* observée uniquement sur les cellules MCF7 montre que cet extrait aurait une certaine spécificité d'action sur les cellules cancéreuses, probablement due à la présence des récepteurs d'œstrogènes au sein de ces cellules (Alongkornsopit *et al.*, 2011).

Mis ensemble, les tests de viabilité cellulaire effectués révèlent que les cellules du sein (MDA-MB 237, MCF7 et MCF 12A) sont des lignées très sensibles aux extraits étudiés notamment aux extraits de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica* (Shirazi *et al.*, 2004; Moghe *et al.*, 2011). Cette grande sensibilité se traduit par les valeurs très faibles d'IC50 comparées à celles obtenues sur les cellules HCT116 notamment pour *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica*. Ces observations, en termes d'activité antiproliférative, corroborent ceux obtenus par Kuété *et al.* (2011) ainsi qu' Adaramoye *et al.* (2011) qui ont décrit l'activité antiproliférative de *X. aethiopica* sur des cellules de cancer de pancréas MiaPaCa-2, les cellules leucémiques CCRF-CEM et ainsi que les cellules de cancer cervical C-33A respectivement. Aussi l'activité antiproliférative de *F. leprieuri* a été décrite précédemment sur les cellules de cancer de pancréas MiaPaCa-2 et les cellules leucémiques CCRF-CEM par Kuété *et al.* (2011). Sur les cellules normales MCF 12A, l'extrait de *F. leprieuri* a une activité antiproliférative plus importante que celle de *X. aethiopica*. Ceci traduit une action non spécifique plus importante de l'extrait de *F. leprieuri* (Chen *et al.*, 2012). Notons qu'une non-spécificité d'action sur les cellules est aussi observée lors du traitement des cancers par radiothérapie (Chang *et al.*, 2008).

A l'issu de cette première partie du travail, seuls les extraits présentant les meilleures activités antiprolifératives ont été retenus pour la suite de l'étude qui consiste en l'étude du

mode d'action antiprolifératif observé ; il s'agit de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica*.

III.2 EVALUATION DU MODE D'ACTION ANTIPROLIFERATIF DES EXTRAITS

La plupart des extraits de plante exercent leur activité antiproliférative par induction de l'apoptose (Chinkwo, 2005 ; Lee *et al.*, 2009 ; Alshatwi *et al.*, 2011). Afin d'évaluer le mode d'action antiprolifératif des extraits de *F. xanthoxyloides*, *F. leprieuri* et *X. aethiopica*, différents paramètres caractéristiques de l'induction de l'apoptose ont été mesurés : l'activation de la caspase 3, la condensation de l'ADN et les effets sur les fonctions de la mitochondrie.

III.2.1 Effet des extraits sur l'activité de la caspase 3

L'activité de la caspase 3 pour les différents échantillons a été mesurée après traitement des cellules MDA-MB 231 et les résultats sont présentés par la figure 8 (A, B et C).

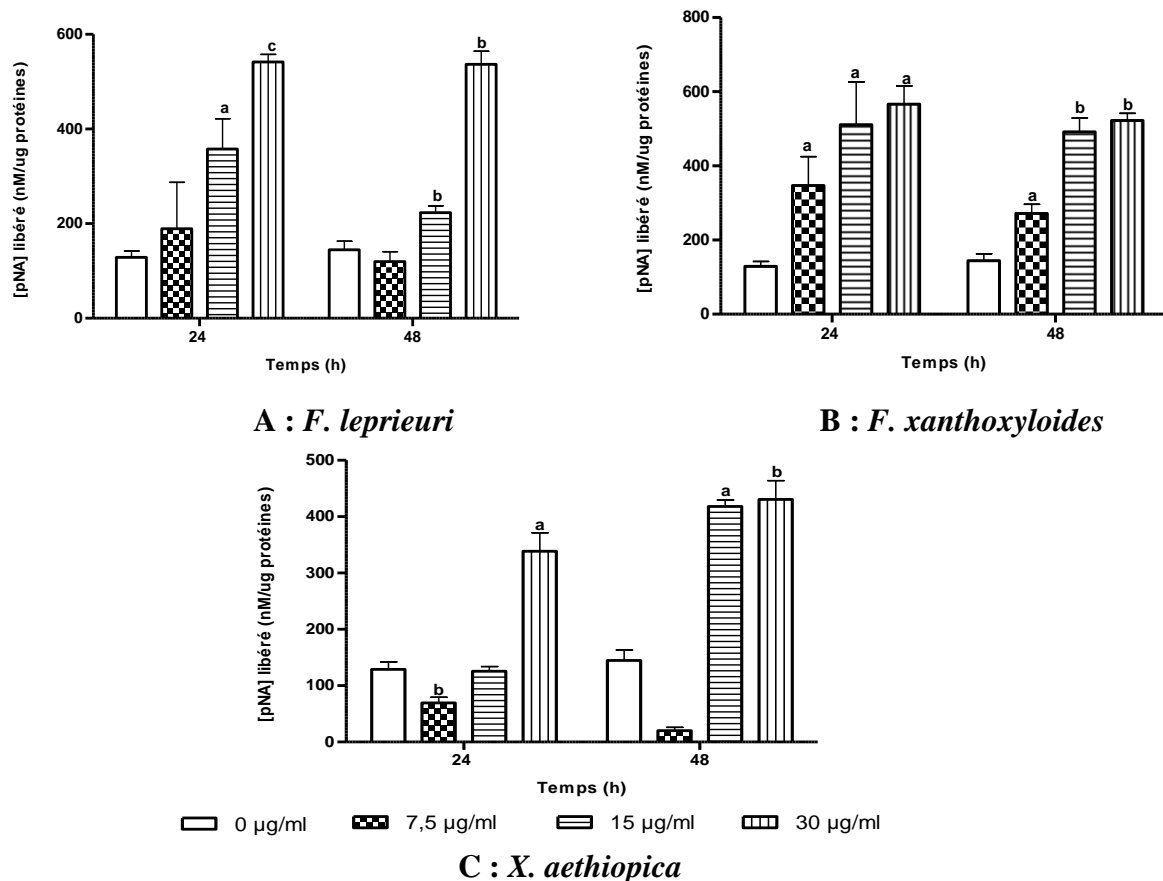


Figure 8: Effet de *F. leprieuri* (A), *F. xanthoxyloides* (B), *X. aethiopica* (C) sur l'activité de la caspase 3 des cellules MDA-MB 231.

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes ; ^(a) $p < 0,05$; ^(b) $p < 0,005$; ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

Après 24 h de traitement, les extraits de *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* se révèlent être les plus actifs tandis qu'après 48 h de traitement ce sont les extraits de *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica* qui sont les plus actifs. Pour tous les extraits, la dose la plus élevée est la plus active quelque soit le temps de traitement

III.2.2 Condensation de l'ADN

La détection de la condensation de l'ADN (marqueur de mort cellulaire par apoptose) a été effectuée par marquage au Hoechst 33342 fluorescent et les exemples de lamelles marquées sont illustrés par la figure 9 ci-dessous.

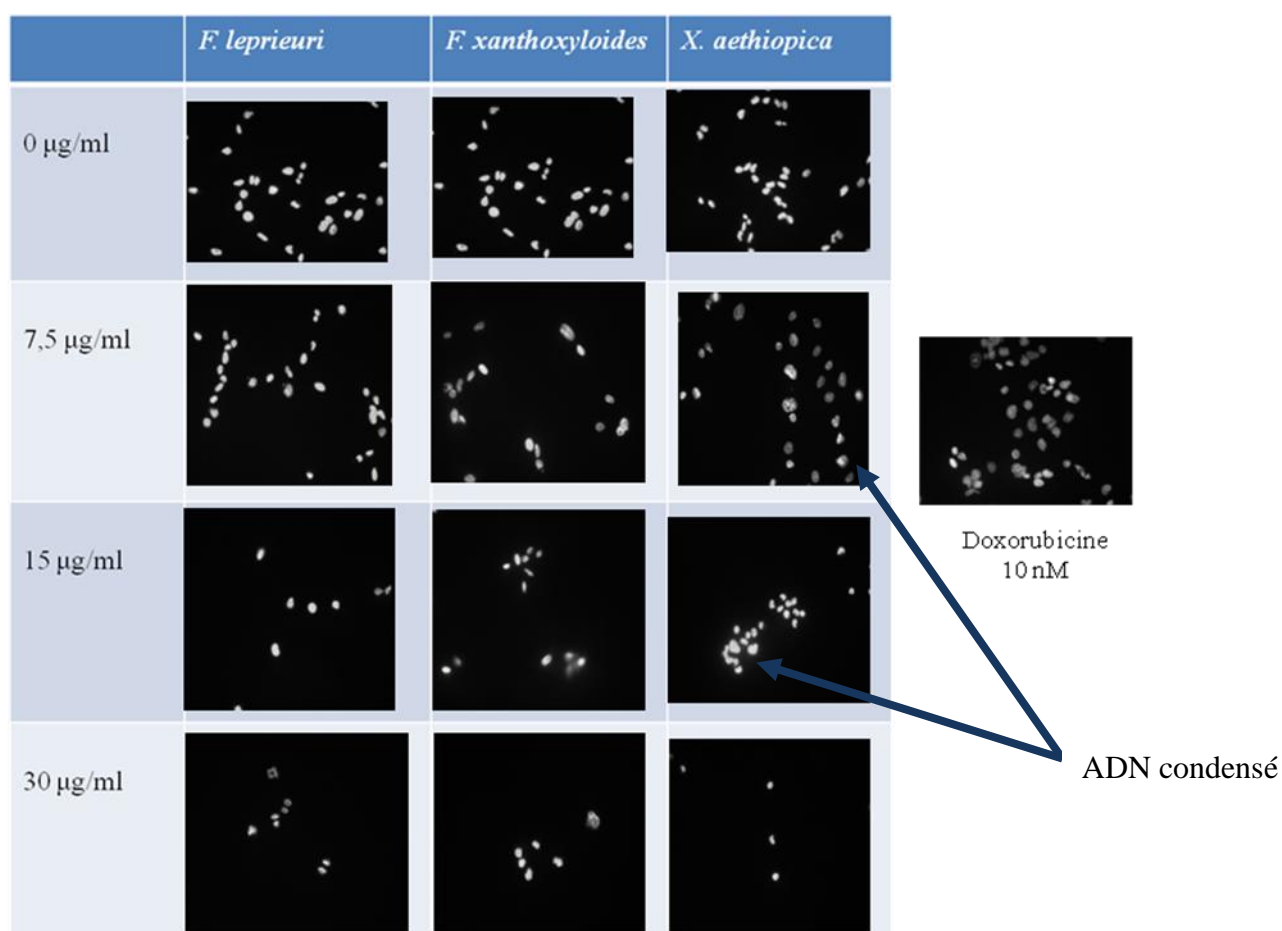


Figure 9: Effet des extraits sur la condensation de l'ADN des cellules MDA-MB 231.

Il ressort de cette figure 9 qu'à différentes concentrations, des ADN condensés sont présents. Comparé aux autres extraits, *X. aethiopica* montre un effet plus important sur la condensation de l'ADN qui est très distinctif à partir de la dose 15 µg/ml.

III.2.3 Effet des extraits sur les paramètres mitochondriaux

Pour davantage caractériser l'activité antiproliférative observée avec les échantillons d'intérêt, leurs effets sur les fonctions clés de la mitochondrie ont été déterminés. La mitochondrie de part son rôle dans la production d'énergie cellulaire et la présence des réactions redox constitue l'un des sièges de la cytotoxicité cellulaire. Les effets des différents extraits ont ainsi été déterminés sur le potentiel membranaire et sur la respiration mitochondriale.

III.2.3.1 Effet des extraits sur le potentiel mitochondrial transmembranaire

Plusieurs mesures du potentiel membranaire ont été effectuées après traitement des mitochondries par différentes concentrations d'extraits. Les résultats obtenus sont représentés par le tableau VII.

Tableau VII : Effet des extraits sur la membrane mitochondriale.

$\Delta\Phi$ (mV) en % du contrôle					
	Effet des extraits sur le potentiel membranaire mitochondrial				
	0 $\mu\text{g/ml}$	1,5 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
<i>X. aethiopica</i>	100 \pm 0	96,02 \pm 0,64 ^a	96,06 \pm 0,52 ^a	94,74 \pm 1,08 ^a	92,83 \pm 1,10 ^a
<i>F. lepriouri</i>	100 \pm 0	90,81 \pm 0,46 ^b	88,95 \pm 1,35 ^b	85,52 \pm 0,70 ^b	83,30 \pm 0,82 ^b
<i>F. xanthoxyloides</i>	100 \pm 0	95,79 \pm 1,55 ^a	94,79 \pm 1,49 ^a	93,05 \pm 1,35 ^a	92,64 \pm 1,18 ^a
Dépolarisation de la membranaire par le calcium					
	0 $\mu\text{g/ml}$	1,5 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
<i>X. aethiopica</i>	100 \pm 0	102,52 \pm 9,86	97,50 \pm 1,52	95,64 \pm 0,42 ^b	93,32 \pm 1,15 ^a
<i>F. lepriouri</i>	100 \pm 0	89,20 \pm 2,39 ^a	87,48 \pm 2,07 ^a	84,45 \pm 6,43	82,37 \pm 4,62 ^a
<i>F. xanthoxyloides</i>	100 \pm 0	92,35 \pm 3,09	93,58 \pm 1,99 ^a	91,49 \pm 1,13 ^a	91,60 \pm 2,11 ^a
Repolarisation de la membranaire mitochondriale					
	0 $\mu\text{g/ml}$	1,5 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
<i>X. aethiopica</i>	100 \pm 0	94,72 \pm 0,73 ^a	94,38 \pm 1,25 ^a	92,79 \pm 1,40 ^a	90,46 \pm 1,20 ^a
<i>F. lepriouri</i>	100 \pm 0	82,57 \pm 6,36 ^a	-	-	-
<i>F. xanthoxyloides</i>	100 \pm 0	92,96 \pm 2,38 ^a	92,43 \pm 0,98 ^a	89,63 \pm 1,42 ^a	89,09 \pm 0,45 ^b

(-) Valeurs inférieures au seuil de sensibilité de l'équipement utilisé qui est 80% du contrôle.

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes. ^(a) $p < 0,05$; ^(b) $p < 0,005$; ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

Le potentiel membranaire montre après ajout de chaque extrait une baisse significative ; l'effet étant plus important avec l'extrait de *F. lepriouri* (tableau VII). Une baisse significative du potentiel membranaire mitochondrial est également observée après dépolarisation par ajout du calcium notamment avec les extraits de *F. lepriouri* et *F.*

xanthoxyloides. Le tableau indique également qu'au moment de la repolarisation, aucun potentiel membranaire n'est enregistré chez les mitochondries traitées par *F. leprieuri*, exception faite de celles traitées à la concentration 1,5 µg/ml où l'on observe une baisse significative du potentiel comparé au contrôle. Les deux autres extraits (*F. xanthoxyloides*, *X. aethiopica*) induisent également une baisse du potentiel bien que celle-ci soit de moindre amplitude que celle observée avec *F. leprieuri*.

III.2.3.2 Effet sur la respiration / consommation d'oxygène

L'effet sur la respiration mitochondriale a été évalué par la mesure en pourcent du contrôle de la consommation d'oxygène. La figure 10 représente la consommation d'oxygène à chaque état de la respiration mitochondriale ainsi que le rapport de contrôle respiratoire (état 3/état 4) et le rapport ADP/O à l'état 2.

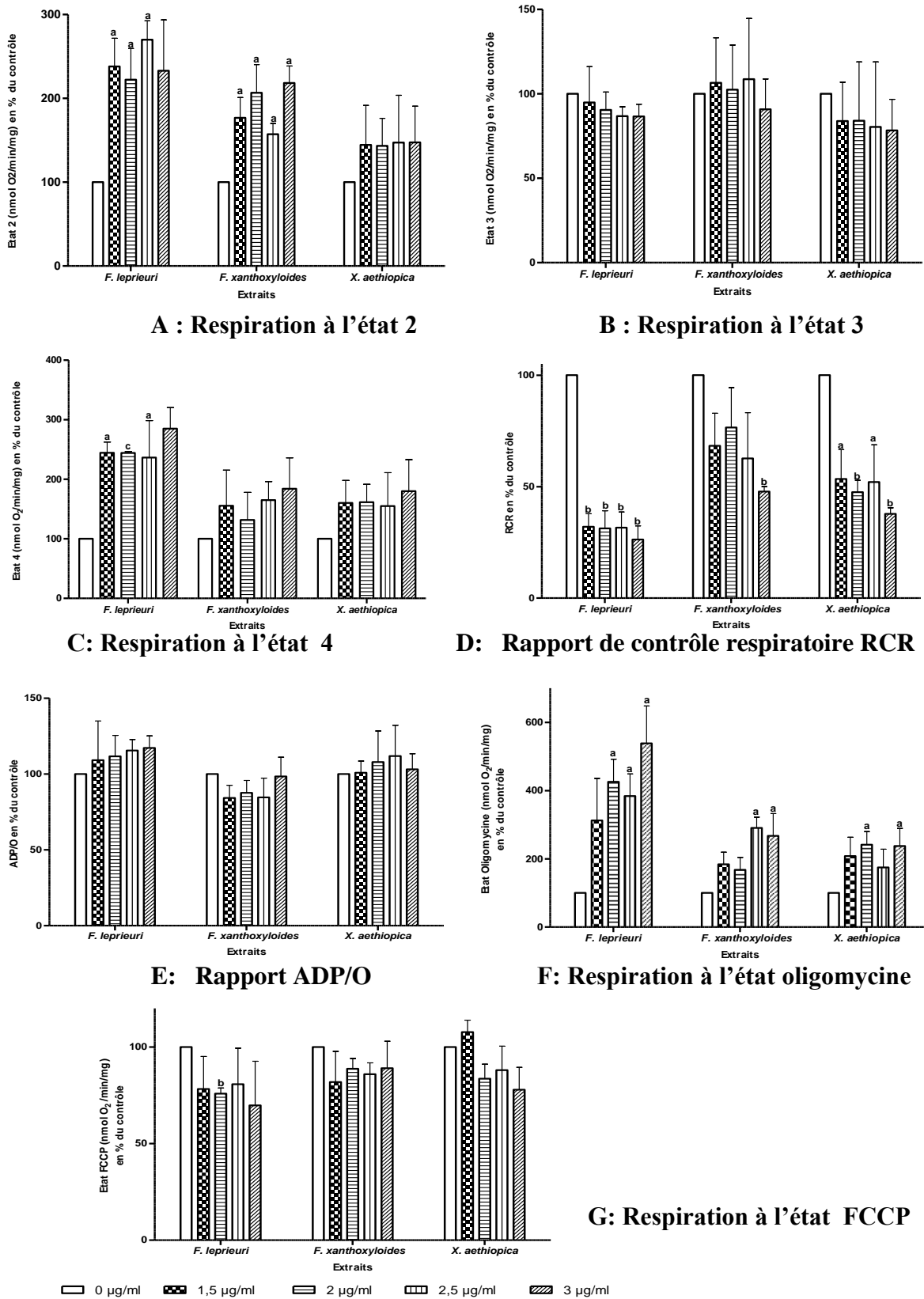


Figure 10 : Effet des extraits sur la respiration mitochondriale.

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes. ^(a) $p < 0,05$; ^(b) $p < 0,005$; ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student)

D'après les figures 10 (A et C), les extraits induisent en général la consommation d'oxygène à l'état 2 et 4 traduisant une consommation d'oxygène non-couplée à la synthèse d'ATP. Dans le même sens, le rapport de contrôle respiratoire (RCR) qui caractérise le rapport de consommation de l'oxygène entre l'état 3 et l'état 4, baisse de manière significative en présence des extraits (figure 10D). Cependant les extraits n'affectent pas l'état 3 ou état de phosphorylation oxydative (figure 10B) ; résultats corroborant ceux du rapport ADP/O qui indique la consommation d'oxygène comparée à l'ADP ajouté à l'état 3 (figure 10E). En présence de l'oligomycine (figure 10F), inhibiteur de l'ATP synthétase, l'effet inducteur des extraits sur la consommation de l'oxygène persiste, indiquant une fois de plus une activation de l'oxydation non phosphorylante par les extraits. Toutefois en présence de la FCCP (Carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone) (figure 10G), aucun effet important des extraits sur la consommation d'oxygène n'est observé. Le FCCP est un agent découplant extrinsèque de la phosphorylation oxydative qui dégrade le gradient de protons, augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons et aux cations.

III.2.4 Discussion partielle

Cette partie de notre travail avait pour but l'identification des mécanismes possibles d'activité des extraits les plus actifs du point de vue de leur propriété antiproliférative. Dans cette optique, l'activité de la caspase 3 et la condensation de l'ADN, indicateur de la mort cellulaire par apoptose ont été évaluées sur les cellules MDA-MB 231. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'activité de la caspase 3 en fonction de la concentration et du temps pour *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* après 24 h de traitement des cellules MDA-MB 231. L'extrait de *X. aethiopica* quant lui présente une activité de la caspase 3 significative aux concentrations élevées. L'ADN condensé, signe de la mort cellulaire par apoptose (Sardao *et al.*, 2009), est observé pour tous les extraits utilisés. Ces résultats permettent de conclure que les extraits de *X. aethiopica*, *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* entraînent la mort cellulaire par apoptose caractérisée par la condensation de l'ADN et l'activation de la caspase 3 (Chakraborty *et al.*, 2006; Karamitopoulou *et al.*, 2007). En effet, les caspases 2 et 9 sont les premières à être activées une fois le processus de mort cellulaire par apoptose enclenché. Elles sont activées par le cytochrome C libéré de la mitochondrie et vont à leur tour activer la caspase 3 dont l'activité est en partie responsable de la condensation et de la fragmentation de l'ADN (Bakar *et al.*, 2010). Toutefois pour que les modifications morphologiques nucléaires

aient lieu, la membrane nucléaire doit être perméabilisée. Ceci se fait par clivage de certaines protéines par les caspases. La condensation de l'ADN qui s'observe par la suite est due à la flavoprotéine mitochondriale AIF (*apoptosis inducing factor*) qui passe de la mitochondrie au noyau et à la protéine Acinus activée par clivage par la caspases 3 (Solary, 2006).

L'effet des extraits d'intérêt sur la fraction mitochondriale hépatique a été effectué selon un modèle reconnu (Pereira *et al.*, 2009) au moyen de la mesure du potentiel membranaire et la consommation d'oxygène. La mesure du potentiel membranaire des mitochondries après ajout des extraits à différentes concentrations montre une baisse significative pour tous les extraits, *F. leprieuri* présentant la baisse du potentiel la plus importante. La dépolarisation par ajout de calcium de la membrane tout comme la repolarisation de la membrane se révèle également très significative en présence de l'extrait de *F. leprieuri*. La baisse du potentiel membranaire caractérise l'ouverture des pores de transition membranaire de la mitochondrie et l'activation de la mort cellulaire par apoptose (Pereira *et al.*, 2007 ; Choi *et al.*, 2011). En effet, une fois les pores de transition membranaire de la mitochondrie ouverts, des molécules et de l'eau rentrent dans la mitochondrie de manière non sélective. Il en résulte d'une part un gonflement de la matrice mitochondriale et d'autre part une baisse du potentiel membranaire. Le gonflement de la matrice mitochondriale entraîne l'expulsion des molécules pro-apoptotiques (cytochrome C, Smac, AIF contenus dans l'espace inter-membranaire) activatrices des différents systèmes de mort cellulaire par apoptose (Wong et Puthalakath, 2008; Wang *et al.*, 2011). De façon générale ces résultats indiquent une perturbation significative du potentiel membranaire qui participe à l'entrée de la cellule en apoptose via l'ouverture des pores de transition mitochondriaux. D'autre part la perte progressive du potentiel membranaire est souvent accompagnée d'une augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène. Ceux-ci vont très vite saturer les systèmes antioxydants, affaiblir et endommager la mitochondrie en arrêtant la phosphorylation oxydative et entrainer une ouverture importante des pores de transition mitochondriaux (Kroemer *et al.*, 2007).

La consommation mitochondriale d'oxygène aux différents états (2, 3 et 4) et en présence d'agent d'oligomycine ou de FCCP montre un effet significatif stimulateur des extraits sur les états 2 et 4, ainsi qu'à l'état oligomycine. Le résultat de l'état 2 traduit une stimulation de la consommation d'oxygène non-couplée à la synthèse d'ATP. Cependant les extraits semblent n'avoir pas affecté la consommation d'oxygène couplée à la

phosphorylation oxydative à l'état 3, corroborant ainsi le rapport ADP/O qui ne varie pas significativement en présence des extraits. Ce résultat indique un effet limité des extraits en présence d'une quantité importante d'ADP cellulaire. Mais à l'état 4, correspondant à la consommation d'oxygène après épuisement d'ADP, les extraits présentent en général un effet stimulant sur l'augmentation de la consommation d'oxygène quoi que cet effet ne soit significatif que pour l'extrait de *F. lepriuri* soulignant ainsi l'activation de la respiration non oxydative. Ce résultat reflète la baisse du rapport de contrôle respiratoire (RCR) qui, avec le rapport ADP/O et la consommation d'oxygène aux états 2, 3 et 4, confirment l'ouverture de pores de transition membranaire mitochondriaux (Morin *et al.*, 2001 ; Moreno *et al.*, 2007). En résumé, l'absence ou l'effet modéré des extraits sur la respiration couplée à la synthèse d'ATP montre qu'il n'y a pas d'inhibition de la chaîne respiratoire, indiquant que l'efficacité de la phosphorylation oxydative n'est pas affectée. Aussi l'absence d'effet des extraits sur l'état 3 de la chaîne respiratoire avec pourtant augmentation de la consommation d'oxygène à l'état 4 confirme leur action sur la respiration non couplée à la synthèse d'ATP. D'autre part l'importance de la consommation d'oxygène en présence d'oligomycine, agent inhibiteur de l'ATP synthétase, traduit un effet des extraits sur la membrane mitochondriale principalement par augmentation de l'influx de protons et donc de la respiration (Moreno *et al.*, 2007 ; Silva et Oliveira, 2012). Cette hypothèse est par ailleurs soutenue par la baisse significative du potentiel membranaire normal observé plus haut. Ainsi, la participation de la mitochondrie à la mort cellulaire observée se caractérise par la perturbation du potentiel membranaire (résultant de l'ouverture des pores de transition membranaire), et l'augmentation du flux de proton vers la matrice mitochondriale et l'augmentation de la respiration (Tait et Green, 2012).

III.3 TENEUR EN ANTIOXYDANTS ET PROPRIETES ANTIOXYDANTES

Les plantes aux propriétés cytotoxiques sont souvent décrites comme riches en antioxydants. Ceci nous a amené à étudier dans cette 3^{ème} partie du travail les propriétés antioxydantes des différentes plantes. A cet effet, les méthodes spectrophotométriques ont été utilisées pour la quantification des phénols (principaux responsables de l'activité antioxydante des extraits de plantes), des anthocyanines (polyphénols de la classe des flavonoïdes et antioxydants d'origine alimentaire) dans les extraits MeOH 1% HCl, EtOH 70% et H₂O. L'acide phytique (décrit comme antioxydant et antiprolifératif *in vitro*) et la L-DOPA (décrite comme antioxydant) ont également été quantifiés par spectrophotométrie. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a par la suite été utilisée pour la quantification des tocophérols, des carotènes et des phénols. Enfin, l'activité antioxydante des extraits phénols (MeOH 1% HCl), acide phytique et la L-DOPA a été évaluée par le test d'activité antiradicalaire sur le radical DPPH° et le test de réduction des ions ferriques.

III.3.1 Teneur en antioxydant

III.3.1.1 Antioxydants quantifiés par spectrophotométrie

Le tableau VIII représente les teneurs des extraits en phénols totaux, anthocyanines, acide phytique et L-DOPA.

Tableau VIII: Phénols totaux dans les plantes

Phénols (mg équivalent catéchine /g of poudre)			
	<i>F. lepriouri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>X. aethiopica</i>
Méthanol 1%HCl	23,85 ± 0,5	18,22 ± 0,90	68,62 ± 0,17
70% Ethanol	18,79 ± 0,24	6,41 ± 0,09	34,09 ± 2,92
Eau	9,13 ± 0,12	7,79 ± 0,22	34,68 ± 1,59
Anthocyanines (µg équivalent cyanidin-3-glucoside /g de poudre)			
	<i>F. lepriouri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>X. aethiopica</i>
Méthanol 1%HCl	922,35 ± 169,09	558,18 ± 33,17	1278,42 ± 71,79
70% Ethanol	369,90 ± 30,39	326,80 ± 18,30	461,87 ± 63,32
Eau	22,99 ± 0,80	35,74 ± 0,65	3,10 ± 1,72
Teneur en acide phytique et L-DOPA (mg/g de poudre)			
	<i>F. lepriouri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>X. aethiopica</i>
Acid phytique	6,56 ± 0,85	5,48 ± 0,25	13,60 ± 0,49
L-DOPA	51,56 ± 0,58	26,76 ± 0,61	40,42 ± 0,22

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes

Les extraits MeOH 1% HCl sont les plus riches en phénols ; toutefois les extraits aqueux (ceux couramment utilisés dans l'alimentation) en contiennent des quantités appréciables. Comparé aux autres plantes, *X. aethiopica* est la plus riche en phénols. Le MeOH 1% HCl se révèle également être le meilleur solvant d'extraction des anthocyanines pour tous les échantillons. L'extrait MeOH 1% HCl de *X. aethiopica* possède la teneur en anthocyanines la plus importante. D'autre part, tous les extraits étudiés ont une teneur significative en acide phytique et en L-DOPA. *F. leprieuri* a la teneur la plus importante en L-DOPA ($51,56 \pm 0,58$ mg/g de poudre), tandis que *X. aethiopica* est l'extrait le plus riche en acide phytique ($13,60 \pm 0,49$ mg/g de poudre).

III.3.1.2 Antioxydants quantifiés par chromatographie liquide haute performance

a) Tocophérols, vitamine C et caroténoïdes

Le tableau IX représente les teneurs en antioxydants à l'issue des analyses des extraits par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Tableau IX: Teneur en tocophérols, caroténoïdes et vitamine C.

	Tocophérols, carotènes et vitamine C (ng/mg de poudre)		
	<i>F. leprieuri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>X. aethiopica</i>
γ - Tocophérol	$0,69 \pm 0,05$	$7,37 \pm 0,34$	$7,05 \pm 0,16$
α - Tocophérol	$0,30 \pm 0,04$	$7,80 \pm 0,37$	$2,86 \pm 0,07$
α - Carotène	$0,05 \pm 0,00$	$0,16 \pm 0,01$	$2,74 \pm 0,13$
β - Carotène	-	$0,01 \pm 0,01$	$2,85 \pm 0,22$
Lutéine	-	-	$20,18 \pm 0,70$
Vitamine C	-	-	-

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes.

Tous les extraits sont riches en antioxydants mais avec des teneurs variées. Les extraits de *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica* renferment des teneurs importantes des 2 formes de tocophérols (α et γ -tocophérol). Cependant *X. aethiopica* est la seule plante ayant une teneur importante en toutes les formes d'antioxydants évalués notamment en lutéine. Enfin, l'analyse des différents chromatogrammes (présentés en annexe) montre que la vitamine C n'est présente dans aucun des échantillons, bien que les chromatogrammes révèlent la présence d'autres molécules identifiées par le détecteur (cellule électrochimique).

b) Phénols

Le tableau X représente la teneur en phénols à la suite de l'analyse des extraits par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Tableau X: Phénols identifiés par HPLC

	Phénols (ng/ml)		
	<i>F. leprieuri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>X. aethiopica</i>
Rutin	-	-	90,87 ± 0,77
Resvératrol	180,49 ± 5,57	51,08 ± 5,58	59,54 ± 7,22
Flavone	112,63 ± 4,43	-	-

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes.

Excepté *F. xanthoxyloides*, les autres extraits renferment deux formes de phénols qui ont pu être identifiées (tableau X). L'extrait de *F. leprieuri* montre cependant une teneur importante en resvératrol et flavone, tandis que celui de *X. aethiopica* a une teneur importante de rutin et resvératrol.

III.3.2 Activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée d'une part par la mesure de leur capacité à réduire les radicaux libres (à l'origine du stress oxydant pouvant se produire dans l'organisme) et d'autre part par leur capacité à réduire les entités oxydantes.

III.3.2.1 Activité anti-radicalaire sur le radical DPPH°

Le tableau XI représente l'activité anti-radicalaire des différents extraits sur le radical DPPH°.

Tableau XI: Activité antiradicalaire des extraits sur DPPH°

Activité anti-radicalaire des extraits sur le radical DPPH° (% DPPH inhibition)			
	Acide phytique	L-DOPA	Phénols (MeOH 1% HCl)
<i>Fagara leprieuri</i>	35,42 ± 0,92	43,46 ± 1,86	42,49 ± 6,73
<i>Fagara xanthoxyloides</i>	50,19 ± 0,82	54,65 ± 4,09	85,8 ± 2,89
<i>Xylopi aethiopica</i>	72,94 ± 1,79	90,93 ± 1,47	90,04 ± 1,07
BHT (1mg/ml)	96,65 ± 0,06		

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes.

Les extraits phénols et L-DOPA (10 mg/ml chacun) de *X. aethiopica* réduisent le radical DPPH° de manière importante comparé aux standards BHT et vitamine C. L'extrait MeOH 1% HCl de *F. xanthoxyloides* se distingue également par son activité antiradicalaire importante (tableau XI).

III.3.2.2 Analyse de la réduction des ions ferriques (FeSO₄)

Le tableau XII représente le pouvoir réducteur des différents extraits sur les ions ferriques.

Tableau XII: Pouvoir réducteur des extraits sur les ions ferriques.

	mM FeSO ₄ /g de matière sèche		
	<i>F. leprieuri</i>	<i>F. xanthoxyloides</i>	<i>X. aethiopica</i>
Extraits L-DOPA	143,77 ± 5,50	213,15 ± 25,60	382,11 ± 20,00
Extraits acide phytique	113,49 ± 6,88	204,14 ± 11,11	308,48 ± 19,06
Extraits phénols	252,74 ± 32,04	364,72 ± 10,44	375,67 ± 0,23
BHT 1mg/ml	1877,86 ± 112,64		

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes.

Les extraits réduisent sensiblement les ions ferriques bien que cela soit de façon moins importante que les standards (tableau XII). Des différents extraits de plantes, ceux de *X. aethiopica* présentent le pouvoir réducteur le plus élevé.

III.3.3 Discussion partielle

Après l'analyse de l'activité antiproliférative des différents extraits, leurs propriétés antioxydantes ont été évaluées. Les résultats obtenus révèlent que tous les extraits sont riches en antioxydants à des teneurs variées. *X. aethiopica* est la seule plante ayant une richesse significative en toutes les formes d'antioxydants évaluées à l'exception de la vitamine C. Cette plante renferme également de quantités importantes de phénols comme précédemment décrit par George et Osioma (2011) parmi lesquels le rutin et le resvératrol. Ce dernier (le resvératrol) est une molécule bien connue pour son utilisation en chimiothérapie préventive et curative des cancers. En effet le resvératrol agit dans la prévention des cancers par blocage d'une ou plusieurs étapes de la cancérogenèse, et dans les cellules cancéreuses, il induit la mort cellulaire par apoptose, ce par induction de l'activation de la protéine p53 (Dong, 2003). *F. leprieuri* est riche en flavonoïdes (resvératrol et flavone) et possède des teneurs significatives en antioxydants, résultat aussi décrit par Bouba *et al.* (2010). *F. xanthoxyloides*

quant à elle renferme de teneurs notables en tocophérols et dopamine. Mis ensemble, ces résultats corroborent ceux décrits dans la littérature qui présentent des teneurs importantes en phénols de *X. aethiopica*, de *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* (Ogbe *et al.*, 2009 ; Bouba *et al.*, 2010).

Tous les extraits réduisent de façon modérée les ions ferriques. Cependant les extraits MeOH 1% HCl de *X. aethiopica* et *F. xanthoxyloides* réduisent très significativement le radical DPPH° et de façon comparable au standard utilisé (BHT). En effet, des travaux effectués sur les plantes, fruits et épices couramment consommés ont révélé que leur activité antiradicalaire était principalement due aux composés phénoliques (polyphénols, anthocyanines phénoliques, flavonoïdes) (Barros *et al.*, 2007 ; Gerhauser, 2008 ; Spormann *et al.*, 2008). Cette activité antiradicalaire se caractérise par la stabilisation du radical DPPH° soit en lui cédant un hydrogène soit en le combinant à un autre radical libre (Brand-williams *et al.*, 1995 ; Rao *et al.*, 2010).

L'acide phytique est présent dans tous les échantillons, *X. aethiopica* ayant la teneur la plus importante. L'acide phytique est un composé bioactif, source de phosphore et décrit d'une part comme étant un antioxydant naturel, et d'autre part comme ayant des propriétés anti-cancéreuses pour les tissus souples (colon, sein, prostate) (Saad *et al.*, 2011 ; Vadivel et Biesalski, 2012).

Les résultats révèlent aussi des teneurs très importantes de la L-DOPA. La L-DOPA (L-3,4 dihydroxyphenylalanine) est un acide aminé non protéique et précurseur de la dopamine. Elle est couramment utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson. Par ailleurs elle présente également des propriétés préventives contre les ulcères et le stress oxydant (Gautam *et al.*, 2012).

Les résultats de cette partie de notre travail donnent une piste ou une explication de l'activité antiproliférative observée précédemment. En effet, de nombreuses molécules cytotoxiques sont décrites comme étant également douées d'activités antioxydantes (Bakar *et al.*, 2010). Cette activité antioxydante participe au traitement et à la prévention des cancers (Ulbricht et Chao, 2010).

Il ressort d'autre part de l'analyse des résultats jusqu'ici obtenus, que l'extrait de *X. aethiopica* a présenté non seulement une activité antiproliférative hautement significative, mais également des propriétés antioxydantes remarquables. La caractérisation de l'activité antiproliférative de cet extrait s'avère donc importante pour une meilleure exploitation de cette plante.

III.4 IDENTIFICATION DE LA MOLECULE ANTIPROLIFERATIVE DE *Xylopi* *aethiopica*

L'évaluation de l'activité antiproliférative des différents extraits a indiqué une activité importante de *X. aethiopica* sur les différentes lignées cellulaires étudiées. Aussi, *X. aethiopica* n'active la caspase 3 qu'à concentration élevée avec un effet modéré sur la chaîne respiratoire. L'analyse antioxydante a permis de montrer que cet extrait présentait des propriétés antioxydantes significatives. Cependant d'autres éléments du mécanisme d'action sur un modèle de cellule cancéreuse de même que la ou les molécules responsable(s) de l'activité antiproliférative reste(nt) à déterminer. Dans cette partie de l'étude nous avons tout d'abord recherché les effets de l'extrait de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et les dommages à l'ADN. Dans un deuxième temps, nous avons fractionné l'extrait et purifié la molécule capable de reproduire les effets de l'extrait. Enfin, nous avons déterminé la nature chimique de la molécule la plus active.

III.4.1 Effet de *X. aethiopica* sur la prolifération des fibroblastes normaux

La figure 11 ci-dessous représente l'effet de l'extrait de *X. aethiopica* à différentes concentrations sur la viabilité des fibroblastes normaux.

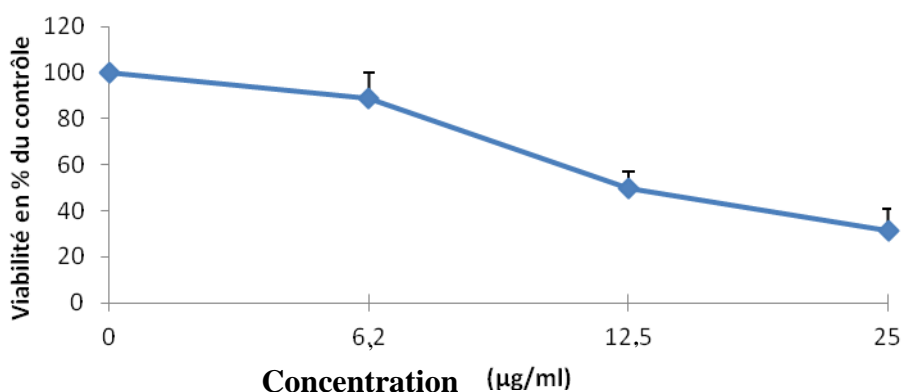


Figure 11: Viabilité des fibroblastes normaux en présence de l'extrait 70%EtOH de *X. aethiopica*

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes ; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

L'extrait de *X. aethiopica* réduit la viabilité des fibroblastes normaux, un effet toutefois comparable à celui observé avec la lignée de cellules cancéreuses HCT116. La concentration inhibitrice de la prolifération de 50% des cellules (fibroblastes normaux) par

cet extrait est de $12,37 \pm 1,54 \mu\text{g/ml}$ (figure 11) valeur proche de celle observée sur les cellules normales du sein MCF 12A.

III.4.2 Effet de l'extrait de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN

La figure 12 ci-dessous représente l'effet de l'extrait de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN. Un comarquage a été réalisé permettant d'apprécier en cytométrie de flux, sur les mêmes cellules, la phase du cycle cellulaire et l'intensité de la fragmentation de l'ADN. 10000 cellules U2OS ont été analysées par immunofluorescence après marquage à l'iodure de propidium (détermination du cycle cellulaire) et à l'anticorps anti-protéine gamma H2AX phosphorylée, marqueur de la fragmentation de l'ADN.

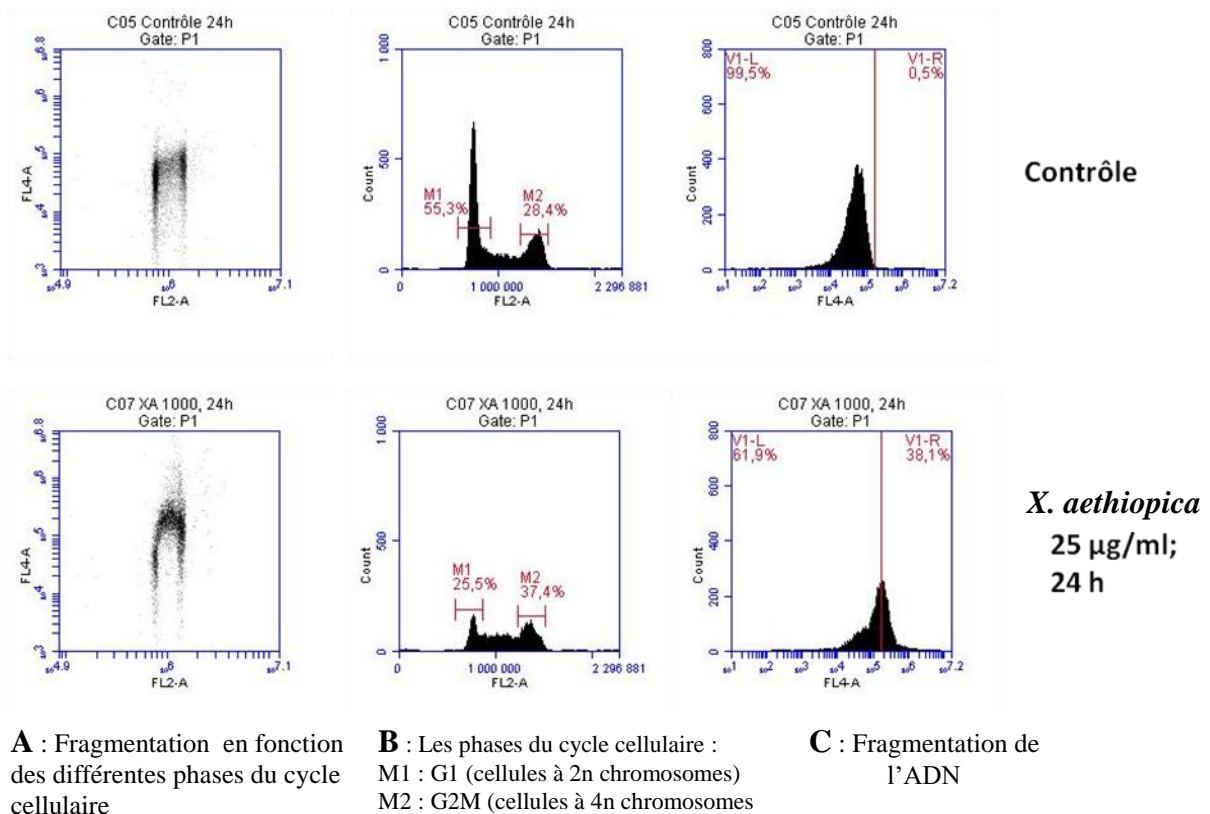


Figure 12: Effet de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN.

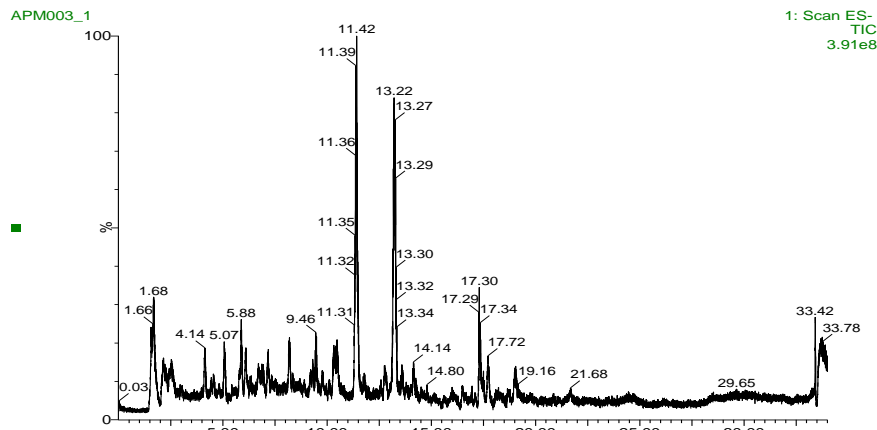
Figure 12A: En abscisse la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle et en ordonné les dommages à l'ADN. Figure 12B et 12C : en abscisse nombre de cellules. FL2-A ($585 \pm 20 \text{ nm}$) et FL4-A ($675 \pm 12,5 \text{ nm}$) sont les filtres utilisés en fonction des fluorochromes utilisés respectivement pour le cycle cellulaire et les dommages à l'ADN.

L'extrait de *X. aethiopica* à la concentration 25 µg/ml (figure 12C) entraîne une fragmentation de l'ADN chez 38,1 % de cellules comparé à seulement 0,5 % pour le contrôle (cellules non traitées). Dans le même sens cet extrait est responsable d'une accumulation significative des cellules en phase S (37,1 % contre 16,3% pour le contrôle), mais avec un effet modéré en phase G2M (37,4% contre 28,4% pour le contrôle) (figure 12B). Ces résultats indiquent également la présence de peu de cellules en phase G1 comparé au contrôle et une proportion élevée des dommages à l'ADN pour les cellules en phase S.

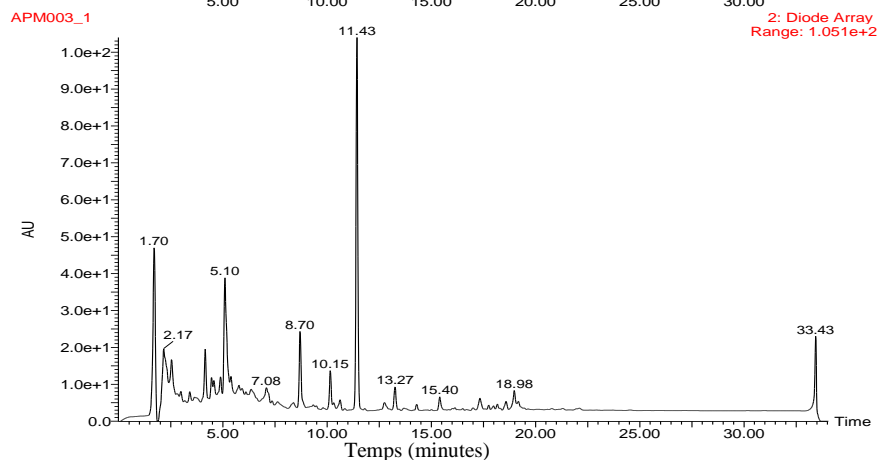
III.4.3 Analyse HPLC de l'extrait EtOH 70% de *X. aethiopica*

Au vue des effets de l'extrait total de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et l'ADN, cet extrait a été analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la composition révélée par deux détecteurs. Ainsi, la figure 13 (A et B) représente le courant ionique total (qui indique toutes les molécules qui ont pu être ionisées en mode négatif) et le chromatogramme UV. La figure 13C quant à elle indique le mode selon lequel les différentes fractions ont été isolées pour l'identification de la ou des molécules la/les plus active (s).

L'analyse par HPLC de l'extrait de *X. aethiopica* montre sur le spectre d'ionisation plusieurs molécules ionisées et identifiées par le détecteur (figure 13). Les molécules les plus importantes sont celles éluées à 11,42 et 13,22 minutes (figure 13A). Le spectre UV (210 – 400 nm) quant à lui révèle clairement un pic élué à 11,43 minutes comme étant le plus important de l'extrait en termes de proportion. Les pics ont par la suite été collectés comme indiqué par la figure 13C et le chromatogramme repris pour vérifier la pureté des fractions collectées.

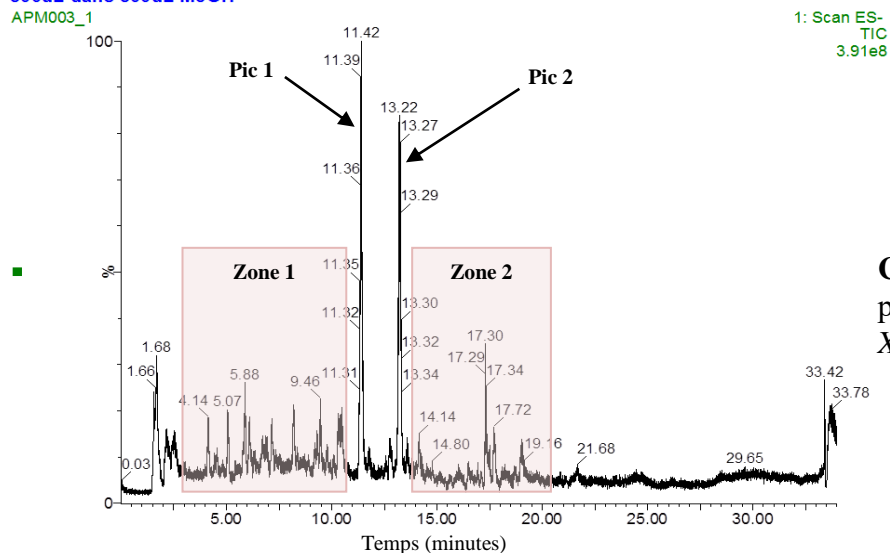


A: Chromatogramme d'ionisation (TIC Courant ionique total)



B: Chromatogramme UV de l'extrait de *X. aethiopica*

500uL dans 500uL MeOH



C: Chromatogramme des pics isolés de l'extrait de *X. aethiopica*

Figure 13: Chromatogramme d'ionisation (A), UV (B) de *X. aethiopica* et collection des différentes fractions (C).

III.4.4 Identification de la fraction la plus active de l'extrait de *X. aethiopica*

Les différentes fractions ont ensuite été analysées pour la mesure de leur activité antiproliférative. La figure 14 montre l'effet des différentes fractions de *X. aethiopica* à différentes concentrations sur la viabilité des cellules HCT 116 par le test au réactif WST-1.

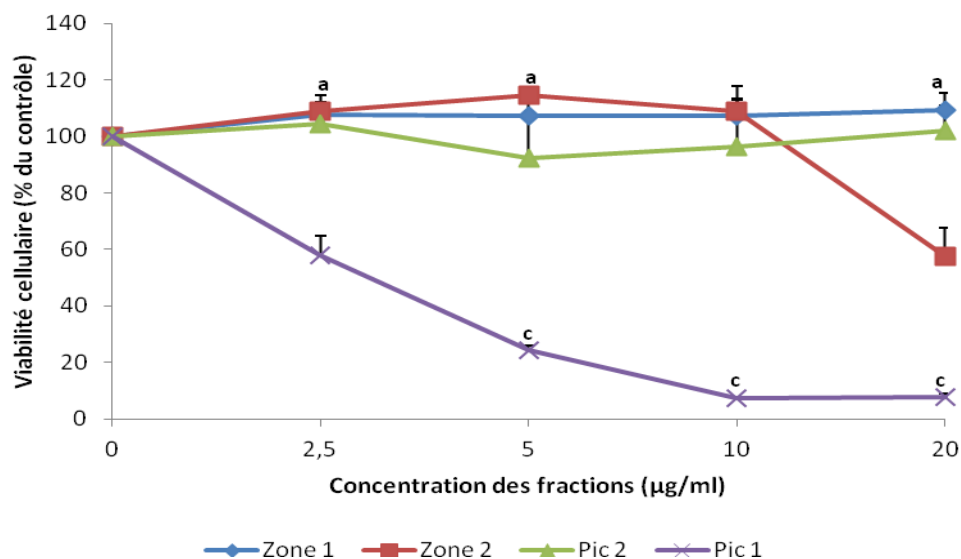


Figure 14: Effet des fractions de *X. aethiopica* sur la viabilité cellulaire de HCT 116.

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes. ^(a) $p < 0,05$; ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

Il ressort de façon évidente que le composé contenu dans le pic 1 est principalement responsable de l'activité antiproliférative observée avec l'extrait total de *X. aethiopica* avec une IC_{50} de $3,02 \pm 0,46$ $\mu\text{g/ml}$ par le test au WST-1 (figure 14). Toutefois les composés de la zone 2 à la dose 20 $\mu\text{g/ml}$ possèdent également une activité cytotoxique bien que celle-ci ne soit pas aussi importante que celle du pic 1.

L'effet des différentes fractions de *X. aethiopica* sur le cycle cellulaire et les dommages à l'ADN a été déterminé après 24h de traitement et les résultats sont représentés dans la figure 15 ci-dessous.

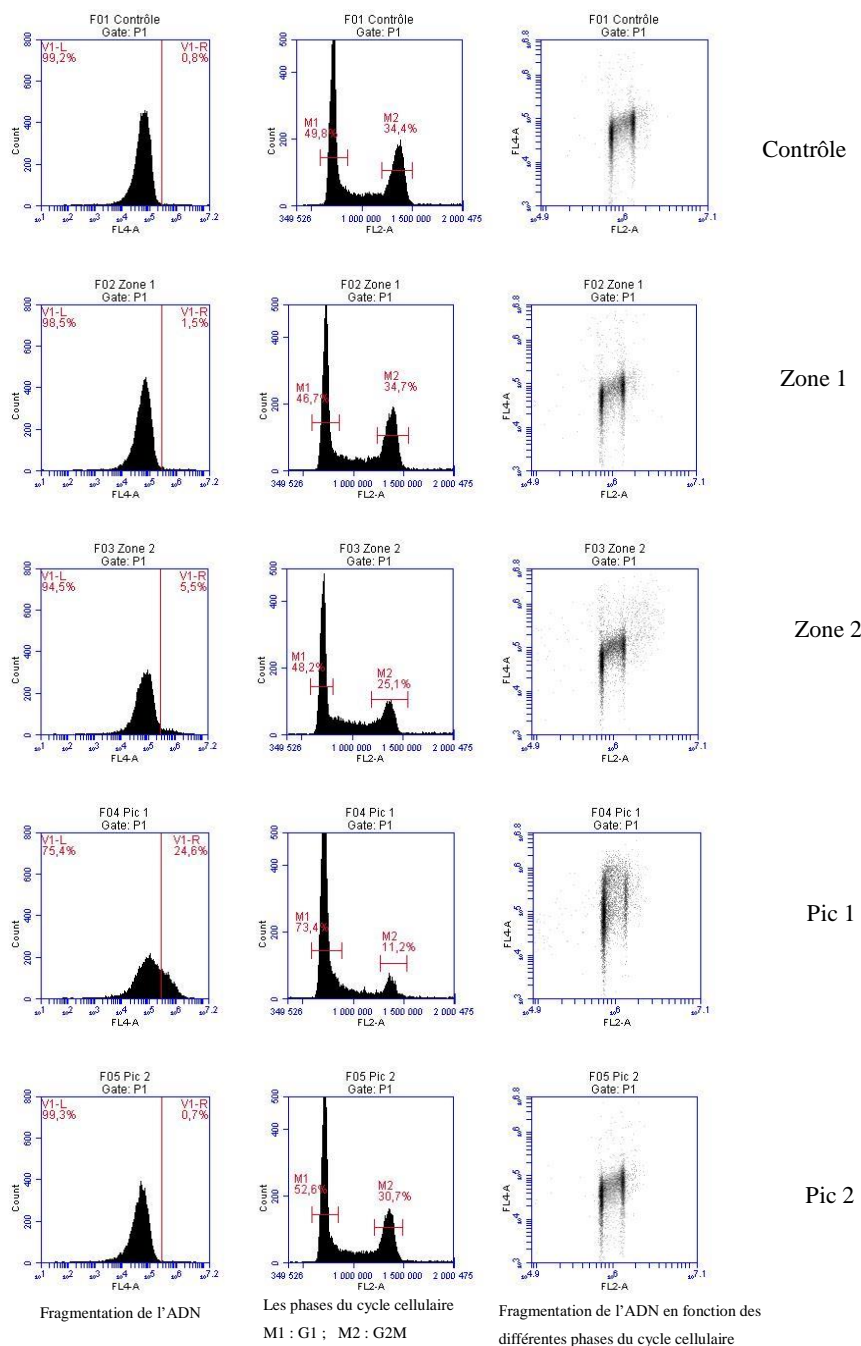


Figure 15: Effet des fractions de *X. aethiops* sur le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN après 24h de traitement.

Il ressort de la figure 15 un effet nettement important du composé du pic 1 avec 24,6% de fragmentation de l'ADN. Les composés de la zone 2 quant à eux sont responsables de 5,5% de fragmentation de l'ADN. Dans le même sens le composé du pic 1 induit une accumulation significative des cellules en phase G1 avec 73,4% de cellules contre seulement 49,8% pour le contrôle. Pour les composés de la zone 1 et du pic 2, aucun effet particulier

n'est observé que ce soit sur le cycle cellulaire ou la fragmentation de l'ADN. Ces résultats attestent que le pic 1, composé majoritaire d'après le spectre UV, est également le composé principalement responsable de l'activité cytotoxique de *X. aethiopica*. Celui-ci a été isolé et son poids moléculaire déterminé par spectrométrie de masse. Ce spectre de masse indique que le composé contenu dans le pic 1 a une masse moléculaire de 315,57 g/mol.

III.4.5 Caractérisation de l'activité cytotoxique du composé du pic 1

a) Effet du composé du pic 1 sur la prolifération cellulaire

La prolifération de différentes lignées cellulaires traitées à différentes concentrations du composé du pic 1 pendant 4 jours est présentée au tableau XIII.

Tableau XIII : Prolifération cellulaire en présence du composé du pic 1.

Concentrations du pic 1	Prolifération cellulaire (% du contrôle)				
	0 µg/ml	3 µg/ml	6 µg/ml	20 µg/ml	IC50 (µg/ml)
HCT 116	100	4,30 ± 0,46 ^c	0,93 ± 0,12 ^a	0,00 ± 0,00	1,55 ± 0,09
U2OS	100	26,83 ± 6,03 ^b	1,43 ± 0,02 ^c	0,00 ± 0,00	2,05 ± 0,24
Capan 2 PC	100	5,02 ± 3,64 ^c	0,67 ± 0,007 ^c	0,00 ± 0,00	2,17 ± 0,73
Sum PT 159	100	1,87 ± 0,06 ^c	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,55 ± 0,05
Fibroblastes normaux	100	63,66 ± 8,37 ^a	35,05 ± 6,76 ^b	15,61 ± 3,55 ^b	4,44 ± 0,62

Les valeurs représentent les moyennes ± écartype de 3 expériences indépendantes. .^(a) p<0,05 ; ^(b) p<0,005 ; ^(c) p<0,0005 ; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student). Capan 2PC : adénocarcinome de pancréas, U2OS : ostéosarcome, Sum PT 159 : carcinome de sein, HCT 116 : cancer colorectal.

Le composé contenu dans le pic 1 a une activité cytotoxique très significative variant en fonction de la concentration avec des IC50 de 1,55 ; 2,05 ; 2,17 ; 1,55 et 4,44 µg/ml respectivement pour les cellules HCT 116, U2OS, Capan 2 PC, Sum PT 159 et fibroblastes normaux. Au regard de ce résultat, le composé du pic 1 tout comme l'extrait total de *X. aethiopica* renferme une activité cytotoxique sur les cellules normales, activité toutefois nettement inférieure à celle observée sur les cellules cancéreuses.

b) Effet du composé du pic 1 sur la croissance des colonies des cellules HCT 116

A la suite du test de prolifération cellulaire, les cellules HCT 116 traitées par différentes doses du composé du pic 1 ont été soumises au test de clonogénie sur plastique (figure 16), ce pour une durée de traitement de huit jours.

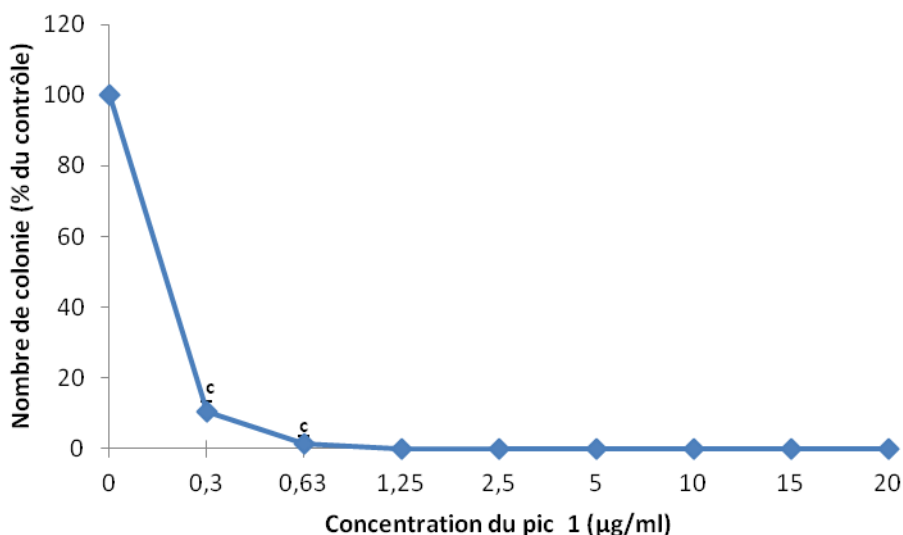


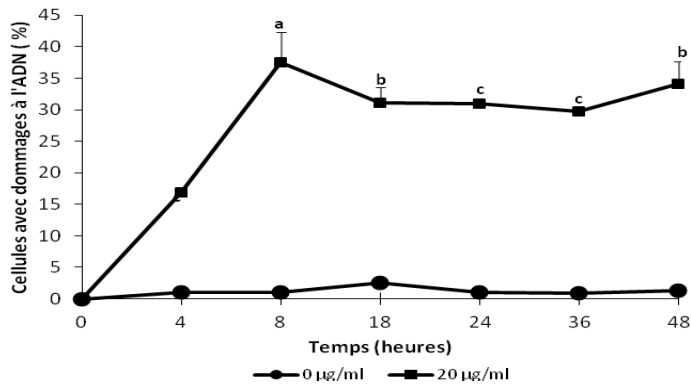
Figure 16 : Croissance des colonies des cellules HCT 116 en présence du pic 1.

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes. ^(c) $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

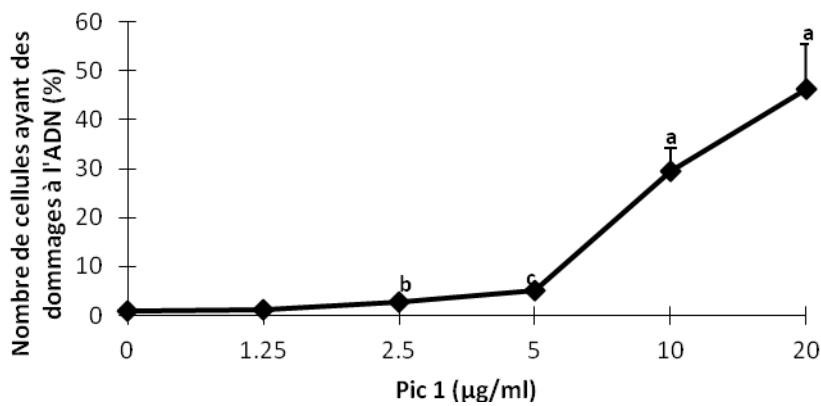
Il ressort de la figure 16 que, le composé du pic 1 même aux très faibles concentrations, par exemple 0,63 $\mu\text{g/ml}$, inhibe significativement et totalement la croissance des colonies des cellules HCT 116. Cette inhibition est par ailleurs caractérisée par une IC50 du composé du pic 1 de $0,17 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$, valeur dix fois inférieure à celle obtenue avec l'extrait totale ($1,63 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$). Ceci traduit non seulement l'augmentation de l'activité cytotoxique avec la purification de l'extrait, mais confirme d'avantage le composé du pic comme principe actif de *X. aethiopica*.

c) Effet du composé du pic 1 sur la fragmentation de l'ADN et le cycle cellulaire

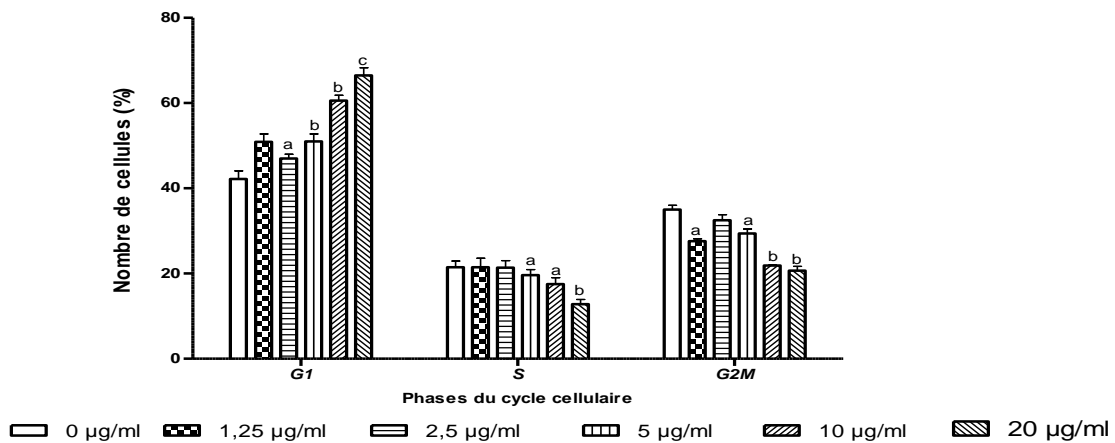
La figure 17 (A, B et C) représente l'effet du temps d'incubation et de la concentration du composé du pic 1 sur les dommages à l'ADN des cellules U2OS, ainsi que l'effet de ce composé sur le cycle cellulaire après 8 h de traitement.



A: Fragmentation de l'ADN en fonction du temps.



B : Concentration-réponse sur la fragmentation de l'ADN.



C: Cycle cellulaire

Figure 17 : Effet du pic 1 sur la fragmentation de l'ADN et le cycle cellulaire.

Les valeurs représentent les moyennes \pm écartype de 3 expériences indépendantes ; ^{a)} $p < 0,05$; ^{b)} $p < 0,005$; ^{c)} $p < 0,0005$; valeurs statistiquement différentes du témoin (test 't' de Student).

La figure 17 A montre un maximum de fragmentation de l'ADN après 8h de traitement, avec en moyenne 37,5 % de cellules présentant des dommages à l'ADN. Au delà de 8h d'incubation, l'effet du composé du pic 1 sur la fragmentation de l'ADN varie très peu en fonction du temps. De ce fait, la durée de traitement de 8h a été considérée pour l'étude de l'effet concentration-réponse du composé du pic 1 sur la fragmentation de l'ADN (figure 17 B) et sur le cycle cellulaire (figure 17 C).

Il ressort de la figure 17 B un effet variant en fonction de la concentration du composé du pic 1 sur l'apparition des dommages à l'ADN. Cet effet sur la fragmentation de l'ADN augmente de façon exponentielle pour les concentrations de composé comprises entre 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$.

La figure 17 C montre un effet du composé du pic 1 variant en fonction de la concentration sur l'accumulation des cellules en phases G1 et la réduction du nombre de cellules en phase S et G2M. Cette accumulation des cellules en G1 serait liée aux dommages de l'ADN provoqués par le composé du pic 1 qui activeraient le point de contrôle du passage des cellules de la phase G1 à la phase S.

Dans l'optique de mieux élucider l'effet du composé du pic 1 sur l'ADN cellulaire, les cellules U2OS ont été traitées par 20 $\mu\text{g/ml}$ du pic 1 et analysées par immunofluorescence (figure 18).

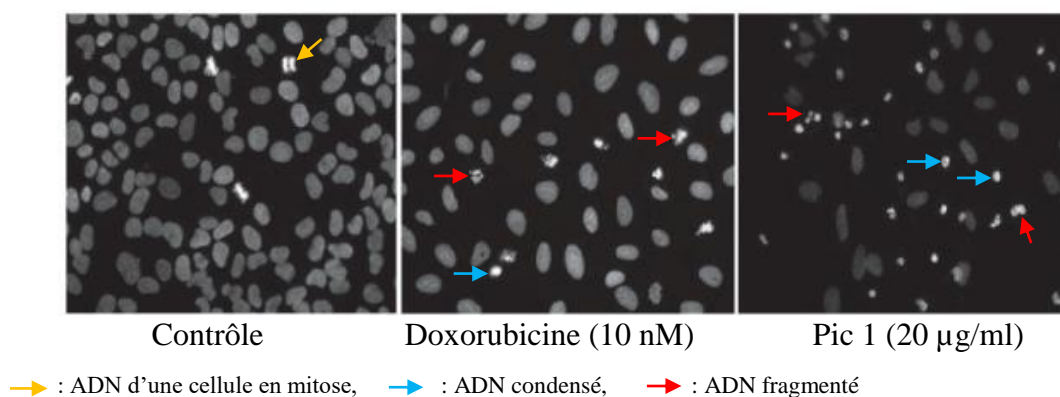


Figure 18 : Effet du composé du pic 1 sur la condensation et fragmentation de l'ADN.

Le marquage DAPI (immunofluorescence) indique un ADN normal pour les cellules contrôles. Des ADN condensés et des fragments d'ADN, signes d'apoptose, sont observés à l'issue du traitement des cellules par la doxorubicine et le pic 1 (figure 18). Plus spécifiquement un comptage sur les lamelles indique des pourcentages de cellules apoptotiques de 0 ; 8,2 et 17,6 % respectivement pour les cellules contrôle, les cellules traitées à la doxorubicine ou au pic 1.

d) Effet du composé du pic 1 sur la PARP (poly(ADP-ribose) polymérase)

Afin de confirmer l'implication de l'apoptose dans la mort cellulaire due au composé du pic 1, la PARP clivée (85 Kda) a été mesurée par western blot des cellules traitées pendant 8h au pic 1 (figure 19).

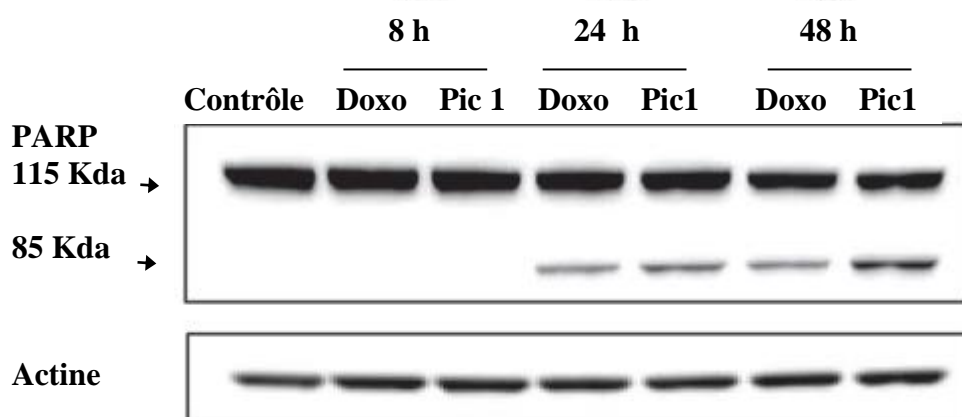


Figure 19: Effet du composé du pic 1 sur la PARP clivée par Western blot.

L'analyse par western blot de la PARP clivée a été effectuée après traitement des cellules U2OS par le pic 1 à 20 µg/ml ou par la doxorubicine 10 nM (cytotoxique de référence)

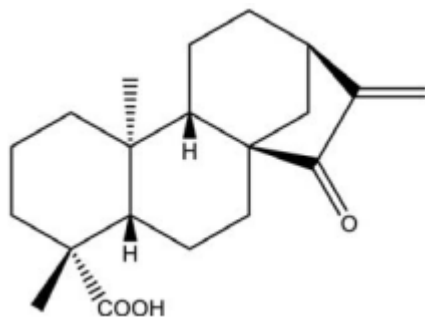
La PARP non clivée (115 Kda) est présente dans toutes les cellules, tandis que la PARP clivée (85 Kda), marqueur de l'activation du processus de mort cellulaire par les caspases, apparaît de façon significative à partir de 24 h d'incubation des cellules à la doxorubicine ou au composé du pic 1 (figure 19).

III.4.6 Identification du composé du pic 1

A l'issue des différentes investigations précédentes, le composé contenu dans le pic 1 est le composé majoritairement responsable des différentes activités antiprolifératives de X.

aethiopica. Cette activité cytotoxique est due à l'activation d'un processus apoptotique qui est probablement la conséquence de la capacité du produit à induire des dommages à l'ADN.

Grâce aux diverses méthodes de chimie utilisées (spectrométrie de masse, RMN) et avec la collaboration de Mathieu Danel et Stefan Chassaing (de la plate forme de Chimie ITAV-Toulouse, France), le composé contenu dans le pic 1 analysé dans ce travail a été identifié comme étant un diterpène de formule brute $C_{20}H_{28}O_3$, il s'agit de l'acide ent -15-oxokaur-16-èn-19-oïque qui a pour structure chimique :



Acide ent -15- oxokaur-16-èn-19-oïque

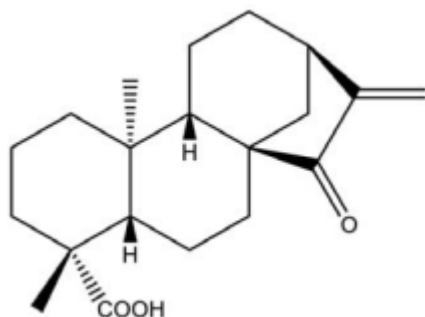
III.4.7 Discussion partielle

L'extrait de *X. aethiopica* réduit la viabilité des fibroblastes normaux, un effet toutefois comparable à celui observé sur la lignée de cellules cancéreuses HCT 116. La concentration inhibitrice de la prolifération de 50% de cellules par cet extrait est de $12,37 \pm 1,54 \mu\text{g/ml}$, valeur proche de celle observée sur les cellules normales du sein MCF 12A.

L'extrait de *X. aethiopica* sur les cellules cancéreuses HCT 116, induit des dommages à l'ADN ainsi que l'accumulation des cellules en phase S et G2M. En effet au cours de la division cellulaire le passage des cellules d'une phase à l'autre est régulé par des points de contrôle (Neidle, 2008 ; Ray *et al.*, 2010). L'extrait de *X. aethiopica* induirait donc des dommages à l'ADN qui empêcheraient la réplication de l'ADN caractérisée par un arrêt des cellules en phase S et G2M. Ces résultats sont semblables à ceux de Li *et al.* (2009) qui ont observé une accumulation des cellules humaines d'hépatocarcinomes (MHCC97H) en phase S après leur traitement par des extraits de *Chrysanthemum indicum*. Cet arrêt se caractérise par une augmentation de la synthèse de la protéine p21 et une baisse de l'expression de la protéine CDK4 (Neidle, 2008).

L'analyse bio-guidée de l'extrait de *X. aethiopica* montre le composé du pic 1 comme responsable de l'activité antiproliférative de cette plante. Ce composé du pic 1 est par ailleurs nettement plus antiprolifératif que l'extrait de *X. aethiopica* montrant ainsi l'augmentation de l'efficacité avec la purification de l'extrait. Le composé du pic 1 induit des dommages significatifs sur l'ADN des cellules U2OS ainsi qu'une accumulation significative des cellules en phase G1. Le composé du pic 1 activerait la protéine du rétinoblastome (suppresseur de tumeurs) provoquant l'arrêt de toutes les cellules dont l'ADN est endommagé à la phase G1 et empêchant l'entrée de ces cellules en phase S et G2M (Vaillard *et al.*, 2001; Mayhew *et al.*, 2004). Ceci implique une non activation ou une inefficacité des systèmes de réparation de l'ADN en présence du composé du pic 1. D'autre part l'induction des dommages de l'ADN par le composé du pic 1 est inférieure à celle de l'extrait de *X. aethiopica*. Ceci montre que d'autres molécules notamment celles de la zone 2 participent à l'activité observée. Sur le cycle cellulaire, le composé du pic 1 agit essentiellement sur la phase G1 tandis que l'extrait est effectif principalement en phase S. En agissant de manière spécifique sur la phase G1 (première phase du cycle cellulaire), ce composé agirait ainsi plus efficacement sur le cycle cellulaire que l'extrait de *X. aethiopica*. Les dommages sur l'ADN cellulaire induits par le composé du pic 1 seraient liés par ailleurs à son activité apoptotique telle que démontré par la présence de noyaux apoptotiques et la stimulation du clivage de la PARP en PARP clivée (85 Kda) (Melchini *et al.*, 2009). En effet, la PARP clivée et la présence de noyaux apoptotiques sont des marqueurs de l'activation du processus de mort cellulaire par les caspases (Heeres et Hergenrother, 2007).

La caractérisation chimique du composé du pic 1 par spectrométrie de masse et RMN a révélé qu'il est de nature diterpénique, l'acide ent-15-oxokaur-16-èn-19-oïque de la formule brute $C_{20}H_{28}O_3$ avec pour structure chimique :



Ce composé a par ailleurs été produit ou dérivé de l'acide grandiflorolique isolé de *Espeletia schultzii* par Ruiz *et al.* (2008), qui ont également montré son activité

antiproliférative sur les cellules humaines du cancer de la prostate PC-3 par induction de l'apoptose.

III.5 DISCUSSION GENERALE

D'après les statistiques de l'OMS en 2010, 80 % des populations en Afrique et dans plusieurs pays d'Asie et d'Amérique latine ont recours aux plantes médicinales pour lutter contre diverses maladies et infections y compris les cancers (OMS, 2012). Dans le présent travail, l'objectif était d'isoler et d'identifier de nouveaux antitumoraux moins toxiques et d'origine naturelle. A cet effet cinq plantes ont été utilisées comme matériel de départ et le « screening » de leurs propriétés antiprolifératives a été effectué sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses. De la première partie du travail, il ressort que *X. aethiopica* possède l'activité antiproliférative la plus importante sur toutes les lignées cellulaires et principalement sur Capan 2PC et U937. Une résistance des cellules KG1a à la cytotoxicité de cet extrait est tout de même observée probablement due à une défection de la voie de signalisation conduisant à la mort cellulaire (Wu *et al.*, 1998 ; Laurent et Jaffrezou, 2001). Le test de viabilité cellulaire effectué par le réactif WST-1 d'une part et par la sulforhodamine B d'autre part confirme les potentialités anticancéreuses de *X. aethiopica* et montre une grande sensibilité des cellules cancéreuses du sein MDA-MB 231 et MCF 7 comparée aux autres lignées (HCT116 notamment). Toutefois, *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides* se sont aussi révélés doués de propriétés antiprolifératives (Shirazi *et al.*, 2004 ; Moghe *et al.*, 2011). Ces résultats corroborent les travaux antérieurs qui ont montré les propriétés antiprolifératives de *F. leprieuri* et *X. aethiopica* décrites sur des cellules de cancer de pancréas MiaPaCa-2, des cellules leucémiques CCRF-CEM et des cellules cervicales C-33A (Adaramoye *et al.*, 2011; Kuété *et al.*, 2011). D'autre part les IC50 pour la plupart des extraits permettent de dire en se référant à la limite fixée par le NCI (20 µg/ml) que ces extraits sont actifs du point de vue de leur activité cytotoxique (Boik, 2001). Aussi les résultats permettent de conclure que *F. leprieuri*, *F. Xanthoxyloides* et *X. aethiopica* sont des extraits à activité antiproliférative importante. Néanmoins ils soulignent une certaine spécificité d'action de *X. aethiopica* pour les cellules cancéreuses comparées aux cellules normales, avec par exemple une IC50 de 8,43 ± 0,41 µg/ml sur MCF 12A et 12,37 ± 1,54 µg/ml sur les fibroblastes normaux.

Les agents les plus développés utilisés en chimiothérapie qui sont d'origine naturelle (plantes) exercent leur activité antiproliférative par induction de l'apoptose chez différents types de cellules (Baeshen *et al.*, 2012). Ainsi, dans la deuxième partie de ce travail, l'activité antiproliférative de *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides* et *X. aethiopica* s'est révélée due à leur habileté à induire l'apoptose chez les cellules de cancer du sein MDA-MB 231. En effet, la

mesure de l'activité de la caspase-3 montre que *F. lepriouri* et *F. xanthoxyloides* induisent une activation en fonction du temps de la caspase 3, tandis que pour *X. aethiopica* cette activation est essentiellement fonction de la dose. L'effet de ces extraits sur l'activité de la caspase 3 est corrélé à la condensation de l'ADN nucléaire. En effet l'activation de la caspase 3 est responsable de la condensation et de la fragmentation de l'ADN ; la condensation étant une caractéristique morphologique indiquant la mort cellulaire par apoptose (Elmore, 2007; Sarda *et al.*, 2009 ; Bakar *et al.*, 2010). Toutefois pour que les modifications morphologiques nucléaires aient lieu, la membrane nucléaire doit être perméabilisée ; ceci se fait par clivage de certaines protéines par les caspases. La condensation de l'ADN qui s'observe par la suite est due à la flavoprotéine mitochondriale AIF (*apoptosis inducing factor*) qui passe de la mitochondrie au noyau et à la protéine Acinus activée par clivage par la caspase 3 (Solary, 2006). Cette activation de la caspase 3 est corroborée non seulement à la perte du potentiel membranaire mitochondrial observée mais également à l'augmentation de la consommation de l'oxygène non couplée à la synthèse d'ATP. En effet, une perturbation du potentiel membranaire entraîne une ouverture des pores de transition mitochondriaux. Il en résulte un gonflement de la mitochondrie qui entraîne une expulsion dans le cytosol de protéines proapoptotiques qui vont se charger de participer à la préparation de la mort cellulaire par apoptose (Pereira *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2011).

En résumé la mort cellulaire causée par les extraits étudiés sur les cellules MDA-MB 231 se ferait effectivement par apoptose après perturbation du potentiel membranaire, libération dans le cytoplasme de molécules proapoptogènes, activation de la cascade des caspases, perméabilisation de la membrane nucléaire et condensation de l'ADN (Chakraborty *et al.*, 2006; Karamitopoulou *et al.*, 2007).

La littérature souligne un lien étroit entre les propriétés antiprolifératives de plantes et les activités antioxydantes (Behera *et al.*, 2008 ; Jing *et al.*, 2010). En effet le déséquilibre antioxydants-prooxydants en faveur des prooxydants entraîne des dommages multiples au sein de la cellule, principalement sur les protéines, les lipides ou l'ADN (fragmentation de l'ADN). Cependant, hormis le système antioxydant endogène (enzymes antioxydants), l'organisme peut recourir aux antioxydants apportés par l'alimentation. Les plantes et épices sont de ce fait d'importantes sources d'antioxydants (Young et Woodside, 2001 ; Neto *et al.*, 2008; Pittella *et al.*, 2009). L'analyse des propriétés antioxydantes des différents extraits a montré une fois de plus, *X. aethiopica* se singularisant des autres extraits par sa teneur élevée

en phénols, en anthocyanines, et ce principalement dans les extraits MeOH 1% HCl. En plus, *X. aethiopica* seul contient à la fois l' α et γ – tocophérol, l' α et β – carotène, la lutéine et 2 phénols identifiés (resvératrol, rutin). Ces résultats soutiennent clairement la corrélation entre la richesse des extraits d'intérêt en antioxydant et leur activité antiproliférative, activité qui pourrait s'expliquer par la présence des différentes molécules antioxydantes comme les phénols identifiés (Jing *et al.*, 2010). En effet, les composés phénoliques ainsi que les tocophérols et les carotènes identifiés sont doués à la fois de propriétés antioxydantes et antiprolifératives sur différentes lignées cellulaires (Kim *et al.*, 2009 ; Jing *et al.*, 2010 ; Ulbricht et Chao, 2010). A côté de ces antioxydants présents dans les extraits, l'acide phytique, décrit comme doué de propriétés antioxydantes et antiprolifératives *in vitro* (Saad *et al.*, 2011 ; Vadivel et Biesalski, 2012) y a également été identifié en quantité significative. Corroborant les teneurs en antioxydants, l'étude des activités antioxydantes des extraits MeOH 1% HCl, acide phytique et L-DOPA a montré une activité antiradicalaire significative pour les trois extraits, avec toutefois *X. aethiopica* ayant une activité proche de celle observée avec les standards (Vitamine C et BHT). D'autre part le pouvoir réducteur des ions ferriques s'est avéré plus important pour les extraits de *X. aethiopica*. Ces résultats soulignent non seulement une teneur élevée en antioxydants de *X. aethiopica*, mais également un pouvoir antioxydant très significatif de cet extrait. Ils suggèrent donc une corrélation entre les propriétés antiprolifératives et antioxydantes telle que démontrée dans la littérature (Chu *et al.*, 2002 ; Boivin *et al.*, 2009). Cet extrait particulier de part son activité antiproliférative et ses propriétés antioxydantes mérite des analyses poussées pour une meilleure compréhension du mécanisme de ses différentes activités et l'identification de la ou des molécule(s) mise(s) en jeu.

L'étude de l'effet de l'extrait total de *X. aethiopica* sur les dommages à l'ADN et le cycle cellulaire montre chez les cellules U2OS qu'il induit la fragmentation de l'ADN, laquelle fragmentation empêche la replication de l'ADN et l'arrêt des cellules en phase S. Cet arrêt en phase S est caractérisé par une augmentation de la synthèse de la protéine p21 et une baisse de l'expression de la protéine CDK4 (Neidle, 2008 ; Li *et al.* 2009 ; Ray *et al.*, 2010). Le fractionnement bio-guidé de l'extrait de *X. aethiopica* montre le composé du pic 1 comme responsable de l'activité antiproliférative. Ce composé du pic 1 inhibe de manière très significative comparé à l'extrait total la prolifération des cellules HCT 116, U2OS, Capan 2 PC, Sum PT 159 et fibroblastes normaux ; ceci se caractérise par des IC 50 très faibles

comparées à celles obtenues avec l'extrait total. Ce résultat et celui du test de clonogénie montrent que le composé du pic 1 de part sa pureté possède une activité bien plus importante ou significative que l'extrait total. En plus, ce composé du fait qu'il soit pur induit la fragmentation significative de l'ADN des cellules U2OS ainsi qu'une accumulation de ces cellules en phase G1 en fonction de la concentration et du temps (ceci comparé à l'extrait total). Cet arrêt des cellules en G1 se fait par activation de la protéine ATM, laquelle activation est due à la fragmentation de l'ADN (Fischer, 2008). En effet, la protéine ATM active le point de restriction principalement régulé par la protéine du rétinoblastome (Viallard *et al.*, 2001 ; Fischer, 2008) et le complexe CDK2 / cycline E (Johnson et Walker, 1999) d'où l'arrêt des cellules en phase G1. En outre, les dommages à l'ADN cellulaire induit par le composé du pic 1 seraient liés à son activité apoptotique telle que démontrée par la présence de noyaux apoptotiques et la stimulation du clivage de la PARP en PARP clivée (85 Kda). La PARP clivée et la présence de noyaux apoptotiques sont des marqueurs de l'activation du processus de mort cellulaire par les caspases (Heeres et Hergenrother, 2007). La caractérisation chimique du composé du pic 1 par spectrométrie de masse et RMN a révélé qu'il est de nature diterpénique, et dénommé acide ent -15- oxokaur-16-èn-19-oïque de formule brute $C_{20}H_{28}O_3$. Ce composé a par ailleurs été précédemment décrit comme cytotoxique sur les cellules humaines de cancer du prostate PC-3 et entraîne la mort cellulaire par apoptose (Ruiz *et al.*, 2008).

IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1 CONCLUSION

Les fruits de *F. leprieuri* et *F. xanthoxyloides*, les amandes de *M. myristica*, les feuilles de *L. guineensis* et les gousses de *X. aethiopica* sont utilisés en cuisine comme épices (sauf *L. guineensis*) et en médecine traditionnelle pour soigner diverses maladies et infections. Dans le but d'isoler une nouvelle molécule utilisable dans la lutte contre les cancers, leurs propriétés antiprolifératives ont été évaluées sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses par diverses méthodes.

- D'après l'objectif premier qui était l'étude de l'activité antiproliférative des différents extraits éthanol 70%, l'on peut conclure que *F. leprieuri*, *F. xanthoxyloides*, *M. myristica*, *L. guineensis* et *X. aethiopica* présentent des activités antiprolifératives, mais l'extrait de *X. aethiopica* a présenté l'effet antiprolifératif le plus important.

- La caractérisation l'activité antiproliférative des extraits de *X. aethiopica*, *F. xanthoxyloides* et *F. leprieuri* a montré qu'ils entraînent la mort cellulaire via la baisse du potentiel membranaire; l'activation de la caspase 3 et la condensation de l'ADN.

- La détermination de la teneur en antioxydants et de l'activité antioxydante de *X. aethiopica*, *F. xanthoxyloides* et *F. leprieuri* a révélé que ces épices sont riches en antioxydants: phénols, carotènes, tocophérols ; *X.aethiopica* (plus riche en antioxydants) étant le plus doué d'activité antioxydante.

- La caractérisation du mécanisme d'activité antiproliférative de l'extrait de *X. aethiopica* a montré qu'il entraîne l'arrêt des cellules en G2M ainsi qu'en phase S. De plus cette activité cytotoxique est principalement dûe à la présence dans cette plante de l'acide ent -15- oxokaur-16-èn-19-oïque. Ce composé provoque des dommages à l'ADN ce qui a pour conséquence d'induire la mort des cellules par apoptose. Par ailleurs, en plus des composés antioxydants, nos résultats suggèrent que l'acide ent -15- oxokaur-16-èn-19-oïque est responsable de l'activité antiproliférative de l'extrait de *X. aethiopica*.

IV.2 PERSPECTIVES

Dans le l'optique de poursuivre la caractérisation des propriétés antiprolifératives des extraits et de la molécule isolée de *X. aethiopica*, nous nous proposons :

- D'effectuer des modifications structurales de l'acide ent -15- oxokaur-16-en-19-oïque composé afin d'optimiser ou d'augmenter son affinité aux cellules tumorales,
- De déterminer les principaux composés ou molécules issus du métabolisme de cette molécule et étudier les mécanismes d'action,
- Et enfin de réaliser une étude *in vivo* de l'activité antoproliférative.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul DA, Majeed SN. *Identification of Antioxidant compounds in red raspberry (Rubus Idaeus) Fruit in Kurdistan region (north Iraq)*. IOSR Journal of Applied Chemistry, 2(3): 6-10 (2012).
- Adaramoye OA, Adedara A, Popoola B, Farombi EO. *Extract of Xylopia aethiopica (Annonaceae) protects against gamma-radiation induced testicular damage in Wistar rats*. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 21: 295-313 (2010a).
- Adaramoye OA, Sarkar J, Singh N, Meena S, Changkija B, Yadav PP, Kanojiya S, Sinha S. *Antiproliferative Action of Xylopia aethiopica Fruit Extract on Human Cervical Cancer Cells*. Phytotherapy Research, 25(10):1558-1563 (2011).
- Adjanohoun JE, Aboubacar N, Dramane K, Ebot ME, Ekpere JA, Enow-Orock EG, Focho D, Gbile ZO, Kamanyi A, Kamsu KJ, Keita A, Mbenku T, Mbi CN, Mbiele AL, Mbome IL, Mubiru NK, Nancy WL, Kongmeneck B, Satabie B, Sofora A, Tamze V, Wirmun CK. *Traditional medicine and pharmacopoeia. Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. Organisation of African Unity Scientific and Research Commission*. Centre national de production de manuels scolaire. Porto-novo, 227, (1996).
- Ajayi IA, Adebowale KO, Dawodu FO, Oderinde RA. *A study of the oil content of Nigerian grown Monodora myristica seeds*. Pakistan Journal of Science and Industrial Research, 47 (1): 60-65 (2004).
- Aké AL, Jérémie J. *Lectotypification de Fagara mezoneurispinosa (Rutaceae) basionyme de Zanthoxylum mezoneurispinosum, espèce endémique de Côte d'Ivoire*. Adansonia, série 3, 31(1): 169-174 (2009).
- Al-Dabbas MM, Abu-Taleb R, Al-Ismaïl K. *Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Extracts and Compounds Isolated from Varthemia (Varthemia iphionoides Bloiss)*. Functional Plant Science and Biotechnology 5 (Special Issue 1), (2010).
- Alongkornsopit J, Wipasa J, Luangkamin S, Wongkham W. *Anticancer activity of ethyl acetate and n-butanol extracts from rhizomes of Agapetes megacarpa W.W. Smith*. African Journal of Biotechnology, 10 (17): 3455-3462 (2011).
- Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Al-Hazzani AA, Alsaif MA , Alfawaz MA , Lei KY, Munshi A. *Apoptosis-mediated inhibition of human breast cancer cell proliferation by*

- lemon citrus extract*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 12: 1555-1559 (2011).
- Astadi RI, Astuti M, Santoso U, Nugraheni PS. *In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL)*. Food Chemistry, 112: 659-663 (2009).
- Bacac M, Stamenkovic I. *Metastatic cancer cell*. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease, 3: 221-247 (2008).
- Baeshen NA, Elkady AI, Abuzinadah OA, Mutwakil MH. *Potential anticancer activity of the medicinal herb, Rhazya stricta, against human breast cancer*. African Journal of Biotechnology, 11(37): 8960-8972 (2012).
- Bakar AMF, Mohamad M, Rahmat A, Burr SA, Fry JR. *Cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cell lines exposed to an extract of the seed kernel of Mangifera pajang (bambangan)*. Food and Chemical Toxicology, 48: 1688-1697 (2010).
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR, Baptista P. *Total phenols, ascorbic acid, β-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities*. Food Chemistry, 103: 413-419 (2007).
- Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. *Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens*. Bioresource Technology, 99: 776-784 (2008).
- Benzie IFF, Strain JJ. *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay*. Analytical Biochemistry, 239: 70-76 (1996).
- Berridge MV, Tan S, McCoy KD, Wang R. *The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts*. Biochemical, 4: 15-19 (1996).
- Beutler JA. *Natural products as a foundation for drug discovery*. Current Protocols in Pharmacology, 46: 9.11.1-9.11.21 (2009).
- Boik J. *Natural compounds in cancer therapy*, 1st edition, Oregon Medical Press, LLC, Princeton, Minnesota. ISBN 0-9648280-1-4, 541 pages (2001).
- Boivin D, Lamy S, Lord-Dufour S, Jackson J, Beaulieu E, Côté M, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Béliveau R. *Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study*. Food Chemistry, 112: 374-380 (2009).
- Bouba AA, Njintang YN, Scher J, Mbofung CMF. *Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices*. Agriculture and Biology Journal of North America, 1(3): 213-224 (2010).

- Boutis A, Papazisis K, Pistevou-Gompaki K, Lambropoulos A, Sofroniadis I, Papageorgiou A, Destouni E, Kortsaris A. *Cyclin-dependent Kinase (CDK) inhibitor olomoucine enhances γ -irradiation-induced apoptosis and cell cycle arrest in raji cells*. *Anticancer Research*, 26: 3493-3498 (2006).
- Boyom FF, Ngouana V, Zollo PHA, Menut C, Bessiere JM, Gut J, Rosenthal PJ. *Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants*. *Phytochemistry*, 64: 1269-1275 (2003).
- Bradford MM. *A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding*. *Anal Biochem*; 72: 248-254 (1976).
- Brain KR. *Accumulation of L-DOPA in cultures from Mucuna pruriens*. *Plant Science Letters*, 7: 157-161 (1976).
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28 (1): 25-30 (1995).
- Brigelius-Flohé R, Kipp A. *Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:1555-1568 (2009).
- Burkill HM. *The Useful Plants of West Africa (A –D)*. Kew, England: Royal Botanical Gardens (1985).
- Chakraborty S, Kundu T, Dey S, Bhattacharya RK, Siddiqi M, Roy M. *Tea-induced apoptosis in human leukemia K562 cells as assessed by comet formation*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7(2): 201-207 (2006).
- Chance B, Williams GR. *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 17: 65-134 (1956).
- Chang JY, Komaki R, Roth JA, Herbst R, Cox JD. *Image guidance of screening, staging, and combined modality management of non-small cell lung cancer in image –guided radiotherapy of lung cancer*. Informa Healthcare USA, New York, 202 pages (2008).
- Chauhan D, Anderson K. *Chapter 8: Targeting cell-death pathways in multiple myeloma: therapeutic implications*. *Application of apoptosis to cancer treatment*, Springer, The Netherlands, 368 pages (2005).
- Chen Y, Liu J, Yuan B, Cao C, Qin S, Cao X, Bian G, Wang Z, Jiang J. *Methylated actinomycin D, a novel actinomycin D analog induces apoptosis in HepG2 cells through fas- and mitochondria-mediated pathways*. *Molecular Carcinogenesis*. DOI 10.1002/mc.21943, 14 pages (2012).

- Ching LS, Mohamed S. *Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6): 3101-3105 (2001).
- Chinkwo KA. *Sutherlandia frutescens extracts can induce apoptosis in cultured carcinoma cells*. Journal of Ethnopharmacology, 98: 163-170 (2005).
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. *The BCL-2 family reunion*. Moelecular Cell, 37: 299-310 (2010).
- Chiu SJ, Lee YJ, Hsu TS, Chen WS. *Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells*. Chemico-Biological Interactions, 182: 173-182 (2009).
- Choi SJN, Lee HK, Kim NH, Chung SY. *Mycophenolic acid mediated mitochondrial membrane potential transition change lead to T lymphocyte apoptosis*. Journal of Korean Surgical Society, 81:235-241 (2011).
- Chopin D, Cappellen D, Radvanyi F, Gattegno B. *Bases fondamentales de la carcinogènèse urothéliale*. Progrès en Urologie, 11(5) : 877-923 (2001).
- Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. *Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables*. Journal of Agricultural and Food Chememistry, 50: 6910–6916 (2002).
- Chung AS, Ferrara N. *Developmental and pathological angiogenesis*. Annual Review of Cell Developmental Biology, 27: 20.1–20.22 (2011).
- Chung EJ, Brown AP, Asano H, Mandler M, Burgan WE, Carter D, Camphausen K, Citrin D. *In vitro and in vivo radiosensitization with AZD6244 (ARRY-142886), an inhibitor of Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 kinase*. Clinical Cancer Research, 15(9): 3050–3057 (2009).
- Clurman BE, Roberts JM. *Cell Cycle and Cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 87(20): 1499-1501 (1995).
- Conforti F, Ioele G, Statti GA, Marrelli M, Ragno G, Menichini F. *Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants*. Food and Chemical Toxicology, 46 : 3325-3332 (2008).
- Cooper GM. *The cell, a molecular approach, second edition*. The American Society for Microbiology, Washington; 690 pages (2000).
- Coquelle A, Mouhamad S, Pequignot MO, Braun T, Carvalho G, Vivet S, Métivier D, Castedo M, Kroemer G. *Enrichment of non-synchronized cells in the G1, S and G2*

- phases of the cell cycle for the study of apoptosis*. *Biochemical pharmacology*, 72: 1396-1404 (2006).
- Cragg GM, Newman DJ. *Plants as a source of anti-cancers agents*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2):72-9 (2005).
- Delieu T, Walker DA. *An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts*. *New Phytologist*, 71: 201-225 (1972).
- Dong Z. *Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol*. *Mutation Research Review*, 523-524:145-150 (2003).
- Dreher D, Junod AF. *Role of oxygen free radicals in cancer development*. *European Journal of Cancer*, 32A: 30-38 (1996).
- Düringer C, Hallgren O, Gustafsson L, Petterson J, Mossberg A, Manilov T, Svanborg C. *Chapter 10: Hamlet; a novel tool to identify apoptotic pathways in tumor cells*. *Application of apoptosis to cancer treatment*, Springer, The Netherlands, 368 pages (2005).
- Ekortarl AC, Ndom P, Sacks A. *A study of patients who appear with far advanced cancer at Yaounde General Hospital, Cameroon, Africa*. *Psycho-Oncology* 16: 255–257 (2007).
- Elmore S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*, 35: 495-516 (2007).
- El-Shemy HA, Aboul-Enein AM, Aboul-Enein KM, Fujita K. *Willow leaves' extracts contain anti-tumor agents effective against three cell types*. *PLoS ONE* 2(1): e178. doi:10.1371/journal.pone.0000178 (2007).
- Etoundi CB, Kuate D, Ngondi JL, Oben J. *Anti-amylase, anti-lipase and antioxidant effects of aqueous extracts of some Cameroonian spices*. *Journal of Natural Products*, 3:165-171 (2010).
- Ezeifeka GO, Orji MU, Mbata TI, Patrick AO. *Antimicrobial activities of Cajanus cajan, Garcinia kola and xylopia aethiopica on pathogenic microorganisms*. *Biotechnology*, 3 (1): 41-43 (2004).
- Falodun A, Okunrobo LO, Agbo LO. *Evaluation of the anti-edematogenic activity of the aqueous extract of Leea guineensis*. *African Journal of Biotechnology*, 6 (9): 1151-1153 (2007).
- Fauzi AN, Norazmi MN, Yaacob NS. *Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines*. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 871-878 (2011).

- Fischer PM. *Chapter 11: Cell cycle inhibitors in cancer: current status and future directions*. Cancer drug design and discovery, Elsevier, London, 36 pages (2008).
- Gagou ME, Villar PZ, Meuth M. *Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of chk1*. *Molecular Biology of the Cell*, 21: 739 - 752 (2010).
- Gautam B, Vadivel V, Stuetz W, Biesalski HK. *Bioactive compounds extracted from Indian wild legume seeds: antioxidant and type II diabetes-related enzyme inhibition properties*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(2): 242-245 (2012).
- George BO, Osioma E. *Phenolic content and total antioxidant capacity of local spices in Nigeria*. *African Journal of Food Science*, 5(13): 741-746 (2011).
- Gerhauser C. *Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components*. *Planta Medica*, 74: 1608-1624 (2008).
- Giusti MM, Wrolstad ER. *Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy*. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13 (2001).
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2): 751-766 (1949).
- Gupta MK, Qin R-Y. *Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis*. *World Journal of Gastroenterology*, 9(6):1144-1155 (2003).
- Haag P, Viktorsson K, Lindberg ML, Kanter L, Lewensohn R, Stenke L. *Deficient activation of Bak and Bax confers resistance to gemtuzumab ozogamicin-induced apoptotic cell death in AML*. *Experimental Hematology*, 37:755-766 (2009).
- Harper JA, Dickinson K, Brand MD. *Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity*. *Obesity reviews*, 2: 255-265 (2001).
- Heeres JT, Hergenrother PJ. *Poly(ADP-ribose) makes a date with death*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11: 644-653 (2007).
- Henri MM, Thompson JN. *Chirurgie clinique, technique et pratique*, édition de Boeck Université 752 pages (2004).
- Hof M, Kral T, Langner M, Adjimatera N, Blagbrough IS. *DNA condensation characterised by fluorescence correlation spectroscopy (fcs)*. *Cellular and molecular biology letters*, 10: 23-25 (2005).
- Hostettmann K, Andrew M, Ndjoko K, Wolfender JL. *The potential of african plant as source of drugs*. *Current organic Chemistry*, 4: 978-1010 (2000).

- Hu W, Kavanagh JJ. *Chapitre 15: Apoptosis-inducing anticancer drugs in clinical trials. Application of apoptosis to cancer treatment*, 368 pages (2005).
- Huerta S, Arteaga JR, Irwin RW, Ikezoe T, Heber D, Koeffler HP. *PC-SPEs inhibits colon cancer growth in vitro and in vivo*. *Cancer Research*, 62: 5204-5209 (2002).
- IARC (International agency for research on cancer). *Cancer worldwide*, Cancer Stats, Cancer research UK, 8 pages, 2011.
- Institute of Medicine. In: Frank A, Sloan FA, Gelband H, eds. *Cancer control in low- and middle-income countries*. Washington, DC: National Research Council, 2007.
- Ioachim E. *Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features*. *International Journal of Clinical Practice*, 62 (11):1736-1743 (2008).
- Jayaraman S, Manoharan SM, Illanchezian S. *In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of Stevia Rebaudiana (Asteraceae) Leaf Extracts*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (4): 1143-1149 (2008).
- Jemal A, Bray F, Melissa M, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global Cancer Statistics*. *Cancer Journal for Clinicians*, 61:69-90 (2011).
- Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. *Role of arecanut in betel quid associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives*. *Oral Oncology* 37: 477–492 (2001).
- Jing LJ, Mohamed M, Rahmat A, Bakar MFA. *Phytochemicals, antioxidant properties and anticancer investigations of the different parts of several gingers species (Boesenbergia rotunda, Boesenbergia pulchella var attenuata and Boesenbergia armeniaca)*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1): 27-32 (2010).
- Johnson DG, Walker CL. *Cyclins and cell cycle checkpoints*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39:295-312 (1999).
- Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y. *Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state*. *Journal of Membrane Biology*, 49: 105-21 (1979).
- Karamitopoulou E, Cioccarri L, Jakob S, Vallan C, Schaffner T, Zimmermann A, Brunner T. *Active caspase 3 and DNA fragmentation as markers for apoptotic cell death in primary and metastatic liver tumours*. *Pathology*, 39(6): 558-564 (2007).

- Kassim OO, Loyevsky M, Elliott B, Geall A, Amonoo H, Gordeuk VR. *Effects of root extracts of Fagara zanthoxyloides on the in vitro growth and stage distribution of Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 (1): 264-268 (2005).
- Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. *Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP*. Cell Death Differentiation, 19: 42-50 (2011).
- Key TJ. *Fruit and vegetables and cancer risk*. British Journal of Cancer, 104: 6-11 (2011).
- Kim HJ, Kim SJ, Park HR, Choi JI, Ju YC, Nam KC, Kim SJ, Seung-Cheol Lee SC. *The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(12): 1016-1020 (2009).
- Konning GH, Agyare C, Ennison B. *Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana*. Fitoterapia, 75:65-67 (2004).
- Koudou J, Aklikokou K, Gbeassor M, Bessiere JM. *Composition chimique et activite anti-contracturante de l'huile essentielle de Monodora myristica gaertn de la republique centrafricaine*. Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine, 1 : 59-67 (2001).
- Kuete V, Krusche B, Youns M, Voukeng I, Fankam AG, Tankeo S, Lacmata S, Efferth T. *Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts*. Journal of Ethnopharmacology, 134: 803-812 (2011).
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiological Review, 87: 99-163 (2007).
- Latta M, Eskin M. *A simple and rapid colorimetric method for phytate determination*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28: 1313-1315 (1980).
- Laurent G, Jaffrezou JP. *Signaling pathways activated by daunorubicin*. Blood, 98: 913-924 (2001).
- Lee SK, Kim CS, Cho SH, Chun HS, Kim JK, Kim DK. *The effects of Angelica decursiva extract in the inhibition of cell proliferation and in the induction of apoptosis in osteogenic sarcoma cells*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(4): 241-245 (2009).
- Lee KW, Lee CY. *Vitamins, diet, and cancer prevention*. American Journal for Clinical Nutrition, 75:1121-1125 (2002).
- Li Z-F, Wang Z-D, Ji Y-Y, Zhang S, Huang C, Li J, Xia X-M. *Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with Chrysanthemum indicum extract*. World Journal of Gastroenterology, 15(36): 4538-4546 (2009).

- Lutz WK. *A true threshold dose in chemical carcinogenesis cannot be defined for a population, irrespective of the mode of action*. Human and Experimental Toxicology, 19: 566-568 (2000).
- Majewska A, Grazyna H, Mirosława F, Natalia U, Agnieszka P, Alicja Z, Kura's M. *Antiproliferative and antimitotic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from Rhodiola rosea rhizomes on HL-60 cells*. Journal of Ethnopharmacology 103: 43-52 (2006).
- Malgras D. *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*, Karthala et ACCT, Paris, 478 pages (1992).
- Malumbres M, Barbacid M. *Cell cycle kinases in cancer*. Current Opinion in Genetics and Development, 17:60-65 (2007).
- Mans DRA, Da Rocha AB, Schwartzmann G. *Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds*. The Oncologist, 5:185-198 (2000).
- Matushansky I, Radparvar F, Skoultchi AI. *Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (26): 14317-14322 (2000).
- Mayhew CN, Bosco EE, Solomon DA, Knudsen ES, Angus SP. *Analysis of RB action in DNA damage checkpoint response*. Methods in Molecular Biology, volume 281, Humana press, Totowa, 333 pages (2004).
- McCann MJ, Gill CIR, O' Brien G, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR. *Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro*. Food and Chemical Toxicology 45: 1224-1230 (2007).
- Meijer L. *Le cycle de division cellulaire et sa régulation*. Oncologie, 5: 311-326 (2003).
- Melchini A, Costa C, Traka M, Miceli N, Mithen R, De Pasquale R, Trovato A. *Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells*. Food and Chemical Toxicology, 47: 1430-1436 (2009).
- Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Comić L, Dačić D, Curčić M, Marković S. *Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species*. International Journal of Molecular Sciences, 12(8):5428-48 (2011).

- Moghe AS, Gangal SG, Shilkar PR. *In vivo cytotoxicity of Bryonia laciniosa (Linn.) Naud on human cancer cell lines*. Indian Journal of Natural Products and Resources, 2 (3): 322-329 (2011).
- Moreno AJM, Serafim TL, Oliveira PJ, Madeira VMC. *Inhibition of mitochondrial bioenergetics by carbaryl is only evident for higher concentrations – Relevance for carbaryl toxicity mechanisms*. Chemosphere, 66: 404-411(2007).
- Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement J-P. *Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation*. FEBS Letters, 495:131-136 (2001).
- Murakoshi M, Nishino H, Satomi Y, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, Iwashima A, Okuzumi J, Okabe H, Kitano H, Iwasaki R. *Potent preventive action of α -carotene against carcinogenesis: spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by α -carotene than by β -carotene*. Cancer Research, 52: 6583-6587 (1992).
- Nassr-Allah AA, Aboul-Enein AM, Aboul-Enein KM, Lightfoot DA, Alan Cocchetto A, El-Shemy HA. *Anti-cancer and anti-oxidant activity of some Egyptian medicinal plants*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(10): 799-808 (2009).
- Neidle S. *Cancer drug design and discovery*, Elsevier, London, 435 pages (2008).
- Neto CC, Amoroso WJ, Liberty AM. *Review: Anticancer activities of cranberry phytochemicals: An update*. Molecular Nutrition and Food Research, 52: 1-10 (2008).
- Ngoumfo RM, Jouda JB, Mouafo FT, Komguem J, Mbazona CD, Shiao TC, Choudhary MI, Laatsch H, Legault J, Pichette A, Roy R. *In vitro cytotoxic activity of isolated acridones alkaloids from Zanthoxylum leprieurii Guill. et Perr.* Bioorganic and Medicinal Chemistry, 18 : 3601-3605 (2010).
- Noudjou F, Kouninki H, Hance T, Haubruge E, Ngamo LST, Maponmestsem PM, Ngassoum M, Malaisse F, Marlier M, Lognay G. *Composition of Xylopiya aethiopica (Dunal) A. Rich essential oils from Cameroon and identification of a minor diterpene: ent-13-epi manoyl oxide*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 11 (3): 193-199 (2007).
- Nwozo SO, Orojobi BF, Adaramoye OA. *Hypolipidemic and antioxidant potentials of Xylopiya aethiopica seed extract in hypercholesterolemic rats*. Journal of Medicinal food, 14 (1/2): 114-119 (2011).
- Ogbe FMD, Eruogun OL, Uwagboe M. *Plants used for female reproductive health care in*

- Oredo local government area, Nigeria*. Scientific Research and Essay, 4 (3): 120-130, (2009).
- Ogwal-Okeng JW, Obua C, Anokbonggo WW. *Acute toxicity effects of the methanolic extract of Fagara zanthoxyloides (Lam.) root-bark*. African Health Sciences, 3 (3): 124-126 (2003).
- Oliveira AP, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz PLF, Lopes C. *Chemical carcinogenesis*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 79(4): 593-616 (2007).
- OMS . *Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002 – 2005*, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, (2002).
- OMS. *Statistiques sanitaires mondiales*, OMS, Genève; 119 pages (2008).
- OMS. *Le cancer*, Aide-mémoire N°297, OMS, Genève (2009).
- OMS. *Médecine traditionnelle*, Aide-mémoire N°134, OMS, Genève (2012).
- Op de Beck P, Cartier G, David B, Dijoux-Franca MG, Mariotte AM. *Antioxidant flavonoids and phenolic acids from leaves of Leea guineense G Don (Leeaceae)*. Phytotherapy Research, 17(4): 345-347 (2003).
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0* (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>) 5 pages, (2009).
- Pandey G, Madhuri S. *Some medicinal plants as natural anticancer agents*. Pharmacognosy Reviews, 3:259-63 (2009).
- Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. *Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay*. Journal of Immunological Methods, 208:151-158 (1997).
- Park MT, Lee SJ. *Cell Cycle and Cancer*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 36 (1): 60-65 (2003).
- Pereira GC, Branco AF, Matos JAC, Pereira SL, Parke D, Perkins EL, SerafimTL, Sardao VA, Santos MS, Moreno AJM, Holy J, Oliveira PJ. *Mitochondrially targeted effects of berberine [Natural Yellow 18, 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo(g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a) quinolizinium] on K1735-M2 mouse melanoma cells: comparison with direct effects on isolated mitochondrial fractions*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 323(2): 636-649 (2007).

- Pereira C V, Moreira AC, Pereira SP, Machado NG, Carvalho FS, Sardão VA, Oliveira PJ. *Investigating drug-induced mitochondrial toxicity: a biosensor to increase drug safety?* Current Drug Safety, 4(1): 34-54 (2009).
- Pieme CA, Dzoyem JP, Kechia FA, Etoa FX, Penlap V. *In vitro antimicrobial activity of extracts from some Cameroonian medicinal plants.* Journal of Biological Sciences, 1-6 (2008a).
- Pieme CA, Penlap VN, Nkegoum B, Taziebou CL, Ngogang J. *In vivo antioxidant and potential antitumor activity extract of Leea guineensis royen ex. L. (leeaceae) on carcinomatous cells.* Pharmacologyonline, 1: 538-547 (2008b).
- Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MTP, Barbosa NR. *Antioxidant and cytotoxic activities of Centella asiatica (L) Urb.* International Journal of Molecular Science, 10: 3713-3721 (2009).
- Plzak J, Lacina L, Chovanec M, Dvorankova B, Szabo P, Cada Z, Smetana KJ. *Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium derived tumors: an important nw player in the control of tumor biological properties.* Anticancer Research, 30: 455-462 (2010).
- Pousset JL. *Nouveaux médicaments: Savoir discerner le véritable progrès thérapeutique.* Réseau Médicaments et Développement, 26 : 11-13 (2002).
- Prempeh ABA, Mensah-attipoe J. *Analgesic activity of crude aqueous extract of the root bark of Zanthoxylum xanthoxyloides.* Ghana Medical Journal, 42 (2): 79-84 (2008).
- Price AJ, Ndom P, Atenguena E, Nouemssi JPM, Ryder RW. *Cancer care challenges in developing countries.* Cancer, 118:3627-3635 (2012).
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 3396-3402 (2000).
- Rao ASVC, Reddy GS, Babu PP, Reddy AR. *The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran.* BMC Complementary and Alternative Medicine, 10(4): 9 pages (2010).
- Rao J, Xu DR, Zheng FM, Long ZJ, Huang SS, Wu X, Zhou WH, Huang RW, Liu Q. *Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34⁺ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34⁺ acute myeloid leukemia cells.* Journal of Translational Medicine, 9(71): 15 pages (2011).
- Rates SMK. *Plants as source of drugs.* Toxicon, 39: 603-613 (2001).

- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. *Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?* The AAPS Journal, 11 (3): 495-510 (2009).
- Ray RB, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P. *Bitter melon (Momordica charantia) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle, regulatory genes and promotes apoptosis.* Cancer Research, 70(5): 1925-1931 (2010).
- Ruiz Y, Rodríguez J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, Galindo-Castro I. *Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from Espeletia schultzei.* Phytochemistry, 69(2):432-438 (2008).
- Saad N, Esa NM, Ithnin H, Husna N. *Optimization of optimum condition for phytic acid extraction from rice bran.* African Journal of Plant Science, 5 (3): 168-176 (2011).
- Sardao VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. *Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets.* Cell Biology and Toxicology, 25(3): 227-43 (2009).
- Saotome K, Morita H, Umeda M. *Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs.* Toxicology in Vitro, 3: 317-321 (1989).
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. *Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation.* Cellular Physiology and Biochemistry, 11: 173–186 (2001).
- Sayori W. *Cancer preventive effects of vitamin E.* Current Pharmaceutical Biotechnology, 13 (1): 156-164 (2012).
- Schafer KA. *The cell cycle: a review.* Veterinary pathology, 35: 461-478 (1998).
- Sevin C, Girard J. *La chaîne respiratoire et sa génétique.* Médecine thérapeutique/pédiatrie 2(4) :227-234 (1999).
- Sherr CJ. *Cancer Cell Cycles.* Science, 274: 1672-1677 (1996).
- Shirazi FH, Ahmadi N, Kamalinejad M. *Evaluation of northern Iran Mentha pulegium l. cytotoxicity.* DARU, 12 (3): 106-110 (2004).
- Silva AM, Oliveira PJ. *Evaluation of respiration with clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells.* Methods in Molecular Biology, 810: 7-24 (2012).

- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.* Methods in Enzymology, 299: 152-178 (1999).
- Sluysen M. *Application of apoptosis to cancer treatment*, Springer, The Netherlands, 368 pages (2005).
- Solary E. *La mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques Cell death induced by cytotoxic agents.* Bull Cancer, hors série: 61-70 (2006).
- SOMHGY, Service d'Oncologie Médicale de l'Hôpital Général de Yaoundé. *Statistiques du service d'oncologie médicale de l'hôpital général de Yaoundé année 2011*, Yaoundé (2012).
- Soni R, O'Reilly T, Furet P, Muller L, Stephan C, Zumstein-Mecker S, Fretz H, Fabbro D, Chaudhuri B. *Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4.* Journal of the National Cancer Institute, 93(6): 436-446 (2001).
- Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Eisenbrand G, Janzowski C. *Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis.* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 17(12):3372-3380 (2008).
- Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. *Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy.* Trends in Pharmacological Sciences, 24 (3): 139-145 (2003).
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. *Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits.* Journal for Agricultural and Food Chemistry, 50: 7449-7454 (2002).
- Tai J, Cheung S. *Anti-proliferative and antioxidant activities of Saposhnikovia divaricata.* Oncology Reports, 18: 227-234 (2007).
- Tait SWG, Green DR. *Mitochondria and cell signaling.* Journal of Cell Science, 124 (5):807-815 (2012).
- Tatsadjieu LN, Essia Ngang JJ, Ngassoum MB, Etoa F-X. *Antibacterial and antifungal activity of Xylopiya aethiopica, Monodora myristica, Zanthoxylum xanthoxylodes and Zanthoxylum leprieurii from Cameroon.* Fitoterapia, 74: 469-472 (2003).
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9: 231-241 (2008).

- Tchatat M, Ndoye O, Nasi R. *Produits forestiers autres que le bois d'oeuvre (PFAB) : place dans l'aménagement durable des forêts denses humides d'Afrique Centrale*, Série FORAFRI, Document 18 (1999).
- Tchinda AT, Fuendjiep V, Sajjad A, Matchawe C, Wafo P, Khan S, Tane P, Choudhary MI. *Bioactive compounds from the fruits of zanthoxylum leprieurii*. Pharmacologyonline 1: 406-415 (2009).
- Tesoriere L, Butera D, Gentile C, Livrea MA. *Bioactive Components of Caper (Capparis spinosa L.) from Sicily and Antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (21): 8465–8471(2007).
- Thirumaran R, Prendergast GC, Gilman PB. *Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer*. Cancer immunotherapy, Elsevier, 400 pages (2007).
- Tinley TL, Randall-Hlubek DA, Leal RM, Jackson EM, Cessac JW, Quada JC, Hemscheidt TK, Mooberry SL. *Taccalonolides E and A: Plant-derived Steroids with Microtubule-stabilizing Activity*. Cancer research, 63: 3211-3220 (2003).
- Trosko JE. *Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm?* Molecular Carcinogenesis, 30: 131-137 (2001).
- Trosko JE. *The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 36: 43-48 (2003).
- Trox J , Vadivel V , Vetter W, Stuetz W, Kammerer DR, Carle R, Scherbaum V , Gola U, Nohr D , Biesalski HK. *Catechin and epicatechin in testa and their association with bioactive compounds in kernels of cashew nut (Anacardium occidentale L.)*. Food Chemistry, 128: 1094-1099 (2011).
- Ulbricht CE, Chao W. *Phytochemicals in the oncology setting*. Current Treatment options in Oncology, 11:95-106 (2010).
- Vadivel V, Biesalski HK. *Effect of certain indigenous processing methods on the bioactive compounds of ten different wild type legume grains*. Journal of Food Science Technology, 49 (6): 673-684 (2012).
- Vermeulen K, Bockstaele DRV, Berneman ZN. *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Proliferation, 36:131–149 (2003).
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. The New England Journal of Medicine, 347 (16): 1227-1232 (2002).

- Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. *Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie*. Cancer/Radiothérapie, 5: 109-129 (2001).
- Wang CZ, Li XL, Wang QF, Mehendale SR, Yuan CS. *Selective fraction of Scutellaria baicalensis and its chemopreventive effects on MCF-7 human breast cancer cells*. Phytomedicine, 17(1): 63-68 (2010).
- Wang M, Ruan Y, Chen Q, Li S, Wang Q, Cai J. *Curcumin induced HepG2 cell apoptosis-associated mitochondrial membrane potential and intracellular free Ca²⁺ concentration*. European Journal of Pharmacology 650: 41-47 (2011).
- Weinberg RA. *The biology of cancer*, Garland sciences, 796 pages (2007).
- WHO, *World Health Organisation's fight against cancer, stratégies that prevent, cure and care*, WHO, Geneva, 28 Pages (2007).
- Witsch E, Sela M, Yarden Y. *Roles for growth factors in cancer progression*. Physiology (Bethesda) 25(2): 85–101 (2009).
- Wong RSY. *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 30(87): 14 pages (2011).
- Wong WW, Puthalakath H. *Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway*. Iubmb Life, 60(6): 390-397 (2008).
- Woode E, Alagpulinsa DA, Abotsi WKM. *Anti-nociceptive, anxiolytic and anticonvulsant effects of an aqueous leaf extract of Leea guineensis G. Don (Family: Leeaceae)*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(8): 1132-1144 (2011).
- Wright ME, Mayne ST, Stolzenberg-Solomon RZ, Li Z, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. *Development of a comprehensive dietary antioxidant index and application to lung cancer risk in a cohort of male smokers*. American Journal of Epidemiology, 160: 68-76 (2004).
- Wu YL, Jiang XR, Newland AC, Kelsey SM. *Failure to activate cytosolic phospholipase A₂ causes TNF resistance in human leukemic cells*. The Journal of Immunology, 160: 5929-5935 (1998).
- Young IS, Woodside JV. *Antioxidants in health and disease*. Journal of Clinical Pathology, 54, 176-186 (2001).
- Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. *What is the restriction point?* Current Opinion in Cell Biology, 7: 835-42 (1995).

ANNEXES

Images des plantes étudiées



Fagara lepreuri



Fagara xanthozyloides



Leea guineensis



Monodora myristica



Xylopia aethiopica

Activité antiproliférative

- Préparation des extraits
Pour la concentration 25 $\mu\text{g/ml}$
12,5 μl de solution d'extrait stock 10 mg/ml
4987,5 μl de milieu de culture
Les autres doses sont obtenues par dilution en serie.
- Préparation de 1l de PBS 1%, pH 7,4
80g NaCl
6,09g Na_2HPO_4
2g KCl
- Préparation de la sulforhodamine B 0,5%
0,5 g sulforhodamine B (PM : 580,99)
100ml d'une solution 1% acide acétique
- Préparation du Tris 10 mM, pH 10

1,2114 g de tris

1 l d'eau bi-distillée

- Préparation du réactif de Wade

Pour 100 ml de solution :

0,003 g FeCl₃ 6H₂O

0,3 g acide sulfosalicylique

- Préparation du réactif crystal violet

Cristal violet (Sigma): 1 mg/ml

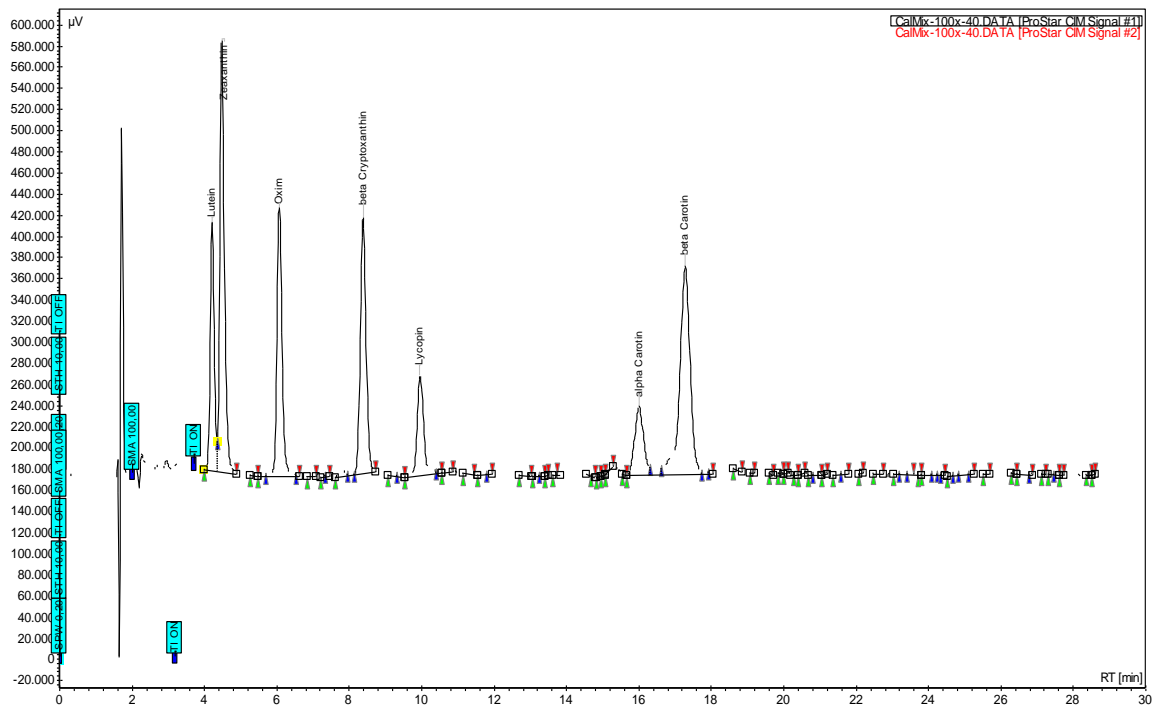
Ethanol : 0,5% (v/v)

Tampon phosphate alcalin (PBS) pH7,4 ; 0,01M qsp : 100 ml

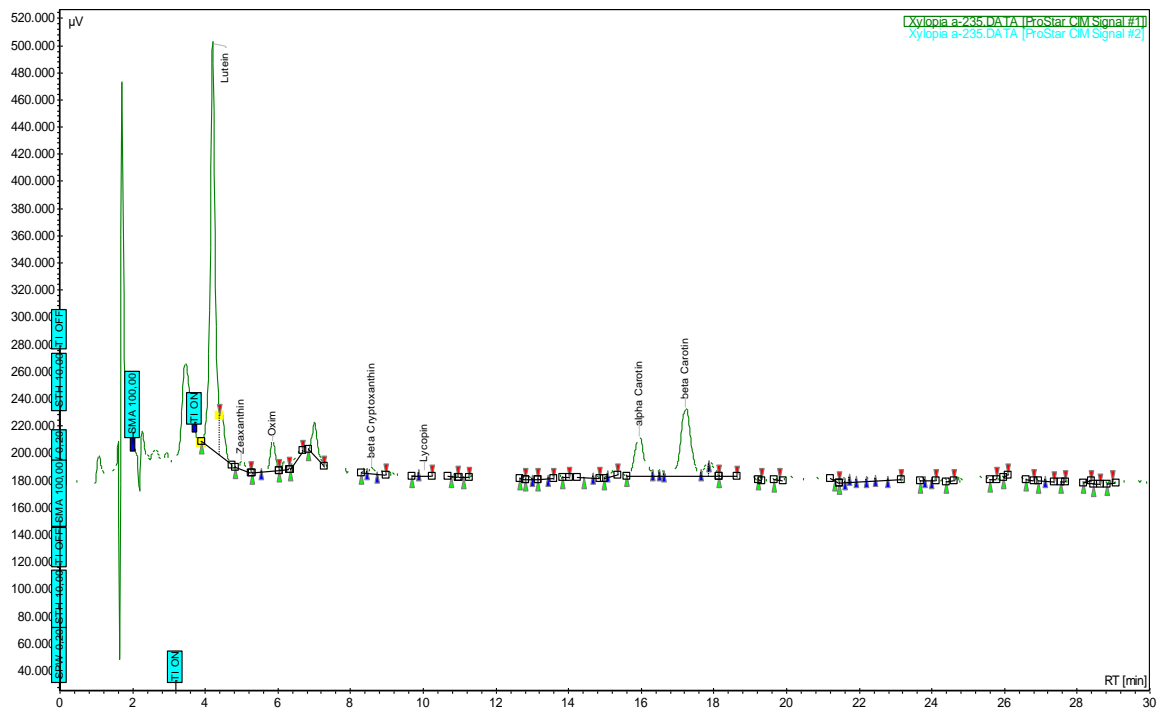
Filtration sur papier filtre

- Caroténoïdes

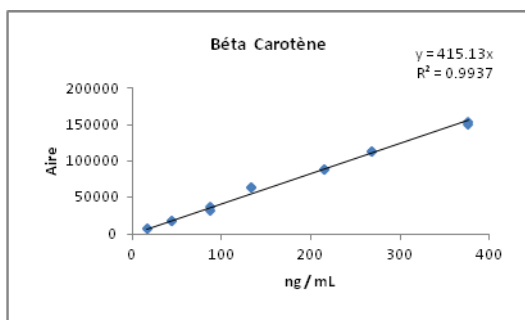
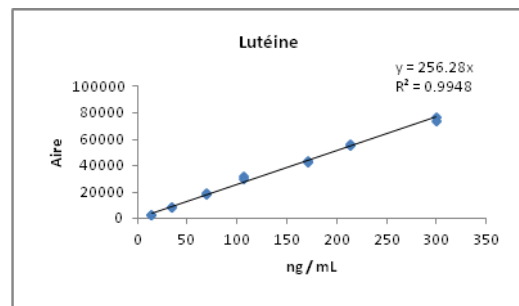
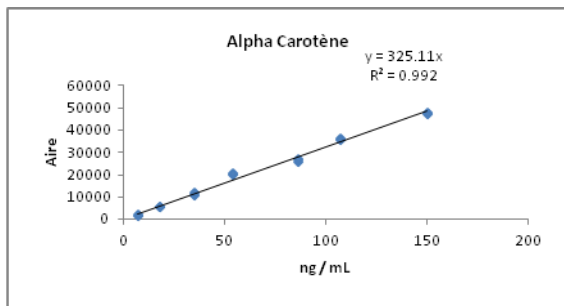
Chromatogramme standard



Chromatogramme de *X. aethiopica*

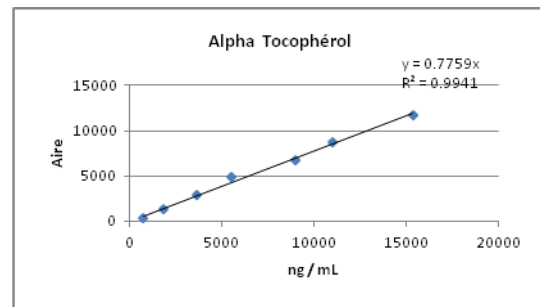
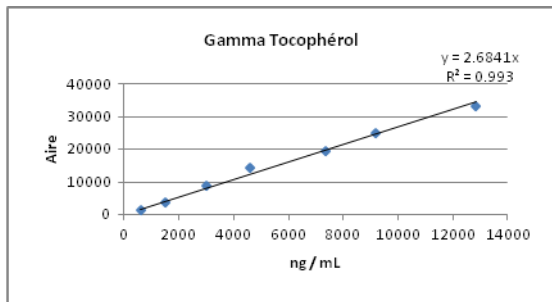


Courbes standards :

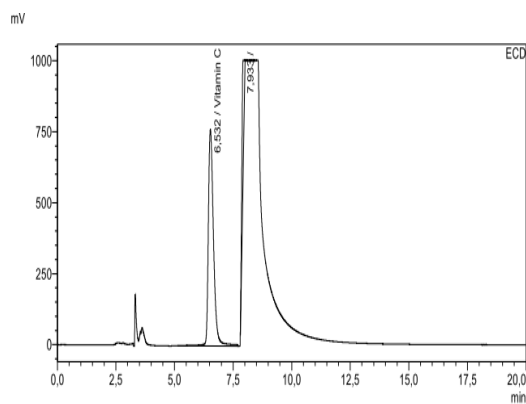


- Tocophérols

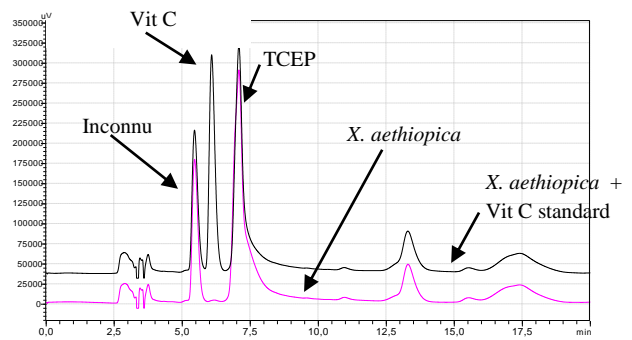
Courbes standards



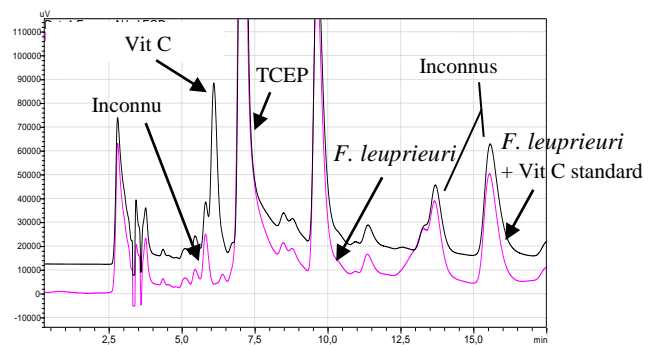
- Vitamine C



Vitamine C standard

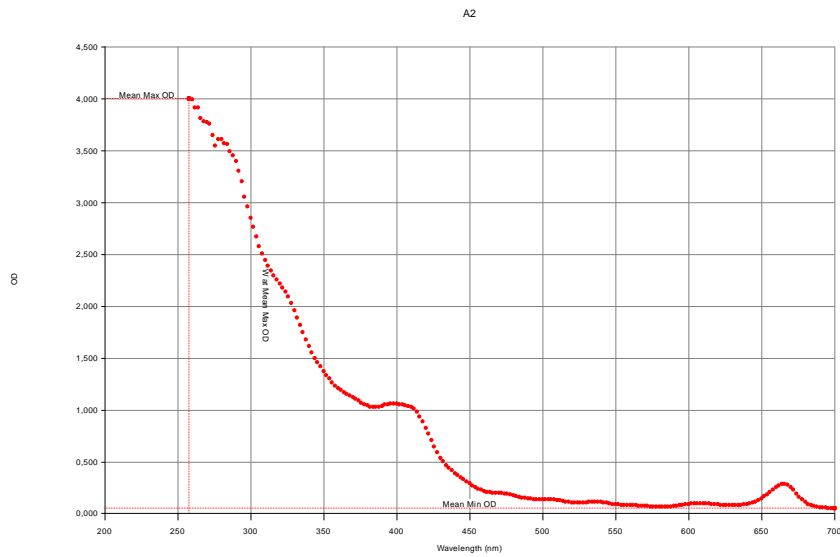


Recherche de la Vitamine C dans l'extrait de *X. aethiopica*

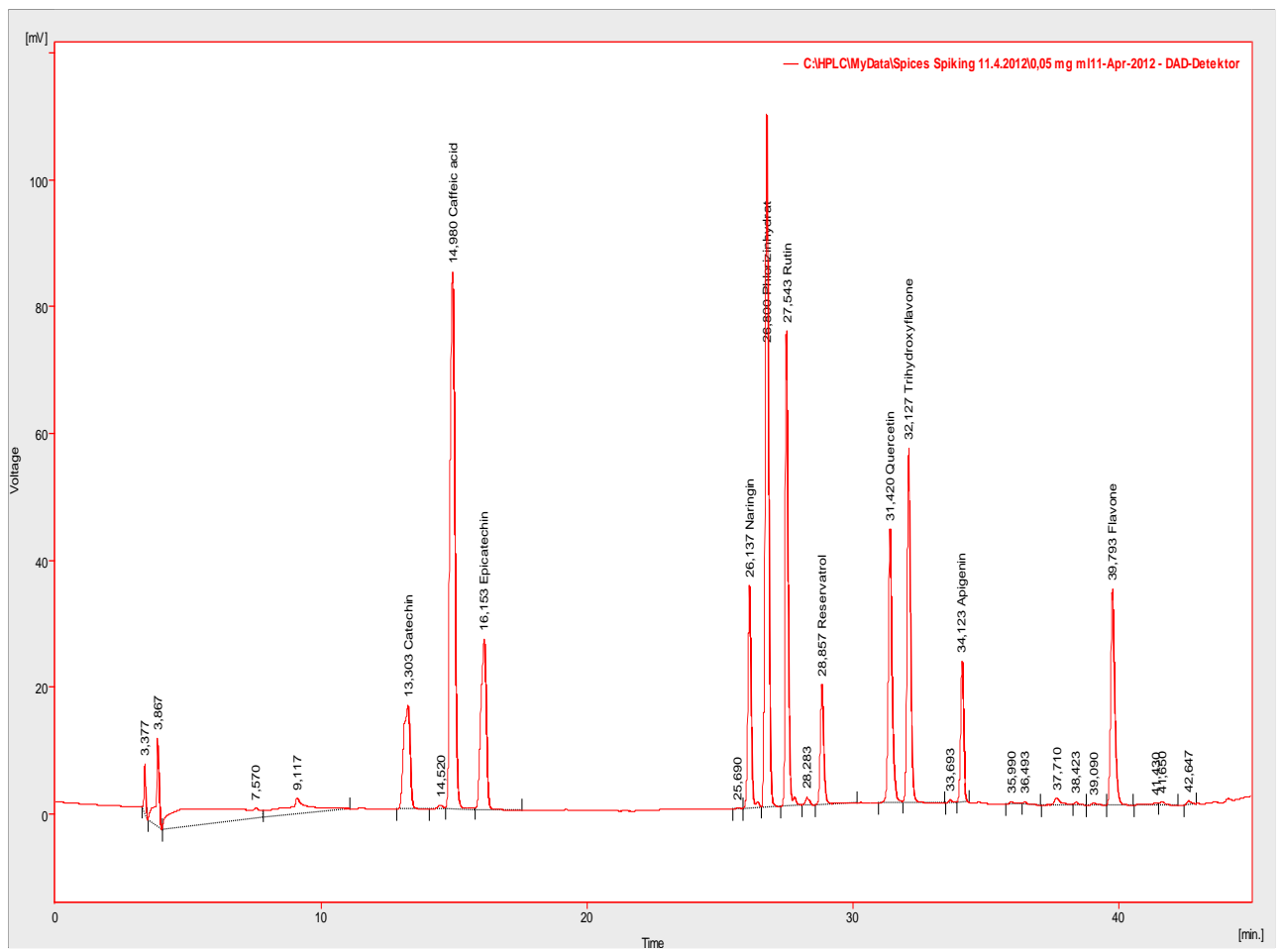


Recherche de la Vitamine C dans l'extrait de *F. leuprieuri*

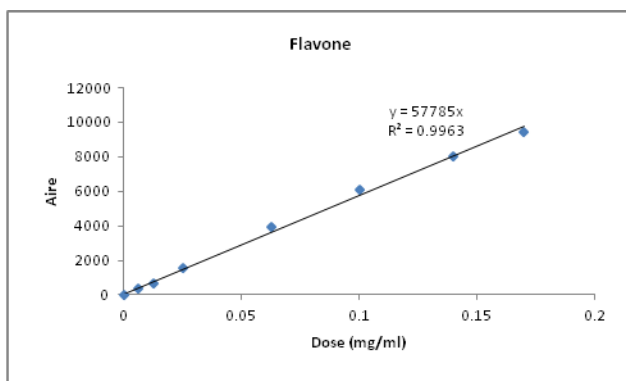
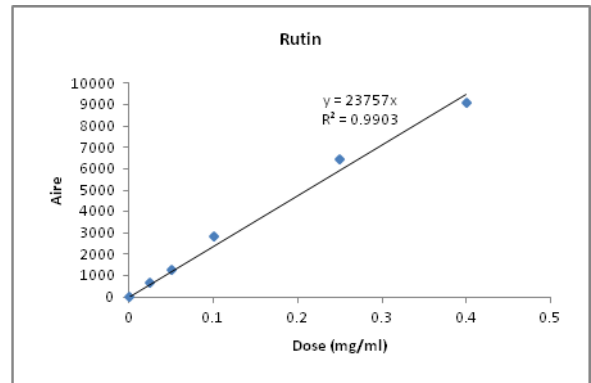
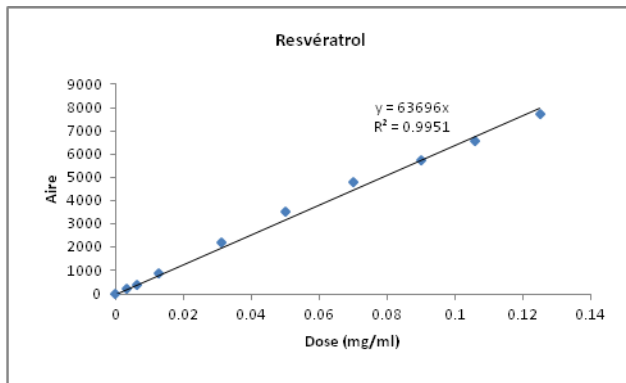
- **Phénols (spectre et courbe standard)**
Spectre



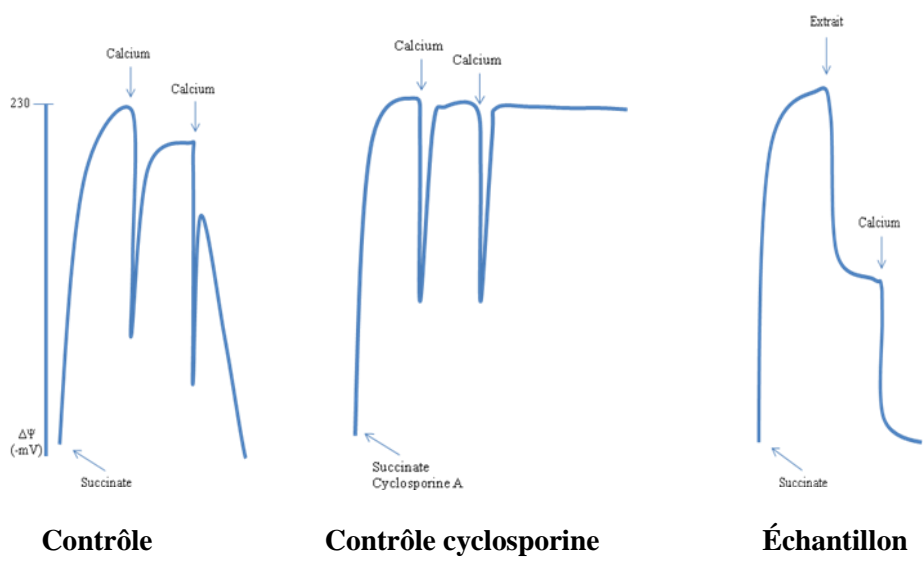
Chromatogramme des phénols standards :



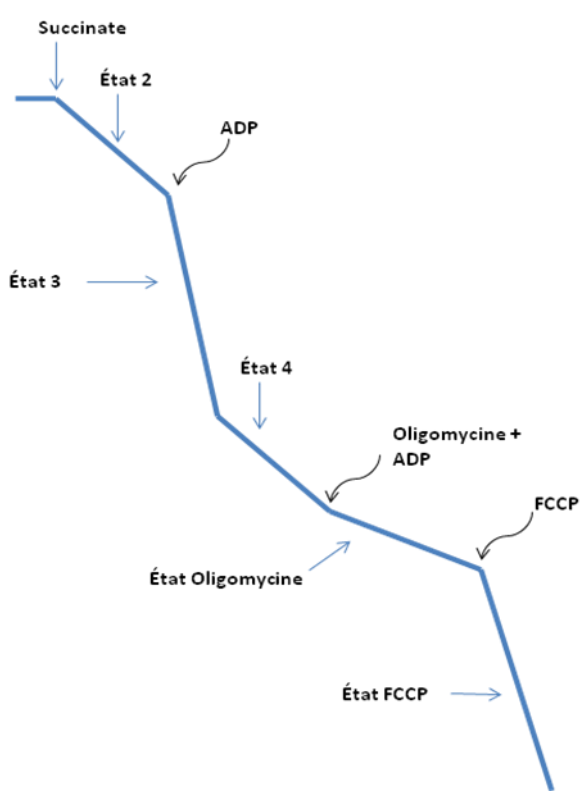
- Courbes standards



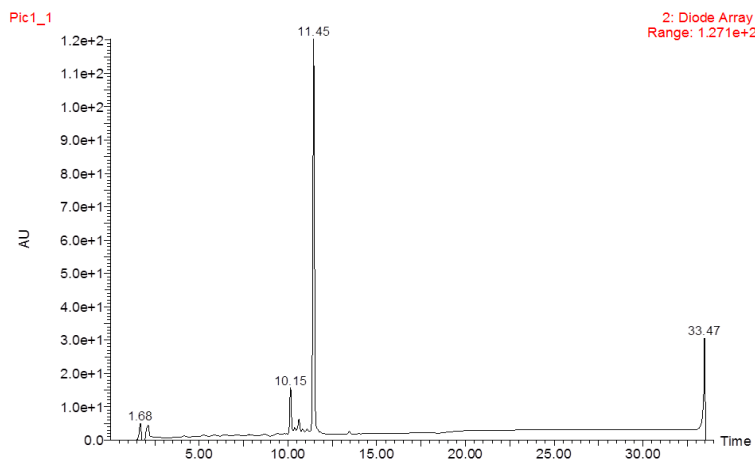
- **Mesure du potentiel membranaire**



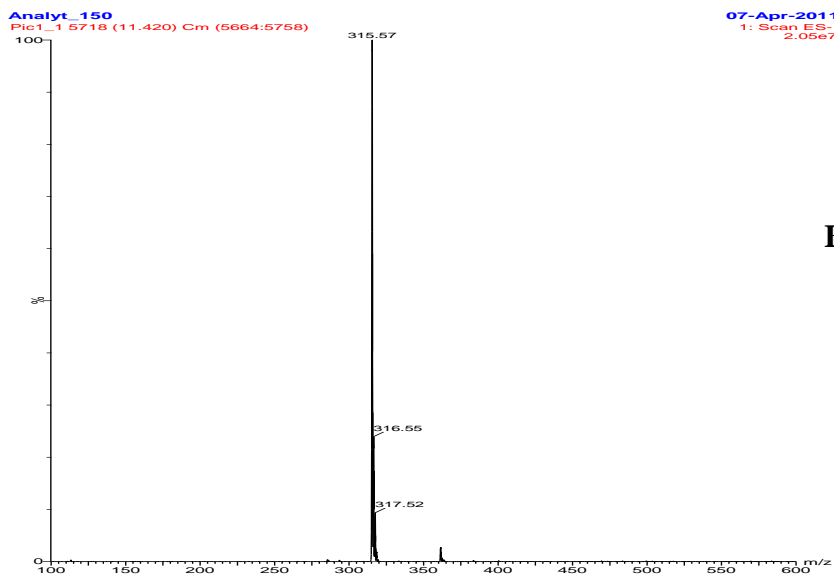
- **Mesure de la consommation d'oxygène**



- Chromatogramme UV et spectre de masse du pic 1



A: Chromatogramme UV du pic 1



B: Spectre de masse du pic 1

Chromatogramme UV et spectre de masse du pic 1

LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE

- **Aphrodite T. Choumessi**, Mathieu Danel, Stefan Chassaing, Isabelle Truchet, Véronique B Penlap, Anatole Constant Pieme, Tazoacha Asonganyi, Bernard Ducommun, Annie Valette. *Characterization of the antiproliferative activity of *Xylopiya aethiopica**, Cell Division, 7:8 (2012).
- **Aphrodite T. Choumessi**, Rute Loureiro, Ana M. Silva, Ana C. Moreira, Anatole C. Pieme, Asonganyi Tazoacha, Paulo J. Oliveira, Véronique B. Penlap. *Toxicity evaluation of some traditional African spices on breast cancer cells and isolated rat hepatic mitochondria*, Food and Chemical Toxicology 50: 4199–4208 (2012).