

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

Faculté des Sciences

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

Faculty of Science

DEPARTMENT OF

BIOCHEMISTRY

Étude des propriétés antioxydantes et anticancéreuses in vitro et in vivo des extraits bruts et fractions de *Syzygium guineense* (Willd.) variété macrocarpum (Myrtaceae)

THESE

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

Par : TANKEU NZUFO Francine

Master en Biochimie

Sous la direction de
NGOGANG YONKEU Jeanne
Professeur Emérite

Année Académique : 2019-2020



REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I
The University of Yaoundé I



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland

FACULTÉ DES SCIENCES
Faculty of Science

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
Department of Biochemistry

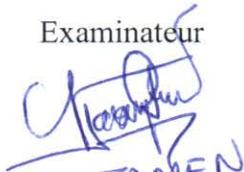
BP: 812, Yaoundé, Cameroun
PO Box 812, Yaoundé, Cameroon

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés **Pr. NJAMEN Dieudonné** et **Pr. PENLAP BENG Véronique** respectivement Examineur et Présidente du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie option Sciences des Aliments et Nutrition, soutenue par Madame **TANKEU NZUFO Francine** (Matricule **09R1321**) le 16 Juin 2020 à 14 heures dans la Salle E206 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : « Étude des propriétés antioxydantes et anticancéreuses in vitro et in vivo des extraits bruts et fractions de *Syzygium guineense* (willd.) variété *macrocarpum* (Myrtaceae) », attestons que la Candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

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

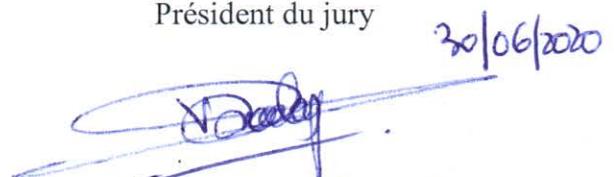
Examineur


D. NJAMEN

Le Chef de Département



Président du jury


20/06/2020
Véronique N. Penlap Beng
Professor

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

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 15 Janvier 2020

ADMINISTRATION

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

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

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

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

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

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

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)
--

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste

20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
26	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
27	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

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

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ ,Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Departement</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancelor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste

25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOLOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGFACK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
19	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
22	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
23	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

24	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
25	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
26	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
32	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
13	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
14	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
24	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
25	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
26	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
27	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
---	---------------------	------------	---------------------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste

5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
---	-------------------------	------------	----------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistante	En poste

14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (42)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
6	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
7	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
8	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
9	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
10	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
11	WOAFO Paul	Professeur	En poste

12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HER VAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste

34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	<i>En poste</i>
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

40	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
41	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
42	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / Uds</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste

36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

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

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

Soit un total de **345 (70)** dont :

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

() = Nombre de Femmes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	xi
DEDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
LISTE DES FIGURES	xx
LISTE DES TABLEAUX	xxiv
LISTE DES ABREVIATIONS	xxvi
RESUME	xxix
SUMMARY	xxxii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	4
I. Généralités sur le cancer	5
I.1. Définition.....	5
I.2. Epidémiologie du cancer	5
I.2.1. Epidémiologie du cancer du sein	5
I.2.2. Epidémiologie du cancer du col de l’utérus.....	6
I.2.3. Epidémiologie des leucémies.....	6
I.3. Physiopathologie du cancer	6
I.3.1. Physiopathologie du cancer du sein	7
I.3.1.1. Facteurs de risque.....	7
I.3.2. Physiopathologie du cancer du col de l’utérus.....	9
I.3.2.1 Facteurs de risque du cancer du col de l’utérus	9
I.3.3. Physiopathologie des leucémies.....	12
I.3.3.1. Facteurs de risque des leucémies myéloïdes aiguës.....	13
I.3.3.2. Facteurs de risque de la leucémie myéloïde chronique	14
I.4. Prévention du cancer	15
I.5. Traitements conventionnels du cancer	16
I.5.1. Chirurgie	16
I.5.2. Radiothérapie	17
I.5.3. Traitements médicamenteux	18

I.5.3.1. Chimiothérapie	18
I.5.3.2. Traitements ciblés.....	19
I.5.4. Chimiothérapie anticancéreuse et échec thérapeutique : causes et mécanismes	21
I.6. Plantes médicinales et développement des médicaments anticancéreux : état des lieux	23
I.6.1. Premières molécules anti cancéreuses obtenues des plantes	23
I.6.2. Molécules anticancéreuses actuelles d'intérêt issues des plantes	24
II. Généralités sur le stress oxydatif	25
II.1. Définition et origine du stress oxydatif.....	25
II.2. Les radicaux libres	25
II.2.1. Les types de réactions radicalaires.....	26
II.2.1.1 Les réactions d'abstractions d'atomes.....	26
II.2.1.2 Les réactions d'additions de radicaux libres.....	26
II.2.1.3. Les réactions de transferts d'électrons.....	27
II.2.2. Les différentes espèces réactives de l'oxygène	27
II.2.2.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	27
II.2.2.2. Le peroxyde d'hydrogène	28
II.2.2.3. Le radical hydroxyle ($\cdot OH$).....	28
II.2.2.4. Le monoxyde d'azote et le dioxyde d'azote	29
II.2.2.5. L'anion peroxydinitrite ($OONO^{\cdot-}$)	29
II.2.2.6. Les radicaux peroxydes et alcoxydes.....	29
III. Plantes médicinales et propriétés anti-oxydantes et anticancéreuses	30
III.1. Propriétés anti-oxydantes des plantes médicinales.....	30
III.1.1. Mode d'action antioxydant des plantes médicinales	30
III.1.1.1 Action anti-oxydante des plantes médicinales par piégeage des radicaux libres	30
III.1.1.2. Action anti-oxydante des plantes médicinales par chélation des métaux lourds	31
III.1.1.3 Action anti-oxydante des plantes médicinales par inhibition des enzymes génératrices de radicaux libres	31
III.1.1.4 Action anti-oxydante des plantes médicinales par induction de la biosynthèse d'enzymes anti-oxydantes.....	32
III.1.1.2. Méthodes d'évaluation in vitro de la capacité anti-oxydante des plantes médicinales	32
III.2. Propriétés anticancéreuses des plantes médicinales	34

III.2.1. Mécanisme d'action anticancéreux des extraits de plantes.....	34
III.2.1.1. L'arrêt du cycle cellulaire par les extraits de plantes.....	36
III.2.1.2. Induction de l'apoptose	38
III.2.2. Méthodes d'évaluation des propriétés antiprolifératives des plantes médicinales <i>in vitro</i>	39
III.2.2.1 Méthodes simples	39
III.2.2.2 Méthodes indirectes	40
III.2.3. Méthodes d'évaluation des propriétés anticancéreuses des plantes médicinales <i>in vivo</i>	42
III.2.3.1. Modèles animaux utilisés pour l'évaluation des propriétés anticancéreuses <i>in vivo</i>	42
III.2.3.1.1. Souris immunocompétentes.....	43
III.2.3.1.2. Souris immunodéprimées	43
III.2.3.2. Différents types de modèles tumoraux.....	45
IV. <i>Syzygium guineense</i> (Willd). DC var. <i>macrocarpum</i> (Engl.) F.White (<i>Myrtaceae</i>), plante médicinale au potentiel anticancéreux	47
IV.1. Systématique (Crêtée, 1965).....	47
IV.2. Origine, distribution géographique et écologie.....	48
IV.3. Description	48
IV.4. Usages en médecine traditionnelle Africaine.....	48
IV.5. Autres usages	49
IV.6. Propriétés biologiques et composition phytochimique de <i>S. guineense</i>	49
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	51
II.1. Matériel.....	52
II.1.1. Matériel végétal	52
II.1.2. Réactifs des tests antioxydants	52
II.1.3. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude <i>in vitro</i>	52
II.1.4. Milieux de culture	53
II.1.5. Réactifs utilisés pour la réalisation des tests anticancéreux	53
II.1.6. Lignée cellulaire et souche de souris utilisées pour l'étude des propriétés anticancéreuses <i>in vivo</i>	54
II.2. Méthodes	55
II.2.1. Organigramme méthodologique	55

II.2. Evaluation des propriétés anti-oxydantes et profil phytochimique des extraits de plantes.....	57
II.2.1. Préparation des extraits bruts.....	57
II.2.2. Détermination de l'activité anti-oxydante des extraits bruts.....	58
II.2.2.1. Détermination de l'activité piégeuse du radical DPPH.....	58
II.2.2.2. Détermination de l'activité piégeuse du radical (2,2'-azino-bis- [3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) (ABTS ⁺).....	58
II.2.2.3 Détermination de la capacité anti-oxydante par la méthode du phosphomolybdate.....	60
II.2.2.4. Détermination de la Capacité antioxydante totale par la méthode du Ferric Reducing Antioxidant Power assay (FRAP).....	60
II.2.3. Composition phytochimique des extraits bruts.....	61
II.2.3.1. Teneur en phénols totaux.....	61
II.2.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	62
II.2.3.3. Détermination de la teneur en flavonols.....	62
II.2.4. Détermination du profil polyphénolique des extraits bruts par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....	62
II.3. Evaluation des propriétés anticancéreuses des extraits bruts.....	63
II.3.1. Maintien et expansion des cellules.....	63
II.4. Etude des propriétés antiprolifératives <i>in vitro</i> des extraits bruts.....	64
II.5. Fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles.....	66
II.6. Evaluation des propriétés antiprolifératives <i>in vitro</i> des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles.....	67
II.7. Etude du mécanisme d'action antiprolifératif et cytotoxique des fractions L ₄ et L ₅ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles.....	67
II.7.1. Analyse du cycle cellulaire et du contenu d'ADN.....	68
II.7.1. 1. Principe de la cytométrie en flux.....	68
II.7.2. Analyse de l'expression des protéines Bax et Bcl-2.....	69
II.7.2.1. Principe du western blot.....	69
II.7.2.2. Procédure expérimentale.....	70
II.8. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).....	73
II.9. Etude des propriétés anticancéreuses <i>in vivo</i> des fractions L ₄ , L ₅ et de l'extrait aqueux d'écorces sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue.....	73
II.9.1. Détermination de la dose maximale tolérée.....	73

II.9.2. Induction de la tumeur et traitement	74
II.10. Analyses statistiques.....	75
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	76
III.1. Etude de l'activité antioxydante et détermination de la composition phytochimique des extraits bruts de <i>S. guineense</i>	77
III.1.1. Rendement d'extraction des extraits bruts de <i>S. guineense</i>	77
III.1.2. Teneur en composés phénoliques des différents extraits bruts.....	77
III.1.3. Activité anti-oxydante des extraits bruts.....	78
III.1.4. Détermination de la composition phytochimique des extraits bruts par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....	82
III.2. Etude des propriétés antiprolifératives des extraits bruts et fractions de <i>S. guineense var. macrocarpum</i>	84
III.2.1 Etude des propriétés antiprolifératives des extraits bruts.....	84
III.2.2. Etude des propriétés antiprolifératives des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i>	96
III.3. Etude du mécanisme d'action antiprolifératif et cytotoxique des fractions L ₄ et L ₅ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles.....	107
III.3.1 Etude des effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire et l'apoptose.....	107
III.3.2. Effets du traitement des cellules leucémiques myéloïde chronique et aigue (K562) et (HL-60) par les fractions L ₄ et L ₅ sur le niveau d'expression des protéines pro apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2	123
IV. Détermination de la composition phytochimique des fractions L ₄ et L ₅ par Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (CPG/SM)	126
V. Etude de l'activité anticancéreuse <i>in vivo</i> des fractions L ₄ , L ₅ et de l'extrait brut aqueux d'écorces sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue.....	129
V.1. Détermination de la dose maximale tolérée	129
V.2. Etude de l'activité anticancéreuse <i>in vivo</i> des fractions L ₄ , L ₅ et de l'extrait brut aqueux d'écorces sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue	132
CONCLUSION GENERALE	148
PERSPECTIVES.....	148
REFERENCES	150
ANNEXES.....	167
ARTICLES PUBLIES.....	XV



DEDICACE

Je dédie cette thèse

A DIEU ETERNEL

A mes parents.

A mon fils Yohan Mathis

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette Thèse n'aurait été possible sans la collaboration et le soutien indéfectible de nombreuses personnes et institutions, que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier.

Ma profonde gratitude va d'abord à l'endroit de mon Superviseur de Thèse, le Professeur **Jeanne NGOGANG YONKEU** qui a accepté de m'encadrer et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je la remercie pour sa disponibilité et son encouragement durant toute la période de la réalisation de cette thèse.

Mes remerciements vont à l'endroit de mon Directeur de thèse le Professeur **PIEME Constant Anatole** merci d'avoir initié et dirigé ce travail avec toute la rigueur scientifique qui est la vôtre, d'avoir cultivé en moi la recherche permanente de l'excellence. Vous êtes pour moi un modèle tant sur le plan humain que professionnel.

Je remercie également le Professeur **Paul MOUNDIPA FEWOU**, Chef de Département de Biochimie et l'ensemble des enseignants dudit Département pour la formation reçue, ainsi que les suggestions constructives lors des séminaires doctoraux.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma plus sincère reconnaissance au Professeur **Shubhada CHIPLUNKAR**, et au **Dr Jyoti KODE** pour m'avoir accepté et accueilli dans leurs laboratoires respectifs au sein du Centre de Recherche Avancé de Traitement, de Recherche et d'Education sur le Cancer (Inde). Je ne saurais m'abstenir de souligner le bénéfice tiré de cette fructueuse collaboration et les dispositions particulières prises pour me permettre de réaliser ce travail.

Ma reconnaissance va également à l'endroit du Professeur **Bruno LENTA** du Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure, pour m'avoir accueilli et intégré au sein de son Laboratoire ; pour le soutien matériel et l'expertise que vous apportés pour la réalisation du fractionnement des extraits

J'exprime aussi une reconnaissance particulière :

A mesdames **Trupti PRADHAN** et **Sharmal VETALE** du Département d'Immunologie du Centre de Recherche Avancé sur le Traitement, la Recherche et l'Education

sur le Cancer (Inde) pour nos multiples échanges relatifs à la culture cellulaire et la cytométrie de Flux.

Au **Pr. Marco BRAVI** et **Pr. Marco STOLLER**, ainsi qu'à leur équipe pour leur contribution à la réalisation de l'analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance des extraits bruts.

Au Pr AMA-MOOR Vicky Jocélyne, qui m'a accordée son assistance à chaque étape de ce travail. Trouvez ici Pr, le témoignage de ma profonde gratitude.

Au Pr BIAPA Prosper qui a assuré l'analyse statistique de toutes les données obtenues lors de notre travail.

Au **Dr. Jacques Romain NJIMOU**, pour son aide précieuse dans l'analyse des chromatogrammes de la chromatographie Liquide Haute Performance et leur interprétation.

A mes amies **Alvine, Doriane et Jacky** : je ne trouverais jamais les mots pour vous exprimer ma gratitude pour tout ce que vous avez fait et été pour moi pendant ces longues années. Avec vous, j'ai pu expérimenter ces paroles selon lesquelles « Qui trouve un ami a trouvé le bonheur »

A mes aînés et camarades de Laboratoire, le **Dr MOUKETTE MOUKETTE Bruno, Mme NANFACK Pauline, M. NJAFOUA Marcel, et TCHOULA MAMIAFO Corinne**, pour votre aide, votre simplicité, votre apport dans ma formation et dans l'élaboration de ce document. Trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Au niveau institutionnel, je tiens à rendre un très grand hommage au **Gouvernement Indien**, pour avoir trouvé un intérêt à ce travail et jugé nécessaire de le financer sous la mobilité doctorale NAM S&T Research Training Fellowship for Developing Countries Scientists (RTF-DCS) 2017. J'exprime ma profonde reconnaissance au Centre Avancé de Recherche, de Traitement et d'Education sur le Cancer qui m'a accepté au sein des **laboratoires d'Immunologie** et de **Screening des molécules anticancéreuses**, cadre m'ayant été adéquat et très agréable pour la réalisation de la majeure partie de ce travail.

J'exprime en outre ma profonde gratitude à l'Equipe des chimistes du *Dr. P.S. Ramanathan Advanced Instrumentation Centre Ramnarain Ruia College*, de Mumbai pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des fractions actives.

Je remercie grandement **les membres du jury** de cette thèse pour leur disponibilité et critiques qui permettront d'améliorer ce travail

Je pense également :

A Meena, Naini, Sachin, Shalini, Disha et Shruti, qui par leur simplicité et leur accueil chaleureux ont fait de mon séjour en Inde une expérience humaine inoubliable.

A mes sœurs **Nadine DONGMO** Epse **SIMO**, **Edith TAMBOUA** Epse **TANKEU**, **Carole MANFOUO** Epse **NGATCHA**, et **Yollande MELI** vous avez su combler par votre amour le vide immense laissé par maman et je me réjouis chaque jour de vous avoir à mes côtés.

A Aurel mon frère cadet, plus qu'un frère tu es un ami et une bénédiction pour moi. Je ne trouve pas les mots pour te dire ce que tu as été pour moi dans la réalisation de cette thèse. Trouve dans ce silence toute mon estime et ma reconnaissance.

A l'Abbé TALLA Chrétien pour son réconfort dans la douloureuse épreuve de la disparition de ma mère, son soutien spirituel et moral durant ces longues années. Reçois ici toute ma reconnaissance.

Au **couple DOUANLA**, vous avez été pour moi cette famille d'où je suis partie depuis l'obtention de ma licence. Laure tu as été cette mère que je n'ai plus depuis aujourd'hui 6 ans. Merci pour le soutien que tu m'as apporté sur tous les plans.

A mes neveux et nièces, **Abi-Katel, Katia, Manuella, Kayla, Ashley, Lena, Rayelle, Nathan et Grace-divine** ; sans le savoir peut-être vous avez une force inestimable au travers de la joie que vous m'apportiez chaque jour. Trouvez ici ma gratitude.

A toute ma famille, tous ceux qui de prêt ou de loin ont contribué à l'édification de cette œuvre, soyez remerciés.

A Stève mon époux : pour ta tendresse qui a su sécher chaque fois mes larmes, tes encouragements quand j'étais au plus bas de la forme ; ta simplicité et ton expertise mise à contribution pour l'élaboration de ce document. Tu es pour moi un ami et un modèle de patience.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Formation de chromosome hybride BCR-ABL par translocation réciproque entre les bras des chromosomes 9 et 22.....	15
Figure 2 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique.....	20
Figure 3 : Mécanisme d'action de l'hormonothérapie dans le traitement du cancer du sein.	21
Figure 4: Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk-cyclines.	35
Figure 5: Assemblage de l'apoptosome.....	37
Figure 6: Interconnexion entre les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèqueL'induction de l'apoptose par les extraits de plantes.....	38
Figure 7: Equation de réduction du MTT par les déshydrogénases	40
Figure 8: Réaction de réduction de la résazurine.	41
Figure 9: Partie aérienne de <i>S. guineense</i>	47
Figure 10: Organigramme récapitulatif de la méthodologie expérimental.....	56
Figure 11: Procédure schématique de préparation des extraits bruts	57
Figure 12 : Principe de la réaction de l'ABTS avec les molécules antioxydantes.....	59
Figure 13: Equation de réduction du complexe ferrocyanure ferrique en ferrocyanure ferreux par un antioxydant AH.....	61
Figure 14: Dispositif expérimental de la chromatographie sous vide	66
Figure 12: Protocole de fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles	67
Figure 16: Dispositif utilisé pour le western blot	72
Figure 17: Capacité anti-oxydante totale des extraits bruts de <i>S. guineense</i> par la méthode du FRAP	81
Figure 18: Capacité anti-oxydante totale des extraits bruts de <i>S. guineense</i> par la méthode du phosphomolybdate.....	81
Figure 19 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les lymphocytes B.....	85
Figure 20 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules du cancer du sein (MCF7)	86
Figure 21 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules du cancer du sein (MDA-MB231)	87

Figure 22 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules humaines du cancer col de l'utérus (SiHa) ;	90
Figure 23 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules du cancer col de l'utérus (HeLa)	90
Figure 24 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules de leucémie myéloïde chronique humaine (K562).	93
Figure 25 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules de leucémie myéloïde aigue humaine (HL-60)	94
Figure 26 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les lymphocytes B	97
Figure 27 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les cellules humaines du cancer du sein (MCF7)	98
Figure 28 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les cellules humaines du cancer du sein (MDA-MB231)	100
Figure 29 : Effets des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules humaines du cancer du col de l'utérus (SiHa)	101
Figure 31 : Effets des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules humaines de leucémie myéloïde chronique (K562)	104
Figure 32 : Effets des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur la croissance des cellules humaines de leucémie myéloïde aigue (HL-60)	106
Figure 33 : Effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée du cancer du sein (MCF7)	108
Figure 34 : Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules du cancer du sein (MCF7) par les fractions L ₄ et L ₅ .	109
Figure 35 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du sein (MCF7) par les fractions L ₄ et L ₅ A : fraction L ₄ ; B : fraction L ₅	110
Figure 36 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du sein (MDA-MB 231) par les fractions L ₄ et L ₅ ;	111
Figure 37 : Effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire des cellules du cancer du sein (MDA-MB231).	112
Figure 38 : Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules de la lignée du cancer du sein (MDA-MB231) par les fractions L ₄ et L ₅ .	113
Figure 39 : Effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée du cancer du col de l'utérus (SiHa)	113

Figure 40: Effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire des cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa).	114
Figure 41: Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa) par les fractions L ₄ et L ₅ .	115
Figure 42: Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa) par les fractions L ₄ et L ₅ .	115
Figure 43 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa) par les fractions L ₄ et L ₅ .	116
Figure 44 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa) par les fractions L ₄ et L ₅ ;	117
Figure 45 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules de leucémie myéloïde chronique K562 par les fractions L ₄ et L ₅ .	118
Figure 46: Effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée de leucémie myéloïde chronique (K562).	119
Figure 47 : Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules de leucémie myéloïde chronique (K562) par les fractions L ₄ et L ₅ .	120
Figure 48 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules de la lignée leucémique myéloïde aigue (HL-60) par les fractions L ₄ et L ₅ ;	121
Figure 49 : Effets des fractions L ₄ et L ₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée de leucémie myéloïde aigue (HL-60).	122
Figure 50: Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules de leucémie myéloïde aigue (HL-60) par les fractions L ₄ et L ₅ .	123
Figure 51 : Bandes protéiques obtenues après révélation des membranes de western blot des cellules de la lignée leucémique myéloïde chronique (K562)	124
Figure 52 : Profil d'expression des protéines pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2 après traitement des cellules de Leucémie myéloïde chronique (K562) par les fractions L ₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) et L ₅	125
Figure 53 : Bandes protéiques obtenues après révélation des membranes de western blot des cellules de leucémie myéloïde aigue (HL-60).	126
Figure 54 : Profil d'expression des protéines pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2 après traitement des cellules de Leucémie myéloïde aigue (HL-60) par les fractions L ₄ et L ₅	126
Figure 55 : Evolution du volume de la tumeur dans chaque groupe	133
Figure 56 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps dans le groupe contrôle.	134
Figure 57: Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps dans le groupe traité à l'Adriamycine.	134

Figure 58 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps après traitement par la fraction L4	135
Figure 59 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps après traitement par la fraction L ₅	136
Figure 60 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps dans le groupe traité à l'extrait aqueux d'écorces (B2) à la dose 200mg/kg d poids corporel.....	136
Figure 61 : Evolution du poids corporel en fonction du temps de traitement.....	137
Figure 62 : Rapport Test / Contrôle en fonction du temps de traitement	138
Figure 63 : Courbe de survie de Kaplan Meir en fonction du temps.....	138
Figure 64 : Photographies des tumeurs au jour 31 de l'étude dans chaque groupe	139
Figure 65 : Volume relatif de la tumeur au Jour 31 de l'étude.	139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Dosage des protéines par la méthode de Bradford	71
Tableau II: Rendements d'extraction des extraits bruts de <i>S. guineense</i>	77
Tableau III: Teneur en composés phénoliques des extraits bruts de <i>S. guineense</i>	77
Tableau IV: Pourcentage de piégeage du radical DPPH par les extraits bruts de feuilles de <i>S. guineense</i>	78
Tableau V: Pourcentage de piégeage du radical ABTS+ par les extraits bruts de feuilles de <i>S. guineense</i>	79
Tableau VI: Pouvoir antioxydant des extraits bruts de <i>S. guineense</i> vis-à-vis des radicaux DPPH et ABTS ⁺	80
Tableau VII: Composition en composés phénoliques des extraits bruts par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	83
Tableau VIII: Valeurs des GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de <i>S. guineense</i> sur les cellules du cancer du sein MCF7.....	88
Tableau IX: Valeurs des GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de <i>S. guineense</i> vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du sein MDA-MB231...	89
Tableau X: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de <i>S. guineense</i> vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du col de l'utérus (SiHa)	91
Tableau XI: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de <i>S. guineense</i> sur les cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa).....	92
Tableau XII: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de <i>S. guineense</i> sur les cellules de leucémie chronique humaine (K562)	93
Tableau XIII: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de <i>S. guineense</i> sur les cellules de leucémie humaine chronique (HL-60).....	95
Tableau XIV: Masse des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i>	96
Tableau XV: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du sein (MCF7).....	99
Tableau XVI: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du sein (MDA-MB231).....	101
Tableau XVII : Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa) ...	103

Tableau XVIII: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa) ..	103
Tableau XIX: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les cellules de leucémie myéloïde chronique humaine (K562)	105
Tableau XX: Valeurs de GI ₅₀ , TGI et LC ₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>S. guineense</i> sur les cellules de leucémie myéloïde aigue humaine (HL-60).....	106
Tableau XXI: Teneur en protéines totales des lysats des cellules de la lignée leucémique myéloïde chronique (K562) et aigue (HL-60)après 6H, 12H et 24H de traitement par les fractions L ₄ et L ₅	124
Tableau XXII: Composés majoritaires retrouvés dans la fraction L ₄ : Hexane/acétate d'éthyle (60:40 (v:v) après analyse par CG/SM.....	127
Tableau XXIII : Composés majoritaires retrouvés dans la fraction L ₅ Hexane/acétate d'éthyle (40:60 (v:v) après analyse par CG/SM.....	128
Tableau XXIV : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L ₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) à la dose 300mg/kg de poids corporel.....	129
Tableau XXV : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L ₅ (Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) à la dose 300mg/kg de poids corporel...)	129
Tableau XXVI : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 300mg/kg de poids corporel.....	129
Tableau XXVII : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L ₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) à la dose 600mg/kg de poids corporel.....	130
Tableau XXVIII: Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L ₅ Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) à la dose 600mg/kg de poids corporel.....	130
Tableau XXIX: Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 600mg/kg de poids corporel.....	130
Tableau XXX : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L ₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) à la dose 900mg/kg de poids corporel.....	130
Tableau XXXI : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L ₅ Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) à la dose 900mg/kg de poids corporel.....	131
Tableau XXXII : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 900mg/kg de poids corporel.....	131
Tableau XXXIII : Synthèse des résultats de la détermination de la dose maximale tolérée pour les fractions L ₄ , L ₅ et l'extrait brut aqueux d'écorces (B ₂)	132

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : « *ATP-Binding Cassette* »

ABTS⁺ : « Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) »

ADN : « Acide désoxyribonucléique »

AIF: “*Apoptosis Inducing Factor*”

ARN: “Acide Ribonucléique”

ATP: Adénosine Triphosphate

Bak: “Bcl-2 Antagonist /killer”

Bax: “*Bcl-2 Associated X protein*”

Bcl-2: “*B-cell lymphoma 2*”

Bcl-XL: “B-cell lymphoma extra large”

BCR-ABL: “Breakpoint cluster region –Abelson”

BHT: “Hydroxytoluène butylé”

Bid: “*BH3 interacting Domain Death Agonist*”

BRCA1: “*Breast cancer gene 1*”

BRCA2: “*Breast cancer gene 2*”

CCM : “Chromatographie sur Couche Mince”

CD95 : “*Cluster Differentiation 95*”

Cdc 25: “*Cell division cycle 25*”

CDK: “*Cyclin Dependent Kinase*”

DMEM: “*Dulbecco’s modified Eagle’s medium*”

DMEM: “Dulbeco’s Eagle Modified Medium”

DMSO: “Diméthylsulfoxyde”

DMT : “Dose Maximale Tolérée”

DO : “Densité Optique”

DPPH: “1,1-Diphényl-2-Picrilhydrazyle”

ECL: “*Enhanced chemiluminescence*”

EDTA: “*Ethylene diamine tetraacetic acid*”

EGF : “*Epidermal Growth Factor* ”

ERN : “Espèces Oxygénées de l’azote”

ERO : “Espèces Réactives de l’Oxygène”

FACS: “*Fluorescent Activated Cell Sorting*”

Fas: “*First apoptosis signal*”

FDA: *Food and Drug Administration*”

FRAP: “*Ferric reducing antioxidant power*”

GATA 1: “*Globin Transcription factor 1*”

GI₅₀: “*Growth Inhibition 50*”

HPLC: “*High Performance Liquid Chromatography*”

HRPO: “*HorseRadish Peroxidase*”

hTERT: “*Human Telomerase Reverse Transcriptase*”

IGF: “*Insulin Growth Factor*”

IMDM: “*Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium*”

INC : “Institut National du Cancer”

ITK : “Inhibiteur de Tyrosine kinase”

LAM : “Leucémie Myéloïde Aigue”

LC₅₀ : “*Lethal Concentration 50*”

LMC : “Leucémie Myéloïde Chronique”

LMMC : “Leucémies Myélomonocytaires Chroniques”

MAPK : “*Mitogen Activated Protein Kinase*”

MDA: “Malonedialdéhyde”

MDR: “*Multidrug resistance*”

MTT: “3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-Diphényltétrazolium bromide) ”

NFκB: “Nuclear Factor kappa B”

NO: “Oxyde nitrique”

NOD/SCID: “Non Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency”

OMS : “Organisation Mondiale de la Santé”

PBS : “Phosphate Buffered Saline”

P-gp : “P-glycoprotein”

PRb : “Protéine du rétinoblastome”

RPMI : “Roswell Park Memorial Institute”

SDS : “Sodium Dodecyl Sulfate”

SIDA : “Syndrome de l’Immunodéficience Acquise”

Smac-DIABLO : “Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor Apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi ”

SOD: “Superoxyde Dismutase”

SRB: “Sulforhodamine B”

TBST: “Tris buffered saline-Tween”

TCA: “Acide trichloroacétique”

TGI: “Total Growth Inhibition”

THS: “Traitement Hormonaux Substitutifs”

TNF: “Tumor Necrosis Factor”

TNFα: “Tumor necrosis Factor alpha”

TPTZ: “2, 4,6-tris (2 -pyridyl)-S-triazine”

VEGF: “Vascular Endothelial Growth Factor ”

Vit C: “Vitamine C”

VPH: “ Virus du papillome humain”

XTT: “3, -[1-[(phenylamino)-carbony]-3,4-tétrazolium]-bis(methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate”

RESUME

Contexte : Dans le domaine de l'oncologie, l'une des préoccupations majeures actuelles est la recherche permanente de nouvelles molécules anticancéreuses. En effet, l'application clinique surtout à long terme de la chimiothérapie qui est la méthode de traitement la plus utilisée dans la prise en charge thérapeutique du cancer se heurte au problème de chimiorésistance et de toxicité des molécules utilisées. L'une des approches prometteuses, est le recours aux plantes médicinales qui ont déjà prouvé leur efficacité dans le domaine du développement de médicaments anticancéreux. Cependant, très peu de travaux ont évalué les effets anticancéreux de *Syzygium guineense* (Willd.). Ce travail vise à étudier les propriétés anti-oxydantes et anticancéreuses *in vitro* et *in vivo* des extraits et fractions de la plante et d'en élucider quelques mécanismes d'action.

Méthodes : Les extraits ont été obtenus par macération des feuilles et écorces de *S. guineense* récoltées à Ndjie (région du centre-Cameroun) dans de l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol. L'étude des propriétés anti-oxydantes a consisté à évaluer leur capacité à piéger les radicaux ABTS⁺ et DPPH• d'une part et à réduire le phosphomolybdate et les ions ferriques d'autre part. La composition phytochimique a consisté en la détermination de la teneur en composés phénoliques totaux et de leur identification par chromatographie liquide haute performance. L'évaluation des propriétés antiprolifératives *in vitro* des extraits bruts et fractions a été faite par la méthode à la sulforhodamine B (SRB) sur six lignées cellulaires dont deux du cancer du sein (MCF7 et MDA-MB231), deux du col de l'utérus (SiHa et HeLa) et deux leucémiques (K562 et HL-60) en déterminant les valeurs des concentrations inhibitrices 50 (GI₅₀), les concentrations inhibant totalement la croissance (TGI), et les concentrations létales 50 (LC₅₀).

Le mécanisme d'action antiprolifératif des extraits et fractions de *S. guineense* a été élucidé en évaluant l'effet de ces derniers sur le cycle cellulaire et l'expression des protéines pro-et antiapoptotiques Bax et Bcl-2 par la cytométrie de flux et le western blot respectivement.

L'identification des molécules actives dans les fractions les plus actives a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La dernière partie du travail s'est articulée autour de l'étude des effets anticancéreux *in vivo*. Nous avons déterminé le volume relatif de la tumeur, le pourcentage de survie ainsi que l'évolution pondérale après traitement des xéngreffes de leucémie myéloïde aigue obtenues par transplantation des cellules de la lignée KG-1 sur les souris femelles de souche *NOD-SCID*. Les données ont été analysées

par les logiciels Graphpad prism version 5.0 et SPSS pour Windows version 20.0. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats : Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux de feuilles et d'écorces ont présenté les meilleurs pouvoirs antioxydants avec des valeurs de $0,51 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ et $(0,43 \pm 0,09 \mu\text{g/mL})$ pour les radicaux DPPH et ABTS⁺ respectivement. Par ailleurs, l'extrait éthanolique d'écorces a démontré la meilleure capacité anti-oxydante totale selon les méthodes du FRAP et du phosphomolydate avec des valeurs de $278,88 \pm 32,50$ et $278,88 \pm 5,75 \text{mEq}$ de quercétine/g de matière sèche respectivement tandis que l'extrait éthanolique de feuilles était le plus riche en phénols et flavonoïdes totaux. Les teneurs étaient respectivement de $439,76 \pm 5,15$ et $1,040 \pm 51,1 \text{mEq}$ de quercétine/g de matière sèche. Le profil phytochimique par chromatographie Liquide Haute Performance quant à lui a révélé la présence des alcools, des acides phénoliques simples et des flavonoïdes. S'agissant des propriétés antiprolifératives *in vitro*, les extraits bruts aqueux d'écorces et éthanolique de feuilles ont présenté les meilleures valeurs de GI₅₀ sur toutes les lignées cellulaires testées comparativement aux extraits bruts. Ainsi, pour les lignées MCF7 et MDA-MB231, les valeurs obtenues étaient respectivement de $64,71 \mu\text{g/mL}$ et $46,06 \mu\text{g/mL}$ d'une part et $184,51$ et $115,26 \mu\text{g/mL}$ d'autre part. Concernant les lignées leucémiques, l'extrait aqueux d'écorces a été plus actif sur la lignée K562 avec une GI₅₀ de $46,67 \mu\text{g/mL}$ contre $66,34 \mu\text{g/mL}$ sur la lignée HL-60. A l'inverse, l'extrait éthanolique de feuilles a démontré un meilleur effet sur la lignée HL-60 avec une GI₅₀ de $76,5 \mu\text{g/mL}$ comparée à $84,5 \mu\text{g/mL}$ sur la lignée K562. Parmi les lignées du cancer sein, la lignée MCF7 a été plus sensible à tous les extraits que la lignée MDA-MB231. Pour les cellules du cancer du col de l'utérus, la lignée SiHa a été plus sensible que la lignée HeLa et parmi les lignées leucémiques la lignée K562 a été plus sensible que la lignée HL-60. Les fractions L₄ et L₅ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles ont démontré les meilleurs effets anticancéreux parmi les fractions obtenues sur toutes les lignées cellulaires testées. Par ailleurs, l'arrêt du cycle cellulaire en phase S serait le mécanisme responsable de l'inhibition de la prolifération des cellules MCF7, MDA-MB231, SiHa et HL-60 tandis que l'arrêt en phase G₂/M expliquerait l'effet antiprolifératif vis-à-vis des lignées HeLa et K562. L'induction de l'apoptose serait responsable de l'activité cytotoxique des fractions L₄ et L₅ sur toutes les lignées cellulaires étudiées. La composition phytochimique de la fraction L₄ a révélé en plus du méthyle hydrogène disulfure composé majoritaire, la présence de terpènes, d'acides gras et stérols alors que la fraction L₅ est composée majoritairement d'hydrocarbure soufrés, oxygénés et azotés. Pour l'étude des effets anticancéreux *in vivo*, la dose maximale tolérée par la méthode des doses uniques pour l'extrait brut aqueux d'écorces et les fractions L₄ et L₅ est supérieure à 900mg/kg

de poids corporel. L'extrait brut aqueux d'écorces a présenté la meilleure capacité à inhiber la progression tumorale sur les xénogreffes (*NOD-SCID*) de leucémie myéloïde aigue.

Conclusion : Les extraits de *Syzygium guineense* variété *macrocarpum* possèdent des propriétés anti-oxydantes et anticancéreuses. Les mécanismes responsables de l'inhibition de la croissance des cellules des lignées leucémiques myéloïde aigue et chronique sont l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G₂/M respectivement et l'induction de l'apoptose via la modulation de l'expression des protéines Bax et Bcl-2. L'extrait aqueux d'écorces à la dose 200mg/kg de poids corporel a significativement inhibé la progression de la tumeur sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue. L'extrait aqueux d'écorces et les fractions hexane/acétate d'éthyle 60 :40 et 40 :60 (v: v) sont de bons candidats pour le développement de nouveaux agents chimio-thérapeutiques contre les leucémies myéloïdes aigue et chronique.

Mots clés : *Syzygium guineense*, leucémie myéloïde, cycle cellulaire, apoptose, Bax, Bcl-2, xénogreffes, dose maximale tolérée.

SUMMARY

Background: One of the major concerns in the field of oncology today is the permanent research for new anticancer molecules. Indeed, the clinical application, especially the long-term application of chemotherapy, which is the most used method in the therapeutic management of cancer is hampered by the problem of chemoresistance and toxicity of the molecules used. One of the promising approaches is the use of medicinal plants that have already proven to be effective in the development of anti-cancer drugs. However, very little work has evaluated the anticancer effects of *Syzygium guineense* (Willd.). This work aims to study the antioxidant and anticancer properties *in vitro* and *in vivo* of extracts and fractions of the plant and to elucidate some mechanisms of action.

Methods: The extracts were obtained by maceration of the leaves and barks of *S. guineense* harvested in the locality of Ndjie (Centre region- Cameroon) in water, ethanol and the mixture water / ethanol. The study of antioxidant properties consisted of evaluating their ability to scavenge ABTS⁺ and DPPH[•] radicals on one hand and to reduce phosphomolybdate and ferric ions on the other hand. In addition, we determined the total phenolic content, as well as their identification by high performance liquid chromatography.

The *in vitro* study consisted to evaluate the effects of the crude extracts and fractions using the sulforhodamine B method on the growth of breast cancer cells lines (MCF7 and MDA-MB231), cervical cancer (SiHa and HeLa) and leukemia cell lines (K562 and HL-60). The GI₅₀ values (inhibitory concentrations 50), total growth inhibition (TGI), and lethal concentrations 50 (LC₅₀) were determined. Subsequently, we investigated the mechanism of action underlying the anti-proliferative and cytotoxic effect by assessing the effects of the most active fractions on the cell cycle as well as their ability to induce apoptosis by flow cytometry. In addition, we studied the expression profile of the pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins Bax and Bcl-2 by Western blot to determine the apoptotic pathway involved. Furthermore, we determined the phytochemical composition of the active fractions by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The last part of the work focused on the study of anticancer effects *in vivo* by determining the relative tumor volume, survival percentage, and weight loss after treatment of acute myeloid leukemia xenografts obtained by transplantation of cells of KG-1 unto female NOD-SCID mice. The data were analyzed by Graphpad prism software version 5.0 and SPSS for Windows version 20.0. The results were expressed as mean ± standard deviation. The differences were considered significant at p<0.05.

Results: The obtained results show that the aqueous extracts of leaves and barks had the best antioxidant power with $0.51 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $0.43 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{mL}$ for the DPPH and ABTS⁺ radicals respectively. In addition, the ethanolic extract of bark demonstrated the best total antioxidant capacity according to the FRAP and phosphomolybdate methods with 278.88 ± 32.50 et $278.88 \pm 5.75 \text{mEq}$ of quercetin / g of dry matter respectively while the ethanolic extract of leaves exhibited the highest total phenolic and flavonoids contents (439.76 ± 5.15 et $1,040 \pm 51.1$ mEq of quercetin / g of dry matter). The high performance liquid chromatography analysis revealed the presence of simple phenolic acids phenolic alcohols, and flavonoids. With respect to the *in vitro* anticancer properties, the aqueous extract of bark and leaf ethanolic extract had the best GI₅₀ values on all cell lines tested among all the crude extracts. Thus, for the MCF7 and MDA-MB231 lines, the values obtained were respectively $64.71 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $46.06 \mu\text{g} / \text{mL}$ on the one hand and 184.51 and $115.26 \mu\text{g} / \text{mL}$ on the other hand. Regarding the leukemic lines, the aqueous bark extract was more active on the K562 line with a GI₅₀ of $46.67 \mu\text{g} / \text{mL}$ against $66.34 \mu\text{g} / \text{mL}$ on the HL-60 line. Conversely, the ethanolic leaf extract demonstrated a better effect on the HL-60 line with a GI₅₀ of $76.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ compared to $84.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ on the K562 line. Among the breast cancer lines, MCF7 was more sensitive to all extracts than the MDA-MB231 while SiHa was the most sensitive among cervical cancer cell lines. Similarly, K562 was more sensitive than HL-60. Fractions L₄ and L₅ derived from the ethanolic extract of leaves demonstrated the best anticancer effects against all the tested cell lines among the obtained fractions. In addition, the S phase arrest of cell cycle is one of the mechanisms responsible of the inhibition of the proliferation of MCF7, MDA-MB231, SiHa and HL-60 cells while the G₂ / M phase arrest could explain the anti-proliferative effect demonstrated against HeLa and K562 cells. Meanwhile, the cytotoxic activity of fractions L₄ and L₅ exhibited against all the cell lines might be due to the induction of apoptosis. In addition to methyl disulphide hydrogen the major compound, the phytochemical composition of the fraction L₄ revealed the presence of terpenes, fatty acids and sterols whereas fraction L₅ is composed mainly of sulfur oxygenated and nitrogenous hydrocarbons. The study of *in vivo* anticancer effects showed that the maximum tolerated dose for the crude aqueous extract of barks and the L₄ and L₅ fractions is greater than $900 \text{ mg} / \text{kg}$ body weight. The aqueous crude bark extract significantly inhibits tumor growth on NOD-SCID acute myeloid leukemia xenografts.

Conclusion: The extracts of *Syzygium guineense* variety *macrocarpum* possess anti-oxidant and anti-cancer properties *in vitro* and *in vivo*. Nonetheless, the aqueous extract of bars and hexane/ethyl acetate fractions 60:40 and 40:60 (v: v) are good candidates for the development

of new chemotherapeutic agents for acute and chronic myeloid leukemias. The mechanisms responsible of the growth inhibition of acute and chronic myeloid leukemia cell lines are the in S and G₂ / M phase arrest of the cell cycle respectively and the induction of apoptosis via modulation of the expression of Bax and Bcl-2 proteins. The aqueous bark extract at a dose of 200 mg / kg body weight significantly inhibited tumor progression on xenografts of acute myeloid leukemia.

Key words: *Syzygium guineense*, myeloid leukemia, cell cycle arrest, apoptosis, Bax, Bcl-2, xenografts, maximum tolerated dose.

INTRODUCTION

Dans le domaine médical, le cancer continue d'engendrer de graves dégâts, avec une incidence sans cesse croissante. Malgré les progrès réalisés sur le plan diagnostique et thérapeutique, le cancer reste l'un des problèmes de santé les plus importants, avec une mortalité sans cesse croissante. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'incidence mondiale (en 2018) a été estimée à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions, le nombre de décès enregistrés faisant du cancer la deuxième cause de mortalité au rang des maladies non transmissibles (Bray *et al.*, 2018). L'incidence des cas qui surviennent est inégalement répartie, mais une prédominance de la mortalité est de plus en plus observée dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. A ce jour, l'on constate une plus grande susceptibilité de certains organes. Le cancer du sein par exemple assez fréquent occupe la deuxième place en termes de prévalence mondiale avec 1,7 millions nouveaux cas enregistrés en 2018 (Globocan 2018). A l'échelle mondiale, il occupe la cinquième place au rang des cancers les plus meurtriers. Dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, c'est le cancer féminin le plus répandu et la première cause de décès par cancer chez ces dernières. Au Cameroun, il représente environ 18,5% des cancers féminins et constitue la première cause de décès par cancer (Enow *et al.*, 2012).

Le cancer du col de l'utérus en outre est le quatrième cancer le plus diagnostiqué chez les femmes. En 2012, environ 528000 nouveaux cas ont été détectés et 266 000 décès enregistrés à l'échelle mondiale (Globocan, 2018). Au Cameroun, le cancer du col de l'utérus représente 13,8% de toutes les tumeurs malignes féminines et constitue la seconde cause de décès par cancers (Enow *et al.*, 2012).

Les leucémies myéloïdes bien que présentant une incidence relativement faible à l'échelle mondiale demeurent une préoccupation dans le domaine de l'oncologie à cause du faible nombre de molécules thérapeutiques actuellement disponibles. En effet, à coté de quelques molécules actuellement disponibles pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës, seul le traitement ciblé par les inhibiteurs de tyrosine kinases constitue la clé de voute pour la leucémie myéloïde chronique (Kantarjian *et al.*, 2012 ; Chihara *et al.*, 2012). Il demeure l'unique alternative chez les patients ne pouvant bénéficier de la greffe de moelle osseuse, seul traitement curatif de la leucémie chronique myéloïde jusqu'à ce jour.

L'efficacité des outils thérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers reste relative. Toutefois, la chimiothérapie est l'un des traitements conventionnels les plus utilisés. Elle est basée sur l'administration de médicaments ayant le pouvoir d'entraver la prolifération

des cellules tumorales par divers mécanismes. Cependant, la sévérité des effets secondaires (toxicité envers les cellules normales à renouvellement rapide) ainsi que le développement de la chimiorésistance constituent encore de grandes limites à l'application surtout à long terme de cette modalité thérapeutique (Singh *et al.*, 2013 ; Chorawala *et al.*, 2012). De plus, pour les patients des pays en voie de développement, un autre problème reste le coût élevé des charges liées aux traitements médicamenteux.

Il apparaît donc évident que le développement des méthodes de traitement facilement accessibles est nécessaire pour réduire le taux de morbidité et de mortalité par cancer. L'une des approches est le recours aux substances médicinales issues des plantes puisque des études récentes montrent que 40% de médicaments anticancéreux mis sur le marché au cours des quatre dernières décennies sont dérivés des plantes (Newman et Cragg, 2016). En outre, 60% de molécules actuellement en phase d'essais cliniques pour le traitement de divers types de cancers sont soit des molécules naturelles, soit celles obtenues par hémisynthèse (Newman et Cragg, 2016). Aussi, la faible toxicité vis-à-vis des cellules normales et la légèreté des effets secondaires des molécules naturelles encouragent davantage leur utilisation comme source potentielle d'agents chimio-thérapeutiques. Les extraits de plantes sont donc des banques de composés structurellement divers et leur investigation constitue une approche prometteuse dans le développement de médicaments.

Syzygium guineense (Willd.) est une plante retrouvée en Afrique tropicale très utilisée au Cameroun pour ses vertus culinaires comme épice et en médecine traditionnelle africaine pour traiter de nombreuses pathologies telles que l'aménorrhée et les maladies sexuellement transmissibles. Ses propriétés antibactériennes ont été investiguées montrant des effets inhibiteurs de la croissance de plusieurs espèces bactériennes fréquemment impliquées dans les infections cervico-vaginales (Tsakala *et al.*, 1996). Ses extraits de feuilles ont révélé la présence de triterpènes (Djoukeng *et al.*, 2005) et ceux d'écorces une richesse en composés phénoliques, classe de métabolites bien connue pour leurs propriétés anticancéreuses (Pieme *et al.*, 2014). Cependant, très peu de travaux jusqu'à présent ont évalué les effets anticancéreux des extraits de *Syzygium guineense* var. *macrocarpum*. Pourtant les travaux de Dwivedi *et al.*, (2011) réalisés sur les propriétés anticancéreuses de *S. aromaticum* (plante du même genre) ont montré un effet inhibiteur de la croissance des cellules du cancer du sein et du col de l'utérus. *Syzygium guineense* pourrait ainsi représenter une source de composés anticancéreux ou encore ses extraits de façon globale pourraient servir comme base pour la formulation des phyto-médicaments dotés de vertus anticancéreuses.

Objectif général

Cette étude a été entreprise pour étudier les propriétés antioxydantes et anticancéreuses *in vitro* et *in vivo* des extraits et fractions de *Syzygium guineense* var. *macrocarpum* sur des lignées cellulaires humaines du cancer du sein, du col de l'utérus et leucémiques et pour élucider le mécanisme sous-jacent à l'effet anticancéreux des fractions les plus actives.

II. QUESTIONS DE RECHERCHE

- 1- Les extraits de feuilles et d'écorces de *Syzygium guineense* variété *macrocarpum* possèdent-ils des propriétés anti-oxydantes ?
- 2- Ces extraits possèdent-ils la capacité d'inhiber *in vitro* la croissance des cellules du cancer du sein, du col de l'utérus et leucémiques ?
- 3- Quels seraient les mécanismes d'action responsables de leurs effets antiprolifératifs ?
- 4- L'administration par voie orale de ces extraits peut-elle empêcher la progression tumorale des xénogreffes de leucémie myéloïde aigue ?

III. Objectifs spécifiques

Objectif spécifique 1 : Etudier les propriétés antioxydantes et déterminer la composition phytochimique des extraits bruts de *Syzygium guineense* variété *macrocarpum*

Objectif spécifique 2 : Etudier les propriétés antiprolifératives *in vitro* des extraits bruts et fractions de *Syzygium guineense* sur les lignées du cancer du sein, du col de l'utérus et leucémiques, le mode d'action et déterminer la composition phytochimique des fractions les plus actives par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Objectif spécifique 3 : Etudier les propriétés anticancéreuses *in vivo* des fractions les plus actives sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue.



CHAPITRE I :
REVUE DE LA LITTERATURE

I. Généralités sur le cancer

I.1. Définition

Le terme cancer désigne un groupe de maladies caractérisées par une prolifération incontrôlée, une invasion et une capacité métastatique d'une ou d'un groupe de cellules résultant de la rupture de l'homéostasie tissulaire (Gennari *et al.*, 2007). En effet, l'homéostasie tissulaire est un fragile équilibre entre la prolifération, la différenciation et/ou la spécialisation irréversible des cellules et leur élimination, maintenu par des signaux (hormones, facteurs de croissance, matrice extracellulaire, cellules voisines) sous la dépendance des gènes. La perte de cette homéostasie due à une défaillance du programme de mort cellulaire ou de sénescence aboutit à une prolifération incontrôlée des cellules.

I.2. Epidémiologie du cancer

Le cancer est l'une des maladies les plus répandues dans le monde (OMS, 2012). Il figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale. Son incidence mondiale en 2018 a été estimée à 18,1 millions de nouveaux cas (Bray *et al.*, 2018). Les cancers du poumon, du sein et colorectal étant les trois cancers les plus prévalents. En termes de mortalité, le cancer constitue la deuxième cause de décès dans le monde. En 2018, 9,6 millions de décès ont été enregistrés à l'échelle mondiale dont 70% dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Globocan, 2018). Les cancers les plus mortels étaient ceux du poumon, du foie et de l'estomac (Globocan, 2018). Cependant, les incidences des cancers du sein, du col de l'utérus et les leucémies attirent tout aussi déjà une attention particulière.

I.2.1. Epidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein occupe la deuxième place en termes de prévalence mondiale avec 1,7 millions de nouveaux cas enregistrés en 2012 (Globocan 2012). A l'échelle mondiale, il occupe la cinquième place au rang des cancers les plus meurtriers. Il est le cancer le plus répandu chez les femmes dans les pays à revenu faible ou intermédiaire et constitue la première cause de décès par cancer chez ces dernières avec une prévalence d'environ 26,4%.

En effet, l'adoption des modes de vie occidentaux entraîne une augmentation de l'incidence dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, la rareté des campagnes de dépistage et l'absence d'une politique de prévention sont responsables de la détection des cancers à un stade avancé ce qui complique davantage la prise en charge thérapeutique et réduisent les chances de guérison. En outre, le coût élevé de la prise en charge thérapeutique

conjuguée à l'absence et/ou l'insuffisance des services de cancérologie adéquats expliquent davantage l'augmentation de la mortalité dans ces derniers.

Au Cameroun, le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme. Il représente environ 18,5% des cancers féminins et constitue la première cause de décès par cancer chez ces dernières (Enow *et al.*, 2012). La morbidité élevée est due à un dépistage à des stades tardifs de la maladie en raison des difficultés d'accès aux examens d'imagerie et aux consultations de routine.

I.2.2. Epidémiologie du cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus quant à lui est le quatrième cancer le plus diagnostiqué chez les femmes après les cancers mammaires, colorectaux et pulmonaires, avec environ 528 000 nouveaux cas détectés à l'échelle mondiale en 2012 (données du Fonds International de recherche sur le cancer). Près de 84% de la prévalence mondiale se trouve dans les pays à revenu faible. En 2012, le cancer du col utérin a entraîné environ 266 000 décès à l'échelle mondiale soit 7,5% de tous les décès par cancers féminins. Au Cameroun, le cancer du col de l'utérus est un problème majeur de santé publique. Il représente 13,8% de toutes les tumeurs malignes féminines et est considéré comme le deuxième cancer gynécologique le plus fréquent (Enow *et al.*, 2012). Il représente également la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes en raison d'un diagnostic tardif de la pathologie.

I.2.3. Epidémiologie des leucémies

Les leucémies tout comme les cancers du sein et du col de l'utérus ont une prévalence élevée aussi bien dans les pays à faible revenu que dans les pays développés. En 2012, l'incidence mondiale était de 210691 nouveaux cas diagnostiqués dans les pays en voie de développement contre 141274 cas dans les pays développés (Globocan, 2012). Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent 1% des cancers et 80% des leucémies aiguës de l'adulte dont l'incidence est en constante augmentation (Belot *et al.*, 2008).

I.3. Physiopathologie du cancer

Le cancer est une maladie hétérogène, multifactorielle et multi-étapes. Bien que la cause du cancer soit énigmatique, il semble être la résultante des mutations génétiques (dont 90% sont somatiques et 10% héréditaires) et d'une défaillance du programme de mort cellulaire. Bien que chaque type de cancer possède des facteurs étiologiques qui lui soient propres, les facteurs

génétiques propres au sujet et les agents extérieurs apparaissent comme des causes communes à plusieurs types de cancers. Ils permettent de regrouper les cancérogènes en 3 catégories :

1. Les cancérogènes physiques (rayonnements UV et radiations ionisantes) ;
2. Les cancérogènes chimiques (amiante, composants de la fumée du tabac, l'aflatoxine et l'arsenic) et
3. Les cancérogènes biologiques (virus, bactéries et parasites).

Ces facteurs agissent de manière synergique pour conduire au stade malin. Les effets de cette action synergique évoluent pendant une période de temps relativement longue et aboutissent finalement au développement du cancer. De manière classique, on distingue trois grandes étapes interconnectées (Thangapazham *et al.*, 2006) :

- L'initiation au cours de laquelle une cellule normale devient une cellule dite initiée suite à des altérations génétiques,
- La promotion, caractérisée par une évolution de la cellule initiée vers une lésion précancéreuse et
- La progression au cours de laquelle la cellule précancéreuse évolue vers une tumeur maligne.

I.3.1. Physiopathologie du cancer du sein

I.3.1.1. Facteurs de risque

Le risque de développer un cancer du sein est très inégal d'une population à une autre. Néanmoins, les facteurs reconnus à ce jour peuvent être regroupés en trois grandes catégories : les facteurs génétiques et familiaux, les facteurs hormonaux et reproductifs et les facteurs environnementaux et comportementaux (Key *et al.*, 2001).

➤ Facteurs hormonaux et reproductifs

On regroupe sous les facteurs hormonaux et reproductifs, tout facteur susceptible d'accroître l'exposition aux hormones notamment l'âge, la nulliparité, la première grossesse tardive, la précocité des premières règles et la ménopause tardive.

- **L'âge**

L'âge est le facteur de risque du cancer du sein le plus important. En effet, le cancer du sein est rarement diagnostiqué chez les femmes de moins de 30 ans. A l'inverse, ce risque augmente de façon exponentielle jusqu'à l'âge de 45 ans et atteint son maximum entre soixante et soixante-neuf ans.

- **La précocité de la puberté et la ménopause tardive**

L'âge des premières règles détermine le moment où les ovaires débutent la production des œstrogènes. Ainsi, une puberté précoce (survenant avant 11 ans) augmente de 20% le risque de survenue du cancer du sein due à une longue exposition de l'organisme aux estrogènes qui stimulent la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Une étude a montré une augmentation du risque du cancer du sein de 3% par année en moins à la puberté (Clavel - Chapelon, 2002). De même, une ménopause tardive (survenant après 50 ans) accroît le risque de développer un cancer du sein. Chaque année supplémentaire de retard augmente le risque de 3% (Merviel *et al.*, 2011).

- **La nulliparité et la primiparité tardive**

L'absence de grossesse (nulliparité) est considérée comme un facteur de risque du cancer du sein. Ce risque est diminué de 25% chez les femmes ayant fait un enfant avant trente ans comparativement aux femmes nullipares et celles ayant fait un enfant après cet âge (Merviel *et al.*, 2011). Tous ces facteurs de risque s'expliquent par la longueur de la période d'exposition de l'organisme aux hormones responsables de la prolifération des cellules. A côté de ces facteurs, d'autres facteurs hormonaux dits exogènes modifient également le risque du cancer du sein.

- **Les facteurs hormonaux exogènes**

La prise de contraceptifs oraux et de traitements hormonaux substitutifs (THS) augmente également le risque de développer un cancer du sein (Beaber *et al.*, 2014). L'impact des traitements hormonaux de la ménopause a fait l'objet de nombreuses études (Rossouw, 2002 ; Fournier *et al.*, 2005 ; Fournier *et al.*, 2008). Toutes ces études s'accordent sur l'existence d'une corrélation positive entre la prise de traitements hormonaux de la ménopause et le risque de survenue de cancer du sein. Toutefois, il existerait des variations du degré de risque en fonction du type de traitement. Ainsi, les travaux de Fournier *et al.* (2005 et 2008) ont révélé une augmentation de 70% du risque du cancer du sein associé à l'utilisation d'œstrogènes combinés aux progestatifs de synthèse indépendamment de la voie d'administration, du type de progestatif et de la durée du traitement. Cependant, ce risque diminue dès l'arrêt du traitement et disparaît 5 ans après.

➤ **Facteurs génétiques et familiaux**

Des antécédents familiaux de cancer du sein ou autre type de cancer (cancer de l'ovaire) accroîtraient le risque de survenue du cancer du sein. En effet, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 (*Breast cancer gene*) ont été identifiés comme étant fortement impliqués dans la prédisposition héréditaire du cancer du sein (Stratton et Rahman, 2008 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005). Ces gènes codent pour des protéines ayant des fonctions multiples notamment dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Toutefois, le mécanisme par lequel leur inactivation contribuerait au déclenchement ou à l'évolution du cancer du sein reste en grande partie inconnue.

➤ **Facteurs environnementaux et comportementaux**

• **Surpoids et obésité**

Le surpoids et l'obésité chez une femme ménopausée augmentent le risque de survenue du cancer du sein respectivement de 12 et 20%. En effet, le tissu adipeux constitue quasiment la seule source importante d'œstrogènes circulants suite à l'activité de l'aromatase sur les hormones androgènes.

• **Consommation des boissons alcoolisées**

Une consommation quotidienne d'un verre d'alcool (équivalent à environ 10g d'alcool pur) serait associée à une augmentation du risque de cancer du sein de 12%. Les données les plus convaincantes suggèrent une inhibition de l'apoptose par le facteur de croissance insulinaire (*IGF*) et une interaction de ce dernier avec les œstrogènes suite à sa production accrue stimulée par l'alcool.

I.3.2. Physiopathologie du cancer du col de l'utérus

I.3.2.1 Facteurs de risque du cancer du col de l'utérus

➤ **Infection par le papillomavirus Humain (PVH)**

La filiation entre l'infection au Papillomavirus humain à haut risque oncogène et le cancer du col de l'utérus a été établie par plusieurs études (Durst *et al.*, 1983, Boshart *et al.*, 1984 ; Walboomers *et al.*, 1999). Elle est à ce jour reconnue comme facteur étiologique majeur pour le développement du cancer du col de l'utérus (Schlecht *et al.*, 2001, Wardak, 2016). En effet, l'ADN viral des PVH dits à haut risque oncogène 16 et 18 est retrouvé dans environ 99,7% de biopsies réalisées chez les patients atteints de ce cancer. Toutefois, la persistance de

l'infection par ces sous types viraux s'avère insuffisante pour l'évolution vers le phénotype malin. La contribution d'autres facteurs semble indispensable pour l'évolution vers le stade malin. Plusieurs cofacteurs ont donc été répertoriés et peuvent être répartis en facteurs exogènes ; facteurs endogènes et facteurs liés à la réponse immunitaire.

➤ **Facteurs exogènes ou environnementaux**

Ils regroupent : le tabagisme, le stress oxydatif, la coïnfection par d'autres agents sexuellement transmissibles (*Chlamydia trachomatis*, *Herpès simplex Virus 2*) et l'utilisation à long terme des contraceptifs hormonaux

• **Tabagisme**

L'association entre le tabagisme et le risque accru du cancer du col de l'utérus a fait l'objet de nombreuses études (Hildesheim *et al.*, 2001 ; Plummer *et al.*, 2003, Fonseca-Moutinho, 2011 ; Kim *et al.*, 2012;). Une étude de cohorte a rapporté une augmentation du risque de cancer du col de l'utérus de 50% au sein d'une population ayant arrêté de fumer pendant dix ans comparativement à ceux qui étaient encore tabagiques (Roura *et al.*, 2014). Les mécanismes expliquant cette association sont variés ; l'immunosuppression locale induite par les métabolites de la cigarette et l'activité mutagène des composants de la cigarette comme la nicotine et ses métabolites sont les plus plausibles. Par ailleurs, les composés contenus dans la cigarette peuvent induire des modifications épigénétiques au niveau col de l'utérus contribuant ainsi à la pathogenèse de la maladie (Ma *et al.*, 2011).

• **Stress oxydatif et cancer**

Le stress oxydatif est un état physiologique/biochimique caractérisé par un déséquilibre de la balance pro-oxydants/antioxydants en faveur des pro-oxydants. Il est effectif lorsque les espèces réactives oxygénées (ERO) ou espèces réactives de l'azote (ERN) dépassent les capacités antioxydantes de l'organisme. Les ERO et ERN ont un double rôle dans le processus de cancérogenèse ; ils jouent un rôle pendant l'initiation et la progression du cancer.

Pendant l'initiation, les ERO seraient responsables des mutations au niveau de l'ADN. En effet, des études ont montré que les ERO notamment le radical hydroxyle est responsable des dommages pyrimidiques et puriques avec pour conséquence une transformation génique potentiellement carcinogène (Visconti et Grieco, 2009). De même, les ERO inhibent certaines enzymes de réparation de l'ADN favorisant ainsi la survenue des mutations. Cette association s'explique par les taux élevés de 8-Hydroxydesoxyguanine (8-OHdG), 4-hydroxy-2-nonéal,

marqueurs respectifs des dommages oxydatifs de l'ADN et de la peroxydation lipidique retrouvés à un stade précoce de la carcinogenèse.

Lors de la progression, des études ont montré que les ERO peuvent spécifiquement activer certaines voies de signalisation et contribuer ainsi au développement de la tumeur à travers l'angiogenèse et la métastase (Storz, 2005).

- **Coïnfection**

L'infection à *Chlamydia trachomatis* a été suggérée comme un cofacteur favorisant le développement du cancer du col de l'utérus. Cette contribution est restée longtemps controversée. Néanmoins, les récents travaux de revue de Zhu *et al.* (2016) ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la persistance de l'infection à *C. trachomatis* et le risque du cancer du col de l'utérus. Le mécanisme plausible expliquant cette corrélation serait lié à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène résultant de l'inflammation chronique causée par l'infection. Ces ERO seraient donc responsables des dommages sur la molécule d'ADN entraînant une instabilité génétique. Par ailleurs, l'infection par *C. trachomatis* serait responsable d'une diminution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire entraînant alors une persistance de l'infection par le PVH (Smith *et al.*, 2004). Une autre explication suggère une inhibition de l'apoptose et une surexpression des oncoprotéines E6 et E7 (Silva *et al.*, 2014). De même, la coïnfection par le Virus de l'Herpès Simplex de type 2 jouerait un rôle dans l'initiation du cancer du col de l'utérus (Denny, 2012). Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas encore élucidés.

- **Utilisation des contraceptifs oraux**

L'utilisation à long terme de contraceptifs oraux est considérée comme un facteur de risque significatif pour l'évolution des lésions précancéreuses vers le cancer invasif (Adam *et al.*, 2000). En effet, l'activation des récepteurs à progestérone par la présence de l'hormone favoriserait l'intégration de l'ADN viral des PVH dans le génome de la cellule hôte et la dérégulation de l'expression des oncoprotéines E6 et E7 responsables de l'inhibition des anti-oncogènes P53 et pRb au sein de la cellule hôte (Bosch and De-sanjose, 2007).

- **Pathogenèse du cancer du col de l'utérus**

La présence persistante du papillomavirus humain est reconnue comme le facteur étiologique majeur dans la pathogenèse du cancer du col de l'utérus. En effet, pour que la cancérogenèse puisse être initiée il faut des étapes préalables dont la plus importante est

l'intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules hôtes. Le clivage de la molécule d'ADN viral circulaire entraîne une interruption de la continuité du gène d'une part, et d'autre part la libération des oncogènes E₆ et E₇ de la répression par le facteur E₂. Cette levée de répression va donc engendrer une surexpression des oncogènes E₆ et E₇ et parallèlement l'inhibition des anti-oncogènes P₅₃ et pRb de la cellule hôte. Ces deux phénomènes (levée de répression et inhibition des anti-oncogènes) vont donc entraîner une altération de la physiologie cellulaire hôte et la transformation de cette dernière.

Le gène P₅₃ est un gène ubiquitaire impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Ses fonctions incluent le contrôle de la transition G1/S par l'induction de la transcription des gènes codant les protéines P₁₆, P₂₁ et P₂₇ responsables de l'inhibition de la progression G1/S nécessaire à la réparation des potentiels dommages présents sur la molécule d'ADN. Par ailleurs, il peut induire la mort cellulaire si les mécanismes de réparation sont défectueux (Howie *et al.*, 2009). Or, la liaison de l'oncoprotéine E₆ à P₅₃ conduit à son ubiquitylation via le recrutement d'un facteur cellulaire appelé E6AP, puis finalement à sa dégradation par le protéasome. Il apparaît alors que l'interaction entre E₆ et P₅₃ empêche le blocage du cycle cellulaire ce qui favorise alors la réplication virale et/ou l'accumulation des aberrations au niveau de la molécule d'ADN d'où l'altération de la physiologie et de la transformation cellulaire (Monsonogo, 1996). En outre, l'oncoprotéine E₆ joue un rôle dans l'immortalisation des cellules. En effet, après chaque cycle cellulaire, les télomères se raccourcissent un peu plus et la perte de l'information génétique conduit inévitablement la cellule vers la sénescence ou l'apoptose. L'activité immortalisante de E₆, se fait après sa liaison à E6AP via l'induction de la sous-unité catalytique de la télomérase reverse transcriptase humaine (hTERT), enzyme permettant de rallonger les télomères (Oh *et al.*, 2001 ; Weldmann *et al.*, 2001 ; Gewin *et al.* 2004). La protéine E₇ quant à elle contribue à la transformation cellulaire par la liaison compétitive à des protéines cellulaires clés en se fixant à P_{Rb} et à la protéine P₁₀₇ et en empêchant de former des complexes avec E₂F

I.3.3. Physiopathologie des leucémies

Les leucémies représentent un groupe hétérogène d'hémopathies couramment rencontrées chez les enfants et les adultes survenant lorsque des altérations des processus régulateurs cellulaires normaux provoquent une prolifération incontrôlée de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Huguet et Recher, 2011). Elles diffèrent par leur présentation clinique, leur origine cellulaire et les mécanismes moléculaires impliqués dans leur pathogénèse. Dans le cadre de ce travail nous nous attarderons sur les leucémies myéloïdes aigues et chroniques.

I.3.3.1. Facteurs de risque des leucémies myéloïdes aigues

- **Facteurs génétiques des leucémies myéloïdes aigues**

Il s'agit des désordres congénitaux prédisposant les individus à la survenue d'une leucémie aigüe myéloïde (LAM). On peut citer à titre d'exemples la trisomie 21, l'anémie de Fanconi ou syndrome de Bloom. En effet, des études montrent que le risque de développer une leucémie aigüe chez l'enfant trisomique est augmenté d'un facteur 10 à 20. Ce risque accru de survenue de LAM chez les patients trisomiques serait dû aux mutations qui entraînent un raccourcissement du facteur de transcription hématopoïétique GATA 1 (*Globin transcription factor 1*) l'empêchant ainsi de réguler normalement les gènes de régulation des cellules hématopoïétiques (Huguet et Récher, 2011).

- **Facteurs environnementaux**

L'exposition chronique à des toxiques tels que le benzène, les solvants organiques ou les radiations ionisantes augmentent la fréquence d'apparition des LAM. Les travaux de Kane *et al.*, (1999) ont démontré sur une cohorte anglaise de 807 malades que le benzène contenu dans la fumée de cigarette augmente de 1,2 à 2,3 fois le risque de développer une LAM, avec une incidence accrue pour les fumeurs de longue date. Cependant, ces facteurs de risque restent discutés.

- **Chimiothérapie anticancéreuse (Sill *et al.*, 2011)**

Environ 10% des patients initialement traités par chimiothérapie pour une tumeur solide développent une LAM dite secondaire. Ainsi, deux classes de leucémies aigües secondaires ont été répertoriées : celles survenant 5 à 7 ans après exposition aux agents alkylants (cisplatine, alkylants) et celles survenant 2 à 3 ans post traitement aux agents inhibant la topoisomérase II comme l'étoposide ou les anthracyclines (doxorubicine, la daunorobucine et la mitoxantrone).

- **Maladies pré-leucémiques**

Certains syndromes myéloprolifératifs peuvent évoluer en LAM. Ainsi, en l'absence de traitement, l'accumulation d'anomalies cytogénétiques secondaires conduit à l'accélération de la leucémie myéloïde chronique, puis à sa transformation en leucémie aigüe. Ces anomalies sont dues à un phénomène d'instabilité génétique notamment par le biais d'un déséquilibre dans la production et l'élimination des formes réactives de l'oxygène (Skorski, 2002 ; Koptyra, 2006) ; ce qui favorise ainsi l'apparition d'autres translocations ou la perte de matériel

génétique au sein de la cellule qui semblent sélectives. En effet, elles entraînent principalement la trisomie 8, l'apparition d'un chromosome Philadelphie supplémentaire, d'un isochromosome 17q, la trisomie 19, les aberrations du chromosome 3 et la perte du chromosome Y (Hehlmann, 2012). Par ailleurs, d'autres syndromes myéloprolifératifs tels que la splénomégalie myéloïde, thrombocytemie essentielle ou la maladie de Vaquez peuvent se transformer en LAM bien que moins fréquemment. En outre, les syndromes myélodysplasiques comme les anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB) ou les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) évoluent de façon assez fréquente en LAM.

I.3.3.2. Facteurs de risque de la leucémie myéloïde chronique

A l'heure actuelle, il n'existe pas de facteur de risque ou de toxique environnemental clairement identifié dans la pathogénie de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Cependant, une sur-incidence des cas dans la population japonaise sur les sites des bombardements nucléaires de 1945 suggère un rôle des radiations ionisantes dans la genèse de la leucémie myéloïde chronique (Holmberg, 1992). Toutefois, cette suggestion n'a pas encore été clarifiée par des études montrant l'implication des radiations ionisantes dans la genèse ou le développement de cette maladie jusqu'à ce jour.

➤ Pathogenèse des leucémies myéloïdes chroniques

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif prédominant sur la lignée granuleuse. Elle apparaît lorsqu'une cellule-souche pluripotente subit une transformation maligne et clonale, entraînant une surproduction de granulocytes immatures (Rumpold et Webersinke, 2011). Elle résulte pour la majorité des cas tel que décrite à la figure 1 d'une translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22 réalisant un chromosome chimérique également appelé chromosome de Philadelphie. Cette translocation est responsable de l'apparition d'un gène de fusion regroupant le gène *BCR* et le gène *ABL*. Le gène de fusion *BCR-ABL* code pour une protéine dotée d'une activité tyrosine kinase constitutive qui fonctionne comme une oncoprotéine (Rumpold et Webersinke, 2011). Elle active plusieurs voies de signalisations impliquées dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (Chereda et Melo, 2015). Cette protéine est donc responsable d'une résistance à l'apoptose et d'une accélération du cycle cellulaire dans les cellules progénitrices myéloïdes résultant en une importante expansion du compartiment myéloïde.

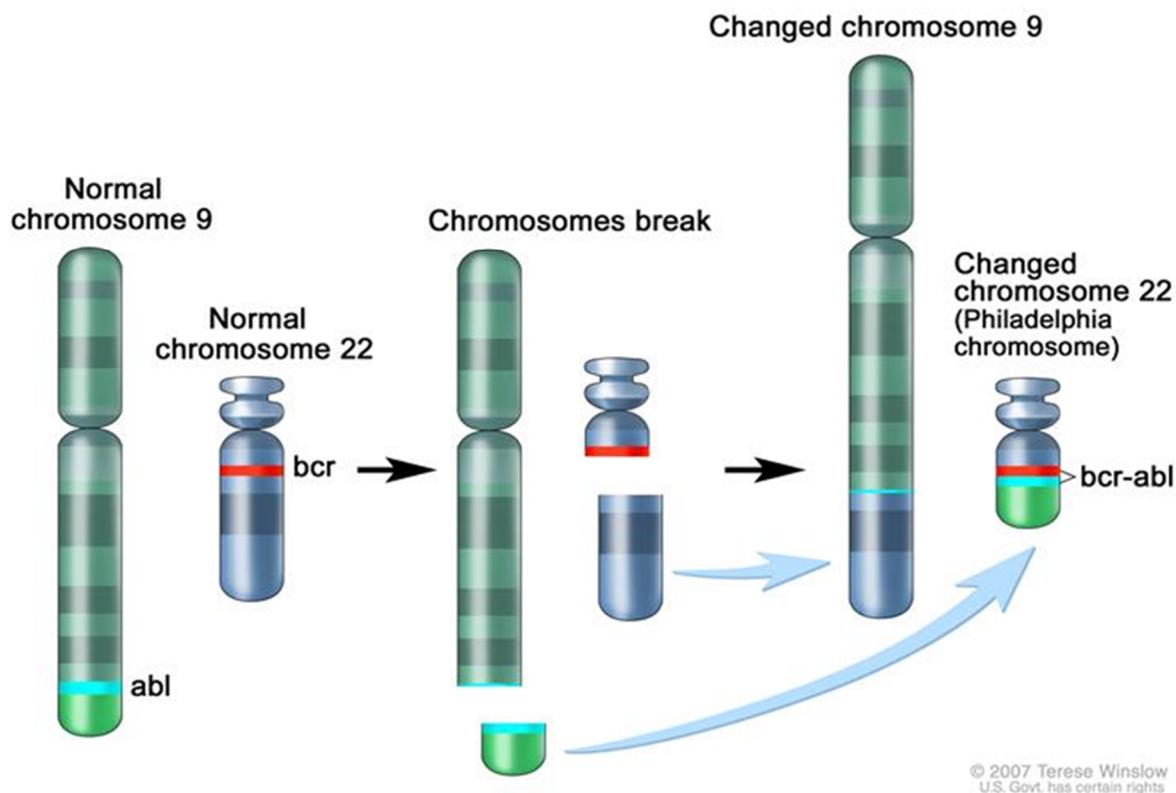


Figure 1: Formation de chromosome hybride BCR-ABL par translocation réciproque entre les bras des chromosomes 9 et 22: source <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR533336-750.jpg> consultée le 23/03/2018.

Bien que la translocation réciproque (t(9, 22)) soit l'anomalie génétique la plus rencontrée dans les cas de leucémie myéloïde chronique (95% de cas), il existe également d'autres modifications génétiques entraînant la formation du gène de fusion *BCR-ABL*. Ces leucémies sont dites atypiques à cause de l'absence du chromosome Philadelphie et représentent environ 2-5% des leucémies myéloïdes chroniques. Toutefois, ces anomalies ne sont pas encore totalement élucidées.

I.4. Prévention du cancer

La prévention du cancer concerne trois volets fondamentaux ; une prévention primaire, secondaire et tertiaire. La prévention primaire consiste à prévenir le développement de certains types de cancers chez les personnes saines. La prévention secondaire quant à elle consiste en un traitement des lésions précancéreuses dans le but de prévenir la progression de ces dernières en cellules cancéreuses. La prévention tertiaire enfin concerne les patients ayant déjà développés un type de cancer et vise à prévenir le développement d'un autre type de cancer

Pour le cancer du col de l'utérus, la prévention primaire consiste essentiellement en la vaccination. Il existe actuellement deux vaccins prophylactiques disponibles depuis 2007 préparés à partir de particules virales produites par technologie recombinante connues sous le nom de *Virus Like Particles (VLP)*.

Le Gardasil développé par le laboratoire Merck est un vaccin dit quadrivalent car protège contre les sous types PVH 6, 11,16 et 18 en trois injections intramusculaires successives pendant 6 mois (Lexchin *et al.*, 2010 ; Monroy-garcia *et al.*, 2011). Le cervarix quant à lui est dit bivalent car protège contre les sous types PVH 16 et 18 uniquement. L'efficacité de ces vaccins est estimée à plus de 90% contre l'infection à PVH 16 et 18 et proche de 100% contre l'apparition des lésions précancéreuses chez les personnes non infectées.

Dans le cas du cancer du sein, la prévention primaire consiste à réduire l'exposition des personnes à risque (ayant des antécédents familiaux du même type de cancer ou d'autres types de cancers) aux autres facteurs développés ci-dessus favorisant la genèse de la maladie.

I.5. Traitements conventionnels du cancer

Les traitements du cancer visent à obtenir soit une guérison du patient, soit la plus longue survie sans rechute associée à une meilleure qualité de vie et un coût financier bas. Etant donné la multiplicité des types de cancers, il existe plusieurs méthodes de traitement. Le choix de la méthode la plus adaptée est fonction du type de cancer et du stade de la maladie au moment du diagnostic. Cependant, la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux constituent les principales méthodes de traitement les plus utilisées.

I.5.1. Chirurgie

C'est le traitement de première intention des tumeurs solides particulièrement dans les pays en voie de développement du fait de la faible disponibilité et accessibilité de la radiothérapie et chimiothérapie (Sanogo *et al.*, 2004). Elle consiste en une ablation de la tumeur et éventuellement de ses extensions. On distingue donc deux cas de figures : la tumorectomie et la mastectomie.

La tumorectomie consiste à éliminer la tumeur sans enlever la totalité du sein. Elle est néanmoins complétée par l'ablation d'une zone de sécurité péri-tumorale allant de quelques millimètres à deux centimètres permettant de limiter le risque de récurrence. La mastectomie quant à elle consiste en une ablation totale de la glande mammaire. Néanmoins, avec les progrès

technologiques enregistrés au cours des dernières décennies, elle est davantage devenue conservatrice. Toutefois, elle être pratiquée à des fins différentes. Ainsi, on distingue :

- La chirurgie diagnostique qui consiste à prélever une partie de la tumeur pour en effectuer le diagnostic précis par un examen microscopique et évaluer son potentiel évolutif.
- La chirurgie curative dont le principal objectif est la résection de la tumeur seule ou de l'organe la contenant
- La chirurgie d'exérèse ganglionnaire qui consiste en l'ablation des ganglions lymphatiques drainant la tumeur et dont l'examen histologique permet de déterminer l'extension régionale de la tumeur.
- La chirurgie prophylactique dont le but est d'enlever les lésions bénignes mais dont on connaît le potentiel d'évolution certain vers la malignité.

Bien qu'étant le traitement de première intention pour guérir de nombreux types de cancers, il est parfois impossible de pratiquer la chirurgie notamment dans les stades avancés (stades inopérables) de certaines tumeurs. Par ailleurs, des études ont montré que le taux de survie à 5 ans restait défavorable (Oba, 2009 ; Haasbeek *et al.*, 2008). De plus, les patients traités uniquement par la chirurgie à but curatif développent un cancer sur d'autres sites après l'intervention chirurgicale (foie, et poumons). Pour combler ces déficiences, les thérapeutes lui associent généralement la radio ou la chimiothérapie ou alors recourent complètement à des thérapies associant la chimiothérapie et la radiothérapie.

I.5.2. Radiothérapie

C'est un traitement local ou régional qui consiste à utiliser les radiations ionisantes pour léser ou détruire les cellules de la zone irradiée qu'elles soient normales ou cancéreuses. Ces radiations endommagent alors le matériel génétique desdites cellules ce qui les empêche de se diviser. Il est le traitement classique de nombreux cancers. En effet, le recours à la radiothérapie est nécessaire dans le traitement de près de 50% de cas de cancers diagnostiqués dans les pays développés (Barton *et al.*, 2014;). A l'inverse, ce chiffre est beaucoup plus élevé dans les pays en voie de développement à cause du stade avancé et de la localisation de la tumeur au moment du diagnostic (Bhadrasain, 2005, Sitas, 2008). Cependant, cette méthode de traitement est confrontée à deux principales difficultés dans les pays en voie de développement : l'insuffisance du plateau technique qui nécessite un matériel hétérogène et sophistiqué et du personnel qualifié (radio-oncologues et techniciens en radiologie). Par ailleurs, lorsque

disponible, son coût est généralement inaccessible pour la majorité des patients des pays à faible revenu.

La majorité des patients tolèrent relativement bien la radiothérapie. Le principal inconvénient est essentiellement lié à la sensibilité intrinsèque du tissu normal présent inévitablement dans la zone de traitement. Les membranes muqueuses deviennent œdémateuses et douloureuses, conduisant à une ulcération dans certains cas extrêmes et laissant alors des cicatrices. La faiblesse générale et les vomissements constituent d'autres effets secondaires qui peuvent cependant être surmontés par des soins infirmiers et des médicaments. Par ailleurs, elle est généralement utilisée en thérapie adjuvante après la chirurgie surtout dans les cas de résection incomplète de la tumeur (Gunderson et Tepper 2012).

I.5.3. Traitements médicamenteux

I.5.3.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en un traitement systémique contrairement aux deux méthodes précédentes qui se limitent à un traitement local ou locorégional. Elle apparaît donc comme le traitement de choix dans les stades avancés de nombreux types de cancers étant donné qu'elle permet d'atteindre les tumeurs d'emblée disséminées dans l'organisme (Twelves *et al.*, 2016). Elle présente l'avantage de pouvoir cibler simultanément les tumeurs solides et hématologiques. Elle est également utilisée en chimiothérapie néo-adjuvante pour réduire le volume de la tumeur ou augmenter la sensibilité des cellules à la radiothérapie (Lawrence *et al.*, 2003). Cependant, elle est rarement utilisée seule à but curatif. Les associations chirurgie-chimiothérapie et radiothérapie-chimiothérapie permettent une augmentation du taux de survie des patients (Horn et Sandler, 2009).

Les molécules classiquement utilisées en chimiothérapie peuvent être réparties en différentes familles selon leur mode d'action et/ou leur structure. On distingue ainsi :

- Les agents intercalant : ils agissent en s'intercalant entre les bases de l'ADN des noyaux des cellules tumorales provoquant ainsi des coupures irréparables de l'ADN. Ils regroupent principalement les antracyclines (la doxorubicine ses dérivés).
- Les poisons du fuseau mitotique qui bloquent la division cellulaire en agissant sur le cytosquelette du noyau. On retrouve dans cette famille les vinca-alcaloïdes (vincristine et vinblastine) et les taxanes.
- Les agents alkylants : Ils forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN et inhibent ainsi la réplication. On peut retrouver dans cette classe les

dérivés du moutarde (cyclophosphamide, chlorambucil, procarbazine) et les composés dérivés du platine (Cisplatine, Carboplatine) (Chabner et Roberts, 2005 ; Espinosa, 2003 ; Mann ; 2002).

- Les anti-métabolites inhibent la formation des bases azotées, précurseurs de l'acide nucléique en inhibant une ou plusieurs enzymes tels que la dihydrofolate réductase, la thymidilate transférase, la formyltransférase, la ribonucléotide réductase ou l'adénosine désaminase. Les antifolates, le methotrexate et les analogues nucléosidiques (5-fluorouracile) sont les plus utilisés dans cette classe.

La plupart des molécules anticancéreuses communément utilisées en chimiothérapie présentent deux inconvénients majeurs. Le 1^{er} est la résistance primaire ou acquise développée par les cellules cancéreuses lors du traitement par ces molécules. Cette résistance survient à travers différents mécanismes, comme la mutation de la β -tubuline ou la surexpression des pompes P-gp multi-drogue résistante ou pompes à efflux (Perez, 2009).

Le 2^{ème} est une toxicité non spécifique notamment la cardiotoxicité, la néphrotoxicité, et la toxicité hématologique. Cette toxicité non spécifique conduit à un faible index thérapeutique, bien que la majorité des molécules de la chimiothérapie soient utilisées à la dose maximale tolérée afin d'obtenir un effet thérapeutique (Chari, 2008).

Bien que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie soient les trois méthodes de traitement les plus utilisés pour le traitement de la grande majorité des cancers, certains types de cancers du sein et les leucémies myéloïdes chroniques nécessitent les traitements ciblés à cause des événements moléculaires impliqués dans la genèse et la progression ces derniers.

I.5.3.2. Traitements ciblés

➤ Inhibiteurs de tyrosine kinase

Le traitement de la LMC a évolué au fil du temps. Les premiers traitements étaient constitués de molécules utilisées en chimiothérapie, puis l'interféron alpha dont les effets indésirables importants (syndromes dépressif et pseudo-grippal) ont motivé la recherche de nouvelles molécules. A ce jour, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) constituent le traitement de première intention de la LMC. La figure 2 ci-dessous présente leur mécanisme d'action. Il ressort que les ITKs sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, plus ou moins spécifique de la tyrosine kinase chimérique caractéristique de la leucémie myéloïde chronique (Buchdunger *et al.*, 2002). En effets, l'activité tyrosine kinase constitutive du gène *BCR-ABL* lui confère la capacité d'activer les phosphorylations des substrats des tyrosines kinases ce qui

concourt à l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse, la survie et l'invasion. Le mécanisme d'action des ITKs est l'inhibition compétitive. Ils se fixent au site de fixation de l'ATP, empêchant ainsi le transfert du phosphate γ de l'ATP vers les substrats cibles. Cette inhibition des phosphorylations empêche alors l'activation des voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de survie et d'expansion cellulaire (angiogenèse, invasion) à l'origine du processus cancéreux.

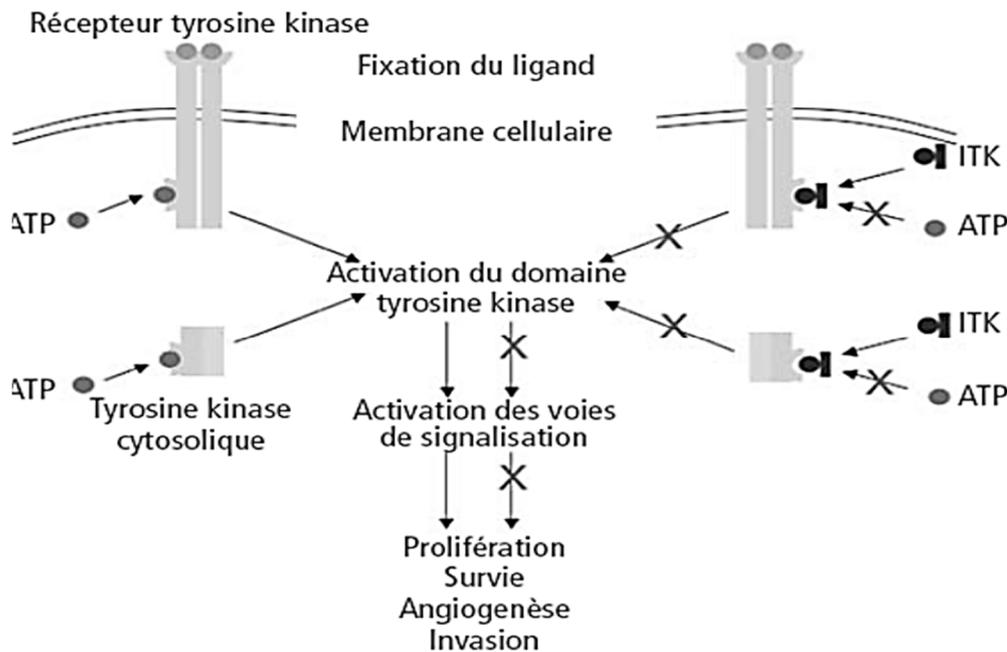


Figure 2 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (Merlin, 2008)

Les ITKs sont regroupés en générations en rapport avec la période de mise sur le marché. L'Imatinib, est le tout premier ITK mis sur le marché en 2001. Son avènement a révolutionné la prise en charge de LMC. En effet, les très bons résultats obtenus avec cette molécule ont permis de créer une alternative chez les patients ne pouvant bénéficier de la greffe de moelle osseuse, seul traitement curatif de la LMC à jusqu'à ce jour. Néanmoins l'apparition de résistances suite au traitement par l'Imatinib (résistance acquise) survenant chez 20% de patients et les patients ayant une réponse négative au traitement par l'Imatinib (résistance primaire) a motivé le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde génération (Rogers *et al.*, 2012). Le dasatinib et le nilotinib, les plus couramment utilisés comme traitement de première intention présentent l'avantage d'une meilleure tolérance et d'un meilleur taux de rémission.

➤ Hormonothérapie

A côté du traitement ciblé par les ITKs pour les LMC, l'hormonothérapie est également utilisée pour le traitement des cancers du sein dits hormono-sensibles à cause de la présence des récepteurs à l'œstradiol et /ou progestérone sur les noyaux des cellules cancéreuses. Cette thérapie consiste à priver les cellules tumorales en œstrogènes et/ou œstradiol soit en bloquant les récepteurs correspondants par les anti-œstrogènes, soit en inhibant l'aromatase, enzyme qui convertit les androgènes chez les femmes post ménopausées en œstrogènes (figure 3).

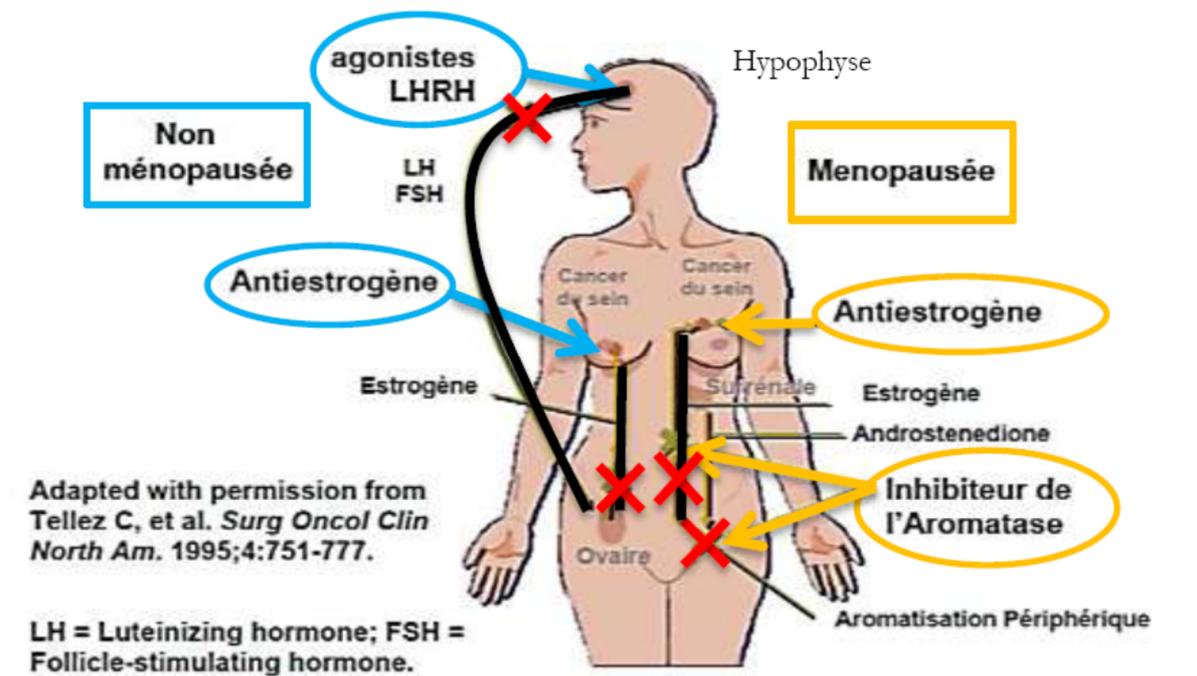


Figure 3 : Mécanisme d'action de l'hormonothérapie dans le traitement du cancer du sein.

I.5.4. Chimiothérapie anticancéreuse et échec thérapeutique : causes et mécanismes

Le développement de la chimiorésistance est un problème inhérent à la chimiothérapie anticancéreuse et constitue la principale cause d'échec de la chimiothérapie. La résistance constitue un manque de réponse à l'inhibition de la croissance tumorale induite par le médicament ; elle peut être inhérente à une sous-population de cellules cancéreuses hétérogènes ou être acquise en tant que réponse cellulaire à une exposition à un médicament (Chorawala *et al.*, 2012). Les mécanismes impliqués dans le développement de la chimiorésistance déjà décrits à nos jours sont nombreux. Toutefois, les mécanismes les plus couramment rencontrés sont :

- Une modification du transport membranaire impliquant la p-glycoprotéine, produit du gène *multidrug resistance* (MDR) et d'autres protéines associées

- Une activité accrue des mécanismes de réparation de l'ADN
- Une augmentation du niveau d'expression de la cible
- Une diminution de l'activation du médicament ou une dégradation accrue du médicament due à l'altération de l'expression des enzymes métabolisantes,
- **Modification du transport membranaire**

C'est l'une des formes de résistance contre la variété d'agents antinéoplasiques actuellement utilisés les plus rencontrées. Les principales protéines impliquées sont les protéines de la superfamille *ATP-Binding Cassette* (ABC). Elles agissent par extrusion du médicament maintenant ainsi sa concentration intracellulaire en dessous du seuil nécessaire pour détruire les cellules cancéreuses (Di Pietro *et al.*, 1999 ; Chorawala *et al.*, 2012). Ces protéines sont également impliquées dans la résistance aux maladies infectieuses telles que le syndrome de l'Imunodéficience Humaine (SIDA) et le paludisme (Gupta et Gollapudi, 1993 ; Srinivas *et al.*, 1998).

- **Amélioration des mécanismes de réparation de l'ADN**

Une autre façon pour les cellules de devenir résistantes, (mécanisme de résistance au cisplatine) est de développer une capacité accrue à éliminer les adduits cisplatine-ADN et à réparer les lésions induites par le cisplatine, grâce à l'action des protéines de réparation de l'ADN (Rosell *et al.*, 2004)

- **Augmentation du niveau d'expression de la cible**

Les médicaments tels que le méthotrexate inhibent les enzymes clés dans les voies contrôlant la prolifération. Ainsi, une transcription accrue du gène qui code pour l'enzyme peut conduire à des niveaux accrus de la cible. De ce fait, la concentration du médicament sera limitée, et donc incapable de bloquer l'enzyme supplémentaire qui est synthétisée permettant ainsi à la cellule de surmonter l'effet inhibiteur de la prolifération cellulaire du médicament. Cette augmentation de la concentration de la cible se fait soit par amplification du gène ou par une répllication sélective d'une région du chromosome aboutissant à des copies multiples du même gène (Mickley *et al.*, 1997).

Malgré les progrès réalisés au cours des dernières décennies sur le plan thérapeutique, la sévérité des effets secondaires couplée aux phénomènes de résistances primaire et acquise survenant avec les traitements médicamenteux suggère une recherche permanente de nouvelles molécules. A cet effet, le recours aux plantes naturelles constitue une approche intéressante à cause de leur diversité structurelle et leur disponibilité. De plus, cette source a prouvé son

efficacité dans le développement des médicaments anticancéreux au cours des dernières décennies (Newmann and Cragg, 2016).

I.6. Plantes médicinales et développement des médicaments anticancéreux : état des lieux

I.6.1. Premières molécules anti cancéreuses obtenues des plantes

Le rôle des plantes médicinales en chimiothérapie anticancéreuse débute dans les années 1940 avec la Podophyllotoxine isolée à partir des rhizomes de *Podophyllum peltatum*. L. (*Berberidae*). Cependant, sa forte cytotoxicité a conduit au développement des analogues structuraux tels que le teniposide et étoposide, tous inhibiteurs de la topoisomérase II et utilisés dans le traitement des cancers du poumon à petites cellules, du sein, des testicules et de l'ovaire.

Plus tard, une autre classe de molécules, les vinca-alcaloïdes, vincristine et la vinblastine isolées de *Catharantus roseus* G. Don. (*Apocynaceae*) plus connue sous le nom de pervenche de Madagascar a vu le jour. Ces vinca-alcaloïdes peuvent être préparés par héli-synthèse à partir de la catharanthine et la vindoline molécules plus simples et plus abondantes dans la plante. Ils sont indiqués dans le traitement des lymphomes et leucémies et appartiennent à la classe des poisons du fuseau mitotique. Ils inhibent l'assemblage de la tubuline en microtubules, composants essentiels et multifonctionnels de la cellule (Newmann and Cragg, 2005).

En 1960, une nouvelle famille de composés d'origine naturelle a vu le jour : les taxoïdes. Le chef de file de cette famille est le Paclitaxel (taxol). Il a été isolé des écorces de tronc de *Taxus brevifolia* Nutt. (*Taxaceae*) communément appelé l'if du pacifique. Comme les vinca-alcaloïdes, les taxoïdes agissent également sur le système tubuline-microtubules (Wani *et al.*, 1971).

La quatrième classe de molécules d'origine végétale utilisée en chimiothérapie anticancéreuse est celle de la Camptothécine et ses dérivés (irinotecan et topotecan) préparés par héli-synthèse et synthèse totale. Isolée de *Camptotheca acuminata* (*Nyssaceae*), la Camptothécine est un inhibiteur de la topo-isomérase I recommandée dans le traitement des cancers métastatiques de l'ovaire et colorectal (Wall *et al.*, 1966). Ces quatre classes de molécules naturelles ayant montré une efficacité certaine dans le traitement de différents types de cancers ont donné une impulsion à la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses à base de plantes.

I.6.2. Molécules anticancéreuses actuelles d'intérêt issues des plantes

Depuis lors, de nombreuses autres molécules ont prouvé leur efficacité dans la prise en charge thérapeutique de nombreux types de cancers et sont actuellement en utilisation (Newmann and Cragg, 2016). La littérature étant riche en données relatives à l'utilisation des plantes comme source de médicaments anticancéreux, nous nous attarderons sur quelques exemples ayant un intérêt pour notre travail.

L'Omacétaxine mépusuccinate est un dérivé semi-synthétique de l'Homoharringtonine (HHT), alcaloïde cytotoxique isolé pour la première fois de *Cephalotaxus harringtonia* (Knight ex J. Forbes) de la famille des *Cephalotaxaceae*. Ces deux molécules inhibent la synthèse protéique des cellules cancéreuses en agissant au niveau ribosomal (Pan *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été démontré que l'HHT induit l'apoptose et bloque la transition de la phase G₁ en phase S du cycle cellulaire chez les cellules cancéreuses (Hideji *et al.*, 2005). Elle a obtenu une approbation de la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2012 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques en phase chronique et accélérée après échec thérapeutique par deux ITKs (Kantarjian *et al.*, 2013).

Un autre exemple est celui de l'Elliptinium, un dérivé de l'ellipticine, isolée de *Bleekeria vitensis* A.C. Sm. actuellement commercialisé en France pour le traitement du cancer du sein (Cragg and Newman, 2005).

A côté de ces molécules, une grande majorité de molécules naturelles ayant montré un effet anticancéreux intéressant *in vivo* est actuellement en essais cliniques de phase I et II.

La curcumine par exemple est un diarylheptanoïde isolé des racines de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). Son mécanisme d'action cytotoxique et antiprolifératif inclut l'induction de l'apoptose et la régulation combinée de plusieurs voies de signalisation impliquant différentes cibles. Les travaux de Gaurisankar *et al.* (2010) ont montré que la curcumine modifiait l'expression génique des facteurs de transcription nucléaire (NFκB), de p53, des facteurs épidermiques de croissance (*EGF*) et vasculaire endothélial de croissance (*VEGF*). De même, elle module l'expression des gènes codant pour les molécules d'adhésion de surface (E-cadhérine et β-cadénine) et des protéines kinases cyclines dépendantes (*CDKs*) et p38MAPK). Les études cliniques utilisant la curcumine seule ou en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques ont été effectuées en Israël et aux USA sur les patients atteints de cancers colorectal et pancréatiques (Navneet *et al.*, 2008).

Un autre exemple est celui du Resvératrol, composé phénolique retrouvé dans plusieurs aliments tels que les raisins (*Vitis vinifera* L.; Vitaceae), noisettes (*Morus alba* L.; Moraceae), et les cacahuètes (*Arachis hypogaea* L.; Fabaceae). Le mécanisme d'action anticancéreux

inclue plusieurs cibles cellulaires notamment l'activation de la protéine P53, l'inhibition de la cyclo-oxygénase et des enzymes du complexe cytochrome P450 (Athar *et al.*, 2007; Bishayee *et al.*, 2010). Ce composé est actuellement en essais cliniques de phase I/II aux USA pour la prévention et le traitement du cancer du côlon.

L'acide bétulinique quant à lui est un triterpénoïde pentacyclique fréquemment retrouvé chez les plantes. Il a été purifié pour la première fois comme principe actif de *Ziziphus mauritiana* Lam de la famille des *Rhamnaceae*. Cependant, il peut être obtenu par semi-synthèse suite à l'oxydation de la bétuline, un analogue naturel plus abondant (Alakurtti *et al.*, 2006). Les études relatives au mécanisme d'action antiprolifératif et cytotoxique révèlent une induction de la voie apoptotique mitochondriale consécutive à la chute du potentiel membranaire mitochondrial et de la production d'espèces oxygénées réactives. (Laszczyk *et al.*, 2009). Par ailleurs, les études *in vivo* révèlent une inhibition sélective du développement des tumeurs chez les souris athymiques porteuses de xénogreffes de mélanomes humains (Pisha *et al.*, 1995). Ces études ont conduit à la formulation d'une pommade qui fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase I/II pour le traitement des nævi dysplasiques et dysplasie modérée à sévère.

II. Généralités sur le stress oxydatif

II.1. Définition et origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être défini comme, un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les pro-oxydantes en faveur de ces derniers, avec comme conséquences des altérations du fonctionnement cellulaire, qui sont à l'origine de nombreuses pathologies (Mittler 2002). En effet, l'oxygène est une molécule indispensable au fonctionnement cellulaire, puisqu'elle est un substrat nécessaire à la chaîne respiratoire lors de la production d'énergie. Cependant, ce processus métabolique induit la production de radicaux libres. En effet, ces derniers contribuent au bon fonctionnement cellulaire lorsqu'ils qui sont maintenus en quantité adéquate. En revanche, lorsque l'équilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives est rompue, on parle alors de stress oxydatif (Mittler, 2002).

II.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique, ce qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules (Apel et Hirt, 2004). Les radicaux libres sont ainsi à l'origine d'une « réaction en chaîne » au cours de laquelle, un

radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui « arrachant » son électron et « la molécule attaquée » devient alors elle-même un radical libre. Ces radicaux sont particulièrement dangereux pour l'organisme à cause des dommages qu'ils sont capables de causer lorsqu'ils réagissent avec des composantes cellulaires importantes, tels que l'ADN ou la membrane cellulaire (Apel et Hirt, 2004).

II.2.1. Les types de réactions radicalaires

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont impliquées dans une diversité de réactions oxydatives. Ces réactions sont responsables des effets biologiques médiés par ces radicaux libres. Ainsi, il est impératif de comprendre les fondements chimiques de ces différentes réactions (Barber et Harris, 1994). Du fait de leur forte réactivité, les radicaux libres ne réagissent généralement pas avec une grande sélectivité et la complexité des systèmes biologiques complique d'avantage l'étude des types de réactions. Cependant, trois grandes classes de réactions radicalaires ont été identifiées. Il s'agit des réactions d'abstractions d'atomes, les additions de radicaux libres et les réactions de transferts d'électrons (Barber et Harris, 1994).

II.2.1.1 Les réactions d'abstractions d'atomes

Un radical libre peut abstraire un atome d'hydrogène d'une liaison C-H d'une biomolécule, telle qu'une molécule lipidique (LH). L'atome d'hydrogène n'ayant qu'un seul électron, la molécule de carbone du lipide aura un électron non apparié après élimination de cet atome. Cette réaction sera à l'origine de la formation du radical (L \cdot) (Phaniendra *et al.*, 2015). Ce type de réaction est récurrent en présence du radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) qui arrache généralement un atome d'hydrogène sur la chaîne latérale hydrocarbonée des acides gras polyinsaturés initiant ainsi le cycle de peroxydation lipidique dans les systèmes biologiques (Phaniendra *et al.*, 2015).

II.2.1.2 Les réactions d'additions de radicaux libres

Il existe deux types de réactions d'addition de radicaux libres, la première se produit entre un radical libre et une macromolécule biologique normale, et la seconde se produit entre deux radicaux libres (Phaniendra *et al.*, 2015).

II.2.1.3. Les réactions de transferts d'électrons

Dans les réactions de transferts d'électrons, un radical libre agit comme agent réducteur, en faisant don d'un électron à une molécule stable. Après avoir reçu l'électron, la molécule est déstabilisée et cette dernière devient à son tour un radical libre (Phaniendra *et al.*, 2015).

II.2.1.4. Réactions d'addition entre un radical libre et une molécule stable

Dans ce type de réaction, le radical libre (A) se lie à une molécule stable (B) pour former une macromolécule instable. Car cette molécule comporte un électron non apparié initialement associé au radical libre A. Cette réaction est représentée de façon suivante : $A^{\bullet} + B \rightarrow [A-B]^{\bullet}$. L'exemple de l'addition du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) avec le 5,5-diméthylpyrroline-N-oxyde (DMPO) pour former un complexe radical DMPO-hydroxyl [$\text{DMPO}^{\bullet}\text{-OH}$] illustre parfaitement ce type de réaction (Agarwal *et al.*, 2007). Un autre exemple d'addition de radicaux libres est la réaction entre le radical hydroxyle et la base guanine de l'ADN. Dans cette réaction, un radical hydroxyle est ajouté à la guanine (G) formant un radical intermédiaire, qui est ensuite converti en 8-hydroxyguanine. La molécule de 8-hydroxy-guanine (8-OH-G) ou la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG) est un biomarqueur couramment utilisé pour évaluer les dommages oxydatifs sur l'ADN (Dizdaroglu et Jaruga, 2012).

II.2.2. Les différentes espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres sont formés régulièrement à partir de l' O_2 par gain d'électron. Les espèces réactives de l'oxygène regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène, mais également les composés non radicalaires (hydroperoxydes : ROOH et H_2O_2). Les ERO les plus courants sont l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH) et les radicaux peroxydes (RO_2) (Fang *et al.*, 2002).

II.2.2.1. L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

L'addition d'un électron au dioxygène forme le radical anion superoxyde. Il est considéré comme l'ERO « primaire », capable de réagir avec d'autres molécules pour former les ERO « secondaires » (OH , H_2O_2). Il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques par des systèmes d'oxydases comme la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les peroxydases au niveau des mitochondries (Valko *et al.*, 2007). Le superoxyde est une ERO largement étudiée en biomédecine. Il joue un rôle important dans les processus physiologiques et physiopathologiques. Par exemple, le radical

superoxyde produit par le NADPH oxydase phagocytaire lors du *burst* respiratoire est un important précurseur de la formation d'ERO plus puissants qui sont nécessaires pour la destruction des microorganismes pathogènes. Une dérégulation de la synthèse de ce radical chez l'homme entraîne une susceptibilité accrue aux infections. Toutefois, il a été démontré que des troubles de la formation (surproduction) de superoxydes concourent à la formation des lésions tissulaires (Phaniendra *et al.*, 2015). Le superoxyde réagit avec l'oxyde nitrique ($\cdot\text{NO}$) pour former un anion peroxynitrite (ONOO^-) un oxydant puissant qui cause des dommages à diverses biomolécules (Apel et Hirt, 2004). En présence d'ions métalliques, tels que les ions ferreux, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent conduire à la formation d'un radical hydroxyle : une ERO très puissante capable d'endommager tout le spectre des biomolécules

II.2.2.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique. Il se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène, capable de diffuser à travers les membranes biologiques (Sies, 1997). Le peroxyde d'hydrogène peut aussi être produit par des réactions faisant intervenir des oxydases comme la xanthine oxydase et les acides aminés oxydases (Kelley *et al.*, 2010). Certaines enzymes, telles que les protéines phosphatases, peuvent être directement inhibées par le peroxyde d'hydrogène par oxydation de leurs groupements thiols. Le peroxyde d'hydrogène en concentrations élevées cause des lésions tissulaires et cellulaires (McCutchan *et al.*, 1990). Plusieurs mécanismes expliquent les effets néfastes du peroxyde d'hydrogène dans les cellules ou les tissus. La réaction du peroxyde d'hydrogène avec le chlorure (Cl^-) génère de l'acide hypochloreux (HOCl) qui est un oxydant puissant. Cette réaction est catalysée par myeloperoxydase. En outre, le peroxyde d'hydrogène est peu réactif mais peut se combiner avec des métaux tels que le fer et le cuivre pour générer un composé hautement réactif : le radical hydroxyle (OH) (Sies, 1997).

II.2.2.3. Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

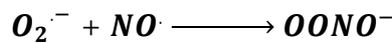
Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est le radical libre le plus réactif. Il peut être formé à partir du peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le cuivre ou le fer. Les radicaux hydroxyles ont le potentiel électronique le plus élevé (2310 mV) et sont extrêmement réactifs (Korycka-Dahl et Richardson, 1978). Dans les composés saturés, un radical hydroxyle capte un atome d'hydrogène de la liaison carbone-hydrogène la plus faible pour donner un radical libre. Les radicaux libres néoformés peuvent réagir avec les lipides, les polypeptides, les protéines et l'ADN, spécialement la thiamine et la guanosine (Ashok et Ali, 1999).

II.2.2.4. Le monoxyde d'azote et le dioxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO \cdot) est un radical libre avec un électron apparié. Il est formé à partir de L-arginine par l'enzyme NO synthétase (Fang *et al.*, 2002). La production excessive du NO \cdot est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques et neurodégénératives comme l'arthrite rhumatoïde et l'inflammation du colon.

II.2.2.5. L'anion peroxyde d'azote (OONO \cdot)

Le monoxyde d'azote peut réagir avec l'anion superoxyde pour générer du peroxyde d'azote.



L'anion peroxyde d'azote est une espèce cytotoxique qui cause des lésions tissulaires et oxyde les lipoprotéines à faible densité (LDL). Il cause des dommages tissulaires générés sur les sites d'inflammation (Papavasiliou, 1999). Il est impliqué dans les désordres neurodégénératifs ainsi que plusieurs affections rénales (Knight, 1999). Le peroxyde d'azote (OONO \cdot) peut causer la modification et l'oxydation des protéines et les bases de l'ADN (Koltover, 2010).

II.2.2.6. Les radicaux peroxydes et alcoxydes

Les radicaux peroxydes (RO $_2\cdot$) sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur le carbone (R \cdot). Les radicaux R \cdot sont issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons) (Sies, 1997). Les radicaux RO $_2\cdot$ peuvent également se décomposer avant de réagir avec un substrat en donnant des radicaux superoxydes (Sies, 2013). Les peroxydes des lipides (LOOH) sont produits au cours de la peroxydation lipidique. Lorsqu'un acide gras polyinsaturé cible (LH) est attaqué par un radical libre (initiation), l'oxydation de cet acide gras génère un radical acide gras (L \cdot) qui réagit rapidement avec l'oxygène pour former le radical peroxyde d'acide gras (LOO \cdot). Ces derniers sont à l'origine d'une réaction en chaîne, en oxydant d'autres molécules d'acides gras polyinsaturés pour produire des hydroperoxydes de lipides (LOOH). Ces hydroperoxydes peuvent se transformer en des molécules beaucoup plus réactives comme les peroxydes de lipides, les alcoxydes de lipides, et les aldéhydes (la malondialdéhyde : MDA) (Sies, 2013).

III. Plantes médicinales et propriétés anti-oxydantes et anticancéreuses

III.1. Propriétés anti-oxydantes des plantes médicinales

III.1.1. Mode d'action antioxydant des plantes médicinales

Les antioxydants sont des substances qui, lorsque présentes en concentration faible par rapport à un substrat oxydable, retarde de façon significative ou empêche l'oxydation dudit substrat (Valko *et al.*, 2007). De nombreuses études ont montré que les plantes médicinales sont dotées de propriétés anti-oxydantes liées à la présence de certaines classes de métabolites secondaires (Tatsadjieu *et al.*, 2003, Etoundi *et al.*, 2013, Kocak *et al.*, 2016). Toutefois, les polyphénols constituent la plus vaste famille des métabolites secondaires dotés de bonnes propriétés anti-oxydantes et dont les mécanismes d'action sont le plus élucidés (Beta *et al.* 2005). Les polyphénols et les autres biomolécules des plantes exercent leur effet antioxydant suivant plusieurs mécanismes que sont :

1. Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène ;
2. L'inhibition des enzymes génératrices d'ERO telles que la xanthine oxydase,
3. La chélation des ions métalliques de transition libres, responsables de la production des ERO
4. L'induction de la biosynthèse d'enzymes anti-oxydantes

III.1.1.1 Action anti-oxydante des plantes médicinales par piégeage des radicaux libres

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes :

- La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle rencontrée dans les cinétiques rapides de certains acides et dérivés phénoliques et
- La libération d'un électron caractéristique des cinétiques lentes propres aux dérivés glycosylés et aux anthocyanes (Huang *et al.*, 2005, De gaulejac *et al.*, 1999).

Parmi les métabolites secondaires, les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres en raison de la présence dans leur structure des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre. Par ailleurs, la présence d'un système aromatique stabilisé par résonance leur confère également une grande capacité piègeuse de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (Dai et Mumper, 2010). L'équation ci-dessous résume le mécanisme de piégeage d'un radical libre par un antioxydant (radical aryloxy)

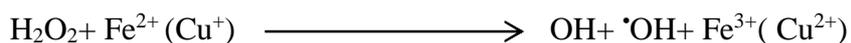


X•: Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ;

Ar-O•: radical aryloxyde

III.1.1.2. Action anti-oxydante des plantes médicinales par chélation des métaux lourds

Les métabolites secondaires particulièrement les polyphénols des plantes médicinales contribuent également à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le cuivre, le fer. En effet, outre leurs fonctions physiologiques (constituant des hémoprotéines et cofacteurs d'enzymes antioxydantes), les ions fer et cuivre peuvent être responsables de la production du radical OH• par la réduction du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton présentée ci-dessous :



Les polyphénols sont non seulement capables de piéger les ERO en les réduisant, mais aussi en formant avec les ions du fer et du cuivre des complexes inertes ou des complexes de coordination. Cette activité chélatrice requiert la présence dans la structure de l'antioxydant de certains déterminants structuraux tels que :

- Un noyau catéchol sur le cycle B
- Les groupe 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- Le groupe 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycle A et C (Pietta, 2000 ; Heim *et al.*, 2002).

Les flavonoïdes répondent à tous ces différents critères, ce qui justifie leurs excellentes propriétés chélatrices de métaux de transition.

III.1.1.3 Action anti-oxydante des plantes médicinales par inhibition des enzymes génératrices de radicaux libres

Les polyphénols possèdent une grande affinité pour de nombreuses protéines (Havsteen, 2002 ; Dangles et Dufour, 2008). Cette affinité leur confère la capacité de se lier à de nombreuses protéines globulaires notamment les enzymes à travers les interactions de van der Waals des cycles aromatiques et les liaisons hydrogènes des hydroxyles phénoliques (Rolo-Naranjo *et al.*, 2009). Ainsi, ils sont capables d'inhiber les enzymes génératrices d'espèces réactives de l'oxygène tels que le radical superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Les études ont montré que les flavonoïdes ont la capacité d'inhiber la xanthine oxydase, enzyme considérée

comme une source importante du radical superoxyde produit au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique (Nagao *et al.*, 1999). Deux principaux mécanismes d'action ont été mis en évidence, à savoir la formation d'un complexe inhibiteur-enzyme (compétition avec le substrat la xanthine) et la réduction du radical superoxyde résiduel (Day *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été démontré que les flavonoïdes ont également la capacité d'inhiber les métalloenzymes lipooxygénase, myéloperoxydase et les NADPH oxydases génératrices d'espèces réactives de l'oxygène (Dangles et Dufour, 2008 ; Dangles, 2012).

III.1.1.4 Action anti-oxydante des plantes médicinales par induction de la biosynthèse d'enzymes anti-oxydantes

Le système de défense enzymatique antioxydant inclut principalement la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion peroxydase. L'importance de ces enzymes réside dans leurs rôles clé et complémentaires dans l'élimination des espèces hautement réactives comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène empêchant ainsi les dommages potentiels au niveau des molécules biologiques. Cette importance s'explique également par la prédominance des études qui montrent les effets des extraits de plantes médicinales sur l'activité de ces dernières (Anantachoke *et al.*, 2016 ; Skaba *et al.*, 2016 ; Woo *et al.*, 2017). D'autres études ont mis en évidence leur capacité à stimuler la synthèse des ARN messagers de ces enzymes et par conséquent à augmenter leur niveau d'expression (Skaba *et al.*, 2016).

III.1.1.2. Méthodes d'évaluation in vitro de la capacité anti-oxydante des plantes médicinales

La complexité et la diversité des processus d'oxydation et des molécules anti-oxydantes ont conduit au développement d'une multitude de tests pour évaluer la capacité anti-oxydante des extraits végétaux et produits alimentaires. A cet effet, le champ d'investigation relatif à l'étude des propriétés anti-radicalaire et anti-oxydante est vaste. Toutefois, les méthodes utilisées peuvent être regroupées en deux grandes classes ; les méthodes non compétitives et les méthodes compétitives.

Les premières consistent en la mesure de la capacité d'un antioxydant à réduire un radical libre (par transfert d'électron ou de proton) ou un métal de transition (par transfert d'électron) en absence de substrat oxydable.

Les secondes quant à elles, impliquent l'utilisation d'un substrat oxydable et consistent à mesurer l'effet inhibiteur de l'antioxydant sur l'oxydation de ce dernier.

➤ **Méthodes non compétitives ou indirectes**

Elles consistent à mesurer, en absence de substrat oxydable, la capacité d'un antioxydant à réduire un radical artificiel stable via un transfert d'hydrogène ou électron ou d'un métal de transition simplement par transfert d'électrons. Les méthodes du DPPH et du radical ABTS⁺ sont les plus utilisées pour l'évaluation du pouvoir de piégeage des radicaux libres des extraits.

Bien qu'elles soient simples à mettre en œuvre, elles présentent l'inconvénient de ne pas fournir de mécanisme compétitif entre l'antioxydant et le substrat oxydable pour réduire les espèces oxydantes. Or par définition, un antioxydant est une substance dont la présence à faible concentration comparativement à celle d'un substrat oxydable, empêche ou retarde l'oxydation dudit substrat (Halliwell et Gutteridge, 1995).

Par ailleurs, la méthode du DPPH telle que réalisée en milieu alcoolique n'est pas représentative d'un phénomène oxydatif naturel par transfert d'hydrogène (Ozcelik *et al.*, 2003). En outre, l'absorbance peut être diminuée par la lumière, l'oxygène et le pH.

D'autre part, la présence de traces de cations métalliques dans les produits naturels et les liquides biologiques entraîne une réduction par transfert d'électrons de l'ABTS⁺ en ABTS faussant ainsi les résultats (Ou *et al.*, 2001).

➤ **Méthodes compétitives ou directes**

Contrairement aux précédentes, les méthodes compétitives impliquent l'utilisation d'un substrat oxydable et mesurent la capacité d'un antioxydant à inhiber leur oxydation. D'un point de vue cinétique, deux différentes approches de mesure peuvent être utilisées : la mesure de produits d'oxydation résultants de l'oxydation artificielle d'un substrat, ou le suivi direct de la détérioration du substrat oxydable.

• **Mesure des produits d'oxydation**

Les méthodes rencontrées dans ce groupe mesurent l'apparition des produits d'oxydation. On peut citer au rang de ces dernières : le titrage iodométrique des hydroperoxydes et peroxyde d'hydrogène (Lea, 1931), la mesure dans l'ultraviolet de diènes conjugués (Pryor *et al.*, 1993), et l'essai de l'acide thiobarbiturique (Kohn et Liversedge, 1944). Bien que les méthodes basées sur une mesure de la formation de produits d'oxydation présentent de nombreux avantages, elles sont néanmoins limitées par le fait qu'il n'y a pas de marqueur universel de l'oxydation. De plus, les produits d'oxydation sont généralement instables conduisant à la formation d'autres produits dits secondaires. Tout ceci rend la méthode

laborieuse à cause de la nécessité d'évaluer aussi bien les produits primaires que secondaires pour avoir une idée réelle de la capacité anti-oxydante du composé d'intérêt.

- **Mesure directe de la détérioration du substrat oxydable**

A l'inverse de la précédente approche, celle utilisée dans ce cas est la mesure de la disparition du substrat oxydable (Ou *et al.*, 2001). Les méthodes les plus utilisées basées sur cette approche sont : la méthode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), et le blanchiment du β -carotène (Tubaro *et al.*, 1996). Le principal inconvénient de ces méthodes est la concentration d'antioxydant utilisée. En effet, les concentrations utilisées sont généralement similaires voire supérieures à celles du substrat oxydable ; ce qui ne répond plus à la définition de l'antioxydant selon Halliwell et gutteridge (1995). Par ailleurs, les substrats (fluorescents) oxydables développés et en utilisation ne sont pas représentatifs des phénomènes d'oxydation naturelle.

III.2. Propriétés anticancéreuses des plantes médicinales

III.2.1. Mécanisme d'action anticancéreux des extraits de plantes

Les molécules naturelles et/ou leurs dérivés hémi-synthétiques ont prouvé leur efficacité dans le traitement des cancers au cours de dernières décennies (Newmann et Cragg, 2016). Les mécanismes d'action mis en évidence jusqu'à ce jour sont variés. Toutefois, les plus retrouvés sont l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.

- **Rappels sur le cycle cellulaire et sa régulation**

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit depuis sa formation après la division d'une cellule mère jusqu'au moment où elle a fini de se diviser en deux cellules filles, ayant les mêmes caractères morphologiques et physiologiques de la cellule mère. Il est contrôlé de manière rigoureuse en quatre points principaux appelés point de non-retour. En effet, une fois que ces points sont franchis, la progression dans le cycle continue quoi qu'il advienne. Ces différents points de contrôle sont donc répartis sur les quatre phases du cycle cellulaire (G₁, S, G₂, M). Le premier point de contrôle R empêche l'entrée en phase S ; une fois cet obstacle franchi, la cellule est autorisée à répliquer son ADN. Le deuxième point (S) a pour rôle d'arrêter la réplication de l'ADN si elle ne se déroule pas correctement tandis que le troisième empêche la cellule d'entrer en mitose. Quant au quatrième point, il empêche l'achèvement de la mitose, principalement la non migration vers les pôles du fuseau mitotique

et la non séparation des chromosomes en deux lots comme c'est le cas lors d'une anaphase normale. En outre, le cycle cellulaire est contrôlé par des complexes appelés CDKs/cyclines, dont l'activité est également régulée par d'autres protéines. La figure 4 ci-dessous présente une vue de la régulation de ces complexes ainsi que leur activité en fonction des moments du cycle.

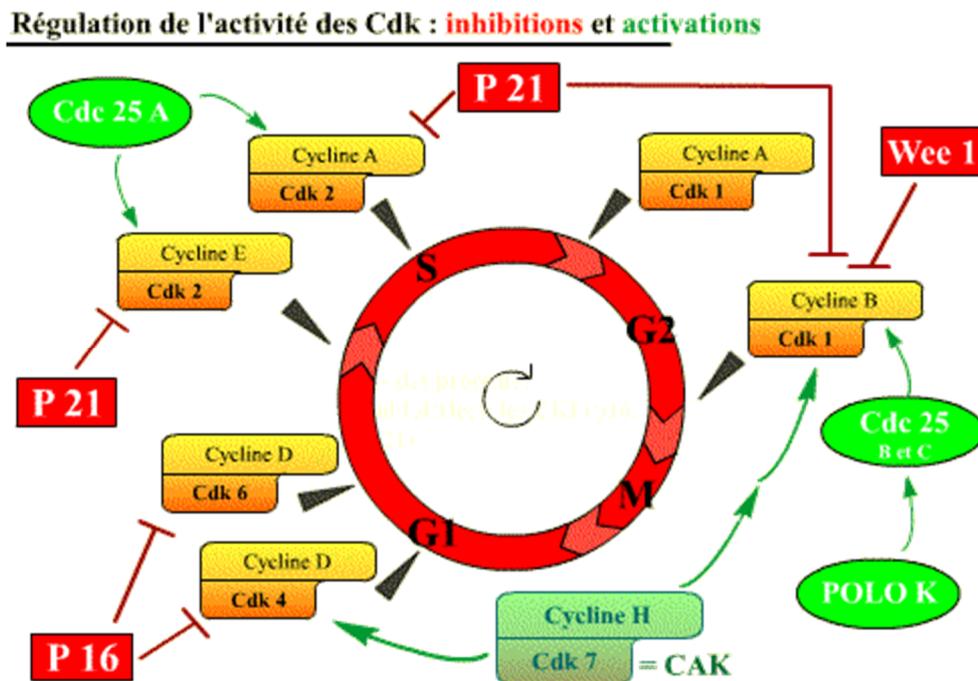


Figure 4: Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk-cyclines (Lebart, 2011).

Ainsi, pendant la phase G₁, les complexes cycline D/Cdk 4 et cycline D/Cdk 6 phosphorylent et inactivent la protéine Rb ("Rétinoblastoma protein"), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E₂F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G₁/S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A, entre autres). Cependant, ces complexes sont des inhibiteurs physiologiques la protéine P16 qui est responsable de leur inactivation une fois leur rôle achevé. Lors de la transition G₁/S, le complexe cycline E/Cdk 2 phosphoryle la protéine du rétinoblastome (pRb).

Pendant la phase S, le complexe Cycline A / Cdk 2 phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G₁ arrêtant ainsi la dégradation de la cycline B qui s'accumule. Cette dernière associée à la Cdk dirige la transition G₂/M en phosphorylant de nombreux substrats ce qui stimule la progression de la mitose. La protéine P₂₁ est l'inhibiteur physiologique de ces

complexes tandis que la protéine Cdc 25 les active. En effet, Cdc 25 en les déphosphorylant les sérines/thréonines des Cdks permet l'entrée de l'ATP dans son site activant alors le complexe. A l'inverse la protéine Wee 1 phosphoryle la Cdk sur la Thréonine 14 et la Tyrosine 15 ce qui provoque une répulsion électrostatique qui interdit l'entrée de l'ATP dans son site.

III.2.1.1. L'arrêt du cycle cellulaire par les extraits de plantes

De nombreux travaux rapportent l'arrêt du cycle cellulaire comme mécanisme sous-jacent de l'effet antiprolifératif des extraits de plantes. Ainsi, les travaux de Guo *et al.* (2007) ont démontré que l'aloé-emodine isolée des racines de *Rheum palmatum* inhibe la prolifération des cellules HeLa via un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M médié par une diminution du niveau d'expression de la cycline A et de la Cdk2 et une stimulation de l'expression de la cycline B1 et de la *Cdk1*. De même, Tian et Zang, (2015), ont montré que l'extrait éthanolique de feuilles de *Achillea falcata* inhibait la croissance des cellules du cancer du col de l'utérus par un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M. Par ailleurs, Khazaei *et al.* (2017) ont rapporté l'effet inhibiteur de la croissance des cellules du cancer du sein (MCF7 et MDA-MB231) par les extraits de la fleur *Allium atrovioleaceum* via un arrêt du cycle cellulaire et une diminution du niveau d'expression de *CDK1*.

- **Rappels sur l'apoptose**

L'apoptose est un processus physiologique génétiquement programmé par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal chez les organismes multicellulaires. Elle apparaît donc nécessaire à la survie des organismes multicellulaires et en constante équilibre avec la prolifération cellulaire. Il existe deux principales voies de signalisation qui contrôlent le déroulement de l'apoptose : une voie mitochondriale (intrinsèque) et une voie extrinsèque (encore appelée voie des récepteurs extracellulaires). Toutefois, il convient de noter que l'apoptose survient plus souvent par voie mitochondriale à cause du rôle central de la mitochondrie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. De ce fait, cette voie est la plus étudiée en rapport avec le mécanisme d'action antiprolifératif des extraits de plantes.

La voie apoptotique mitochondriale peut être induite aussi bien par les stimuli extracellulaires (radiations UV ou gamma) qu'intracellulaires (stress oxydatif, absence de facteurs de croissance). Ces stimuli vont entraîner une perturbation de la membrane mitochondriale qui conduit à la fragmentation de l'ADN soit par le biais des caspases soit indépendamment de celles-ci (Proskuryakov *et al.*, 2003). La perméabilisation de la membrane

mitochondriale permet la libération dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques, qui se localisent normalement dans l'espace intermembranaire mitochondrial : le cytochrome C, le facteur AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et la protéine Smac-DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor Apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi*) (Schafer et Kornbluth, 2006).

Au cours de l'activation de cette voie, il y a formation de l'apoptosome constitué du cytochrome *c*, du facteur Apaf-1 et de la pro-caspase-9. En présence du dATP, le cyt *c* cytosolique se fixe sur l'Apaf-1 et initialise ainsi, la multimérisation de ce dernier. Suite à des changements conformationnels, il y a exposition du domaine *CARD* dans la partie N-terminale de l'Apaf-1, ce qui permet des interactions avec d'autres sites *CARD*, notamment celui présent dans la pro-caspase-9 (Rodriguez et Lazebnik, 1999). Il y a formation ainsi d'un complexe heptamérique, l'apoptosome (Figure 5) qui va dégrader la molécule d'ADN conduisant ainsi à la mort cellulaire.

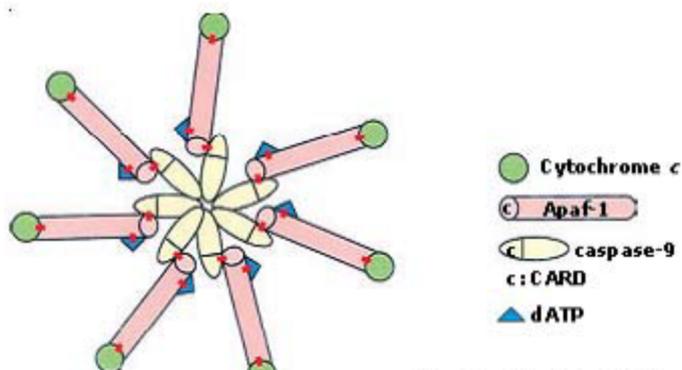


Figure 5: Assemblage de l'apoptosome (Ho et Hawkins, 2005)

Parallèlement à la voie caspases dépendante, il existe une autre voie indépendante des caspases qui implique la libération des facteurs apoptogènes AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et l'endonucléase G dans le cytosol,

La voie extrinsèque quant à elle nécessite l'activation des récepteurs extracellulaires tels que les récepteurs Fas/CD95, *TNF* et *TRAIL* par des ligands spécifiques. La fixation du ligand conduit à l'oligomérisation du complexe ligand/récepteur et le recrutement de molécules adaptatrices au niveau du domaine intracellulaire du récepteur (Schmitz *et al.*, 2000). Des caspases initiatrices telles que les pro-caspases 8 ou 10, s'associent au complexe récepteur/ligand par le biais des molécules adaptatrices et ils forment ainsi le complexe DISC. La pro-caspase engagée est activée par protéolyse. La caspase initiatrice mature active à son tour les caspases effectrices -3 ou -7 responsables de l'exécution de la mort programmée.

Au départ, les deux voies semblaient fonctionner de manière indépendante. Récemment, il a été démontré qu'il existe une liaison entre elles à travers les protéines de la famille Bcl-2. En effet, la caspase-8 pourrait également intervenir dans le clivage protéolytique de la protéine pro-apoptotique *Bid*, membre de la famille des protéines Bcl-2. La protéine *Bid* migrerait alors vers la mitochondrie, provoquant ainsi la libération du cytochrome *c* dans le cytoplasme, ce qui pourrait avoir pour conséquence l'activation de la caspase-9 (figure 6) (Rostovtseva *et al.*, 2004).

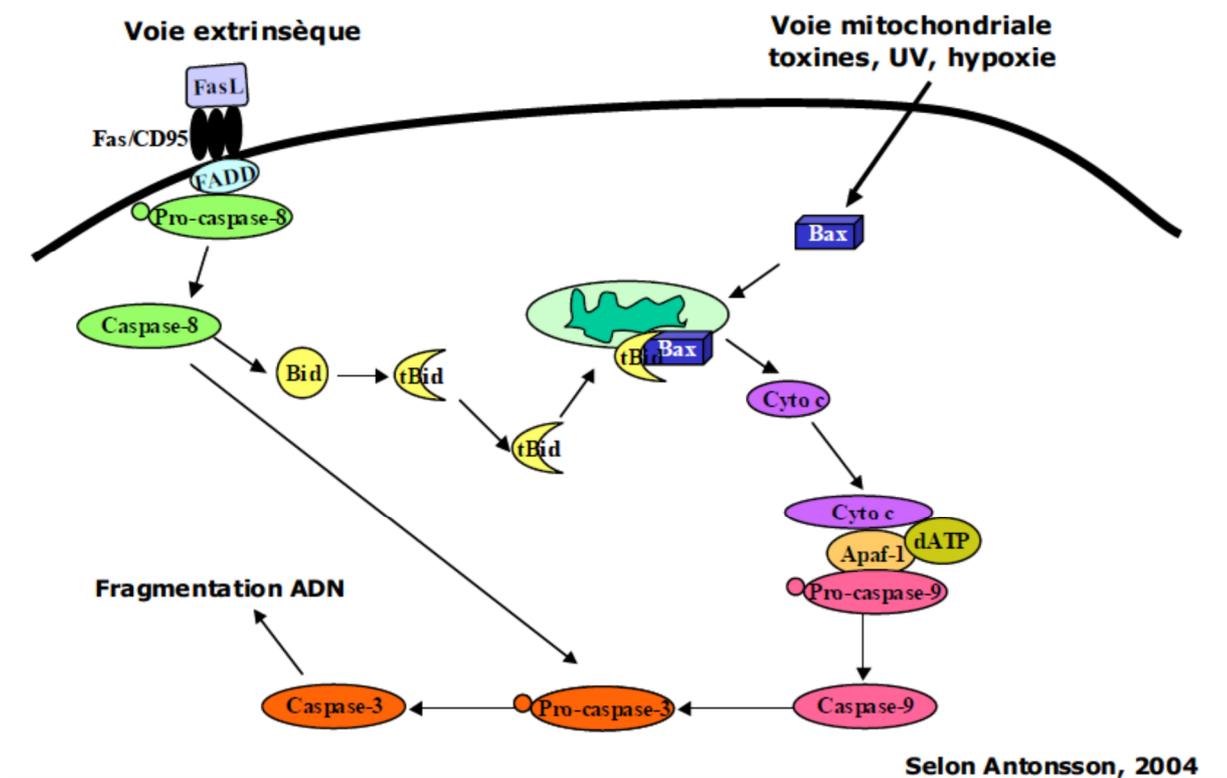


Figure 6: Interconnexion entre les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque L'induction de l'apoptose par les extraits de plantes

III.2.1.2. Induction de l'apoptose

L'une des caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses est la capacité à échapper à l'apoptose grâce à leur insensibilité aux signaux de mort. Ainsi, l'induction de l'apoptose est l'un des mécanismes d'action privilégiés des médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. De nombreux travaux relatifs à l'étude des propriétés anticancéreuses des plantes soulignent leur habilité à induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses (Ismail *et al.*, 2005 ; Yan *et al.*, 2013 ; Uto *et al.*, 2013). La famille Bcl-2 comprend les protéines pro-

apoptotiques (Bax et Bak) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'apoptose. A cet effet, une littérature abondante reporte les effets des extraits de plantes sur leur niveau d'expression (Kamga *et al.*, 2017; Pintusorn *et al.*, 2014)

Par ailleurs, les effets les plus étudiés sont relatifs au potentiel membranaire mitochondrial, à la production d'espèces réactives de l'oxygène et au niveau d'expression des protéines de la famille Bcl-2 (Pieme *et al.*, 2013 ; Kuete *et al.*, 2013).

III.2.2. Méthodes d'évaluation des propriétés antiprolifératives des plantes médicinales *in vitro*

Plusieurs de méthodes ont été développées pour évaluer *in vitro* l'effet cytotoxique des substances potentiellement dotées de propriétés anticancéreuses aussi bien pour les molécules pures que pour les extraits de plantes. Selon la complexité de la méthode, elles peuvent être regroupées en quatre grandes classes en fonction de la complexité de la méthode :

- Les méthodes simples qui mesurent la viabilité cellulaire après exposition des cellules au composé d'intérêt par simple énumération,
- Les méthodes indirectes qui mesurent la capacité de la cellule à réduire les sels tels que les sels de tétrazolium, la sulforhodamine B, l'Alamar bleu ou la capacité à générer l'ATP.
- Les méthodes plus complexes mesurant la capacité des cellules à incorporer un traceur radio-marqué comme la thymidine dans leur ADN
- Les essais clonogéniques

III.2.2.1 Méthodes simples

Comme leur nom l'indique, elles sont simples à mettre en œuvre et peu coûteuses (Fotakis et Timbrell, 2006). Elles mesurent la capacité des cellules à exclure ou incorporer un colorant et par conséquent évaluent l'intégrité membranaire des cellules (Rampersad, 2012). Plusieurs colorants peuvent être utilisés à cet effet (l'érythrosine, le naphthalène noir) Toutefois, le plus utilisé dans ce groupe est le bleu trypan. La méthode d'exclusion au bleu trypan est basée sur la capacité des cellules vivantes à relarguer ce colorant de haut poids moléculaire contrairement aux cellules mortes qui se laissent pénétrer par ce dernier du fait de la perte de l'intégrité membranaire. Le mécanisme d'exclusion de ce colorant est un mécanisme ATP-dépendant nécessitant de l'énergie. Ainsi, seules les cellules vivantes capables de produire de l'énergie en sont capables. Ces dernières apparaissent alors incolores à l'observation microscopique tandis que les cellules mortes ont une coloration bleue. Ces méthodes sont

fastidieuses et longues, peu précises car des erreurs peuvent survenir lors du comptage des cellules. De plus, les colorants utilisés sont toxiques ce qui ne permet pas une réutilisation des cellules à d'autres fins expérimentales. Elles requièrent par ailleurs une qualification de l'expérimentateur.

III.2.2.2 Méthodes indirectes

On regroupe dans cette sous classe, les méthodes qui déterminent la capacité des cellules à réduire les colorants grâce à leurs enzymes ou à la présence de certains groupements dans leurs structures. On peut citer entre autres : la méthode du MTT, du XTT, à l'Alamar bleu et à la sulforhodamine B.

- **Méthodes basées sur la réduction des sels de tétrazolium : le XTT et le MTT**

Les méthodes du MTT et XTT sont basées sur la réduction des sels de tétrazolium en cristaux de Formazan par les déshydrogénases de la chaîne respiratoire mitochondriale et d'autres systèmes de transport d'électrons des cellules vivantes selon l'équation ci-dessous.

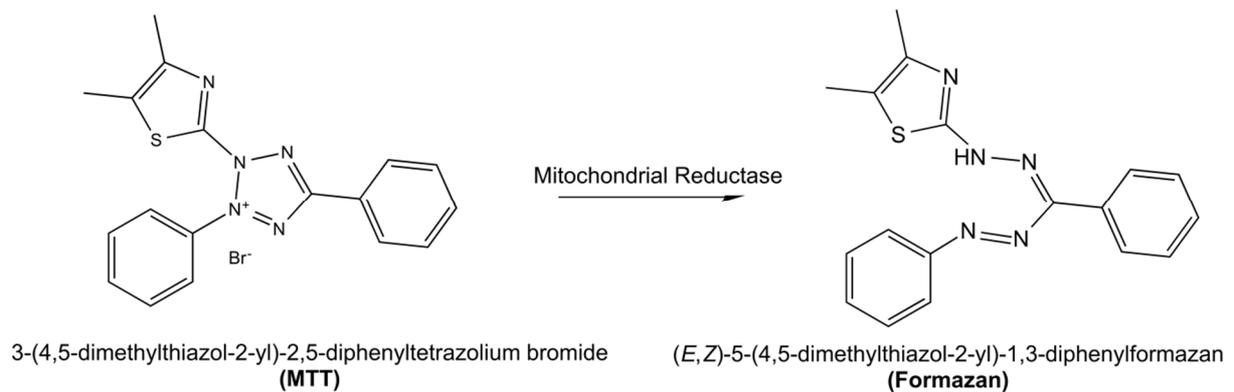


Figure 7: Equation de réduction du MTT par les déshydrogénases

Source: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=35400804> (consultée le 23/03/2018)

La quantité de ces cristaux est déterminée par spectrophotométrie et sert d'estimation du nombre de mitochondries et de cellules vivantes par conséquent. Le principal inconvénient que présentent ces méthodes est une sous-estimation du nombre de cellules. En effet, seules les cellules en phase tardive d'apoptose sont considérées comme mortes. Par ailleurs, elles sont sujettes à des variations liées aux caractéristiques biologiques des cellules (nombre de mitochondries, vitesse du métabolisme). En outre, ces méthodes entraînent une destruction des cellules en expérimentation à cause de la toxicité du colorant lui-même ou des solvants utilisés pour solubiliser les cristaux de formazan. De plus, plusieurs classes de composés

(phytoestrogènes, polyphénols et antioxydants) interfèrent avec les sels de tétrazolium entraînant une ainsi surestimation de l'activité du composé d'intérêt (Brugisser *et al.*, 2002).

- **Méthode à la résazurine ou Alamar bleu**

Cette méthode est fondée sur la réduction de la résazurine ou 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide (de coloration bleue et non fluorescente) en résorufine (rose fluorescente) par l'activité enzymatique mitochondriale tel que le décrit la figure 8 ci-dessous.

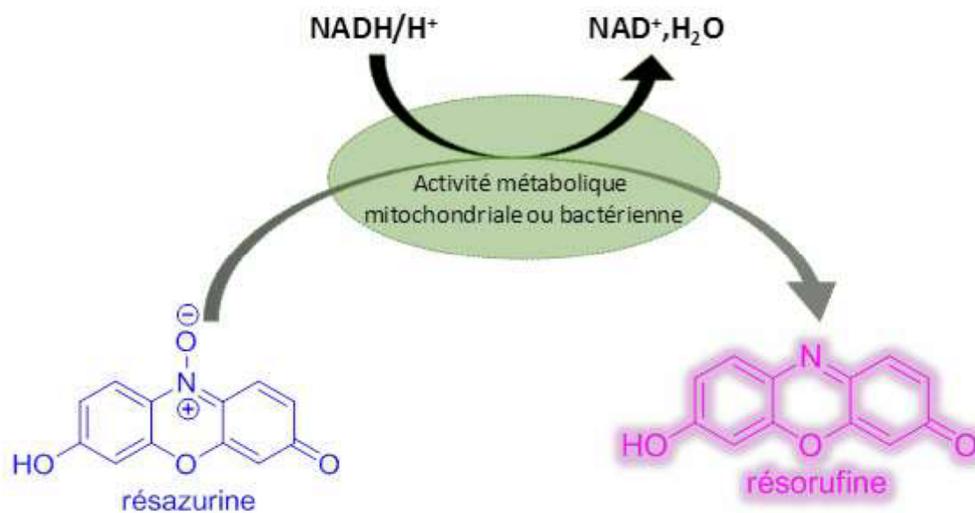


Figure 8: Réaction de réduction de la résazurine (Deshayes, 2013).

Elle évalue de ce fait la capacité métabolique de la population cellulaire et rend ainsi compte de la quantité de cellules vivantes lors des tests de cytotoxicité (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2014). Elle requiert peu d'étapes de lavage. De plus, la résazurine étant non toxique, les mêmes cellules peuvent être utilisées parallèlement à d'autres fins expérimentales (immunophénotypage, apoptose, analyses cytogénétiques) (McMillan *et al.*, 2002). Toutefois, la conversion de la résazurine dépend de l'activité enzymatique des cellules

- **Méthode de la Sulforhodamine B**

C'est actuellement la méthode de référence recommandée par l'Institut National du Cancer pour le criblage des nouvelles molécules anticancéreuses. Elle repose sur la capacité de la SulfoRhodamine B à se fixer électrostatiquement aux résidus d'acides aminés basiques des cellules préalablement fixées sur des microplaques de culture par l'acide trichloroacétique grâce à ses deux groupements sulfoniques. Elle présente le principal avantage d'être très sensible (jusqu'à 5000 cellules). Par ailleurs, elle est hautement reproductible, automatisable

grâce à l'utilisation des plaques de 96 puits et par conséquent adaptée pour le criblage d'un grand nombre de molécules à la fois (Rubinstein *et al.*, 1990 ; Vichai et Kirtikara, 2006). En outre, le dénombrement des cellules étant fonction de la teneur en protéines, cette méthode ne présente aucune interférence du composé d'intérêt. Cependant, elle est longue car requiert plusieurs étapes de lavages qui sont des étapes critiques en plus de l'étape de fixation des cellules avec le TCA (Vichai et Kirtikara, 2006).

- **Méthodes utilisant les analogues nucléotidiques**

Ces méthodes sont basées sur l'aptitude des cellules proliférantes à incorporer la thymidine radiomarquée (^3H) ou le 5-bromo-2'-desoxyuridine (BrdU) dans l'ADN en réplication. Malgré leur grande précision, ces méthodes possèdent des inconvénients. Seules les cellules qui se divisent activement sont prises en considération (Stoddart, 2011). De plus, elles nécessitent l'utilisation de la radioactivité, une longue préparation des échantillons. Par ailleurs la radioactivité détruit les cellules et par conséquent ne permet pas leur utilisation subséquente (Guisseppe *et al.*, 2006). Ces méthodes ne peuvent être utilisées que par les laboratoires d'un certain niveau de sécurité car nécessitent un équipement approprié pour la gestion des déchets radioactifs produits pour le cas spécifique de la thymidine radiomarquée.

- **Essais clonogéniques**

Les essais clonogéniques mesurent le pourcentage de cellules capables de donner naissance à de nouveaux clones au sein de la population cellulaire d'étude. Ils mesurent alors l'effet du composé d'intérêt sur la prolifération cellulaire (Quent *et al.*, 2010).

III.2.3. Méthodes d'évaluation des propriétés anticancéreuses des plantes médicinales *in vivo*

III.2.3.1. Modèles animaux utilisés pour l'évaluation des propriétés anticancéreuses *in vivo*

Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des nouvelles molécules anticancéreuses. Cependant, on note une prépondérance des modèles murins. En effet, comparativement aux autres animaux (hamster, le lapin, le rat), la souris présente l'avantage d'un faible coût de production liée à sa grande fécondité et son coût d'entretien. Par ailleurs, elle se prête facilement aux manipulations en raison de sa petite taille (Schuh, 2004). Toutefois, il existe plusieurs souches différentes possédant chacune des avantages et des inconvénients.

III.2.3.1.1. Souris immunocompétentes

- **Souris BALB/c**

Ce sont des souris albinos produites depuis 1923. Elles sont utilisées dans un grand nombre de domaines de recherche, spécialement en immunologie. Environ 30% des études publiées entre 2001 et 2005 utilisant des souches consanguines faisaient recours aux souris de BALB/c (Festing, 2006).

- **Souris C57 BL/6**

Créée en 1921, cette souche est également une des plus répandues dans le monde. Les travaux de Green *et al.* (1998) ont montré que cette souche était utilisée dans 14% d'études (Festing 1998). Elle est notamment utile pour les modèles de tumeurs induites (Green *et al.* 1973).

III.2.3.1.2. Souris immunodéprimées

- **Souris Nude**

La mutation Nude fut découverte en 1962 dans une animalerie de laboratoire et caractérisée par Flanagan (Flanagan, 1966). Cette mutation concerne le gène codant pour la protéine Forkhead box N1 (FoxN1), qui est un facteur de transcription. La protéine FoxN1 porteuse de la mutation Nude perd son domaine de fixation à l'ADN. Cela provoque entre autres le blocage de la différenciation des cellules épithéliales du thymus et crée à terme une lymphopoièse. En conséquence, les souris homozygotes pour la mutation Nude sont des souris albinos, sans poils chez qui une aplasie du thymus provoque une absence de lymphocytes T. Cependant, elles conservent des cellules T-like et des macrophages et cellules natural killer (NK) à l'activité cytotoxique augmentée. Les lymphocytes B sont en quantité normale chez la jeune souris mais diminuent après l'âge de 7 semaines. Leur poids est plus faible et leur durée de vie est plus courte que pour la plupart des autres souris. Il existe plusieurs souches de souris chez qui la mutation Nude a été obtenue. Historiquement, la première occurrence de cette mutation est apparue chez des souris Swiss (souche Swiss Nude), mais on trouve également des BALB/c nude, des B6 nude, des NIH nude et des NCr nude. Ces dernières sont la souche athymique standard dans les études menées par le National Cancer Institute.

- **Souris *SCID* (Severe Combined Immunodeficiency)**

Des souris possédant des noeuds lymphatiques de très petite taille et un micro-thymus, et ne produisant pas de lymphocytes B et T matures, ont été découvertes par hasard en 1980 dans un laboratoire de Philadelphie au sein d'une lignée de CB-17 (Bosma and Carroll 1991). Ces particularités proviennent de la mutation du gène *Prkdc*, provoquant une inactivation de la sous-unité catalytique de la protéine DNA-PK. La fonction principale de cette protéine est de réparer les cassures double brin de l'ADN. La maturation des lymphocytes B et T repose sur la formation de leurs récepteurs membranaires, les *BCR* (B-Cell Receptors) et les *TCR* (T-Cell Receptors). Ces récepteurs présentent une grande diversité qui provient du réarrangement des gènes de leurs régions variables grâce à un processus que l'on appelle recombinaison V(D) J. Or les recombinaisons V(D)J nécessitent de nombreux clivages de l'ADN, lesquels sont réparés par plusieurs protéines. Parmi ces protéines, la fonction de DNA-PK est centrale puisqu'elle recrute les autres protéines et permet leur phosphorylation (Burma and Chen 2004). Une déficience en DNA-PK compromet donc la réparation des cassures double brin et empêche la maturation des lymphocytes. Dépourvues de lymphocytes B et T fonctionnels, les souris de souche *SCID* tolèrent plus facilement les greffes que les souris Swiss nude. Néanmoins, pour une raison à ce jour inconnue, certaines souris *SCID* adultes, dites "leaky", peuvent générer des clones fonctionnels de lymphocytes B et T (Bosma, 1992). A partir de 10 ou 14 mois d'âge, toutes les souris *SCID* peuvent être considérées comme étant « leaky ». Pour contourner ce problème, une autre souche de souris, la souche RAG1/RAG2, peut être utilisée. Ces souris ne produisent jamais de lymphocytes matures car un défaut en enzyme RAG empêche tout déclenchement de la recombinaison V(D) J. Plusieurs souches de souris *SCID* sont disponibles, dont les C.B-17 *SCID* et les BALB/c *SCID*.

- **NOD-SCID**

Cette souche est obtenue en provoquant la mutation *SCID* chez des souris de souche *NOD* (Non Obese Diabetic). Les souris *NOD* portent une mutation sur l'exon 2 du gène *CTLA-4*, qui provoque l'apparition d'un diabète insulino-dépendant chez 80% des souris femelles et 20% des souris mâles à partir de l'âge de 30 semaines (Festing, 1998). Comme la mutation *SCID* empêche la maturation des lymphocytes T, les souris *NOD-SCID* ne développent pas de diabète. Néanmoins, contrairement aux souris *SCID*, les souris *NOD-SCID* n'ont pas de cellules NK et ne sont pas « leaky ». Elles tolèrent donc encore mieux les greffes que les autres souris *SCID*. Elles ont cependant tendance à développer des lymphomes.

- **NSG ou NOD-SCID Gamma**

Il s'agit d'une des souches de souris les plus immunodéprimées. En plus des mutations *NOD* et *SCID*, ces souris présentent une déficience en sous-unité gamma des récepteurs IL2 ($IL2R\gamma$).

- **NOG**

Cette souche aux caractéristiques très proches des *NSG* (mutations *NOD*, *SCID* et *IL2R*) est très utilisée pour répondre à des problématiques concernant les cellules souches tumorales. Elle présente une plus faible incidence de lymphomes que les souris *NOD-SCID*.

III.2.3.2. Différents types de modèles tumoraux

III.2.3.2.1. Modalités d'implantation des tumeurs

Il existe plusieurs critères de classification des modèles tumoraux. La classification peut être fonction du mode d'implantation de la tumeur dans l'organisme de l'animal étudié ou alors de l'espèce dont provient la tumeur. Ainsi, suivant le premier critère de classification, on distingue :

- La carcinogenèse spontanée

On utilise des souris génétiquement modifiées portant des mutations qui les rendent très susceptibles de développer des tumeurs à un âge précoce. Par exemple, une mutation du gène suppresseur de tumeur *Apc* provoque l'apparition de tumeurs dans le tube digestif, dont la localisation dépend de l'exon qui a été modifié (Colnot et al., 2004).

- La carcinogenèse chimio-induite

Les tumeurs sont provoquées par l'exposition des animaux de laboratoire à des substances cancérigènes, notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le dibenzanthracène et le méthylcholanthrène (Rosenberg, Giardina et al. 2009). Ce type de modèle est particulièrement utile pour les études de chimioprévention (Teicher, 2006).

- La greffe ectopique ou hétérotopique

Il s'agit d'une greffe de cellules ou de tissu cancéreux réalisée sur un site qui ne correspond pas à celui de la tumeur d'origine. Ces greffes sont le plus souvent réalisées en sous-cutané, ce qui permet le suivi de croissance de la tumeur par des mesures au pied à coulisse.

- La greffe orthotopique

C'est une greffe de cellules ou de tissu cancéreux réalisée sur un site correspondant à celui de la tumeur d'origine. Ainsi des cellules de glioblastome seront injectées dans le cerveau, et un fragment d'adénocarcinome colique sera transplanté sur le colon ou le caecum.

La classification suivant l'espèce dont provient le greffon permet de distinguer :

- **Modèles syngéniques**

Ici, l'animal est greffé avec une tumeur provenant d'un animal de la même espèce. Souvent il s'agit de souris à qui l'on injecte une suspension cellulaire. Une grande partie des lignées de cellules tumorales murines a été obtenue à partir de tumeurs chimio-induites. Comme ils permettent d'utiliser des souris immunocompétentes, ces modèles sont intéressants pour comprendre les relations complexes entre cancer et système immunitaire, ainsi que pour tester l'efficacité des thérapies visant à stimuler ce dernier. Malheureusement, les tumeurs murines sont très différentes biologiquement de leurs équivalents humains. Notamment, elles produisent moins de métastases, et leur croissance est plus rapide (Teicher 2006).

- **Modèles allogéniques**

Dans ce cas, les cellules sont greffées sur un animal de la même espèce mais de souche différente

- **Modèles xénogéniques**

Dans les modèles xénogéniques, les cellules ou les fragments utilisés pour la greffe proviennent de tumeurs humaines. Cela implique d'utiliser des animaux immunodéficients ; les animaleries doivent donc répondre à des critères sanitaires stricts pour garder ces animaux dans un environnement sans germes pathogènes. Les greffons peuvent être obtenus à partir de lignées cellulaires ou sur des tumeurs provenant directement d'un patient. Cependant, les lignées de cellules sont fortement susceptibles de perdre la complexité de la tumeur d'origine au cours de leur culture. De plus, des mutations spontanées apparaissent *in vitro* dans les lignées cellulaires, créant ainsi des sous-populations de cellules qui formeront après greffe des tumeurs aux caractéristiques histologiques très différentes de la tumeur d'origine. Cette dérive clonale est très difficile à modéliser (Schuh 2004).

Les tumeurs issues directement de biopsies de patients ont l'avantage de ressembler plus fortement à la tumeur d'origine : elles en gardent une grande partie des marqueurs protéiques et présentent une diversité de populations de cellules qui a tendance à disparaître lorsque l'on travaille à partir de lignées cellulaires (Kelland 2004). Cependant, il est plus compliqué pour les laboratoires de se procurer des tumeurs de patients que des lignées de cellules, et la variabilité entre les tumeurs rend une reproduction ultérieure des conditions exactes de l'étude difficile. En outre, les tumeurs de patients sont susceptibles de contenir des pathogènes, comme le virus d'Epstein-Barr, qui peuvent interférer avec les résultats de l'étude.

**IV. *Syzygium guineense* (Willd). DC var. *macrocarpum* (Engl.) F.White
(*Myrtaceae*), plante médicinale au potentiel anticancéreux**

IV.1. Systématique (Crêtée, 1965)

Règne : végétal

Sous-règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Myrtales

Famille : *Myrtaceae*

Genre : *Syzygium*

Espèce : *guineense*

Noms communs : Anglais, *water berry* ; Bangangté : *Tchankwop* ; Baya : *zomoli* ; Foulfouldé : *asourahi* ; Haoussa : *malm*.



Figure 9: Partie aérienne de *S. guineense* (Photographie de Tankeu, 2014)

IV.2. Origine, distribution géographique et écologie

S. guineense (*Myrtaceae*) est une plante native d'Afrique tropicale. En Afrique, on la retrouve au Nigéria, Sénégal, Somalie, Zaïre, Rwanda, Zambie, Uganda, Swaziland, Namibie, Afrique du Sud, Malawi, Zimbabwe (Abok et Manuluk, 2016). Elle est retrouvée par ailleurs, en Australie et en Asie (Teketay *et al.*, 2002). Elle est généralement rencontrée dans les forêts pluviales de basse altitude, les forêts ombrophiles de montagne. Ce petit arbre habite de préférence les lieux humides du bord des marécages ou dans les rivières et cours d'eau. Il peut néanmoins se retrouver en zone de savane. Au Cameroun, on la retrouve dans les localités de Bafia, Edéa, Ndjie, Ngaoundéré, Mokolo, Ndikinimeki.

IV.3. Description

Syzygium guineense est un arbre de taille petite à moyenne atteignant 15 à 30 m de hauteur et 60 cm de diamètre (Arbonnier, 2004). Les cimes sont arrondies et parfois flabellées. Il comporte de multiples branches dressées obliquement et un feuillage dense et sempervirent. Les écorces sont de couleur gris-brun, lisse. Ses feuilles sont persistantes, simples et opposées (Bekele, 1993; Abebe et Debela, 2003). La période de floraison débute en Novembre et s'étend jusqu'en Mai donnant des petites fleurs sont hermaphrodites et blanches. La fructification s'étend de Février au mois d'Aout. Ses fruits sont des drupes ovoïdes ou ellipsoïdales de diamètre variable (0,8-1,2 cm) de couleur violet noirâtre à maturité.

IV.4. Usages en médecine traditionnelle Africaine

Syzygium guineense trouve de très nombreuses applications en médecine traditionnelle africaine. Ainsi, elle donc utilisée dans le traitement des maladies neurologiques et parasitaires (Kasali *et al.*, 2014 ; Tadesse and Wubneh, 2017). S'agissant des maladies neurologiques, les racines sont utilisées sous forme d'infusion pour traiter l'épilepsie. Concernant les maladies parasitaires, *S. guineense* est utilisée aussi bien dans le traitement des maladies diarrhéiques que celui de la malaria (Kisangau *et al.*, 2007 ; Ssegawa and Kasenene, 2007 ; Kasali *et al.*, 2014).

Pour les maladies diarrhéiques, la partie la plus utilisée sont les écorces qui sont administrées par voie orale sous forme de décoction (Kerharo et Adams, 1974, Abebe et Debela, 2003). Néanmoins, les racines sont également utilisées mais administrées en purge aux enfants pour les affections gastro-intestinales. Quant au traitement de la malaria, ce sont les feuilles qui sont utilisées (Fisseha *et al.*, 2014).

IV.5. Autres usages

Les fruits frais de *S. guineense* sont comestibles (Ambé, 2001). Ils sont consommés à maturité comme tels ou utilisés en confiserie étant donné leur goût sucré et leur nature juteuse. Ils peuvent cependant avoir un goût fade. Secs, ils sont utilisés comme épice dans la préparation de certains plats en cuisine africaine.

Les écorces de *S. guineense* sont utilisées comme bois en menuiserie, en construction et dans la production du charbon de bois. En outre, elles sont également exploitées dans le domaine de la teinture à cause de la teinte noire laissée par la sève sur les vêtements.

IV.6. Propriétés biologiques et composition phytochimique de *S. guineense*

Les travaux relatifs à l'étude des propriétés biologiques de *S. guineense* sont peu abondants dans la littérature. Toutefois, les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-infectieuses et immuno-modulatrices ont été documentées (Djoukeng *et al.*, 2005 ; Ghildyal *et al.*, 2010; Pieme *et al.*, 2014).

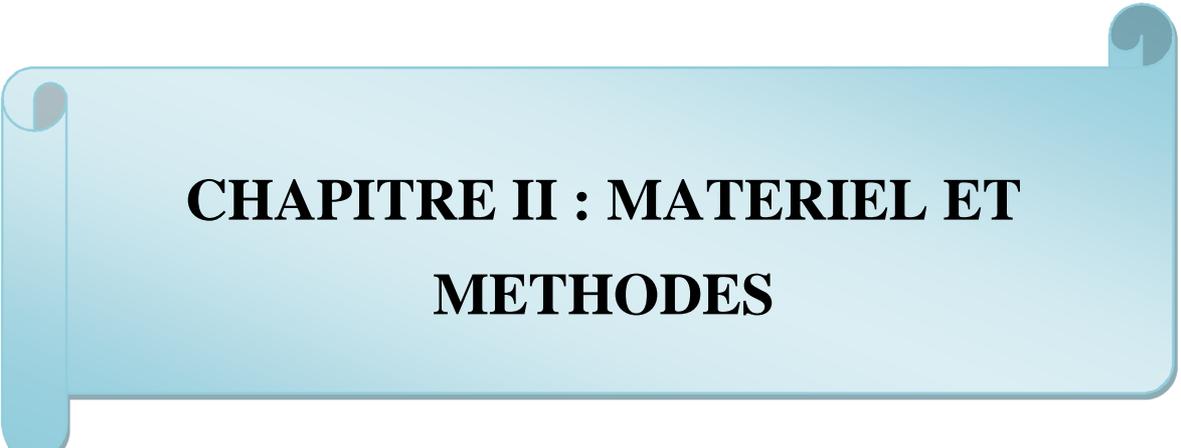
Concernant les propriétés antioxydantes, ses extraits hydroalcooliques et alcooliques ont démontré une activité anti-radicalaire vis-à-vis des radicaux DPPH, ABTS, hydroxyle (OH[•]), et Oxyde nitrique (NO). De même, ils ont révélé une capacité à protéger les homogénats de foie contre le stress oxydatif chimiquement induit en potentialisant l'activité des enzymes antioxydantes Superoxyde Dismutase (SOD) et catalase (Pieme *et al.*, 2014). Par ailleurs, ils ont démontré un effet protecteur contre la peroxydation lipidique en réduisant la production de malonedialdéhyde (MDA), l'un des produits finaux de la peroxydation des acides gras polyinsaturés des membranes (Pieme *et al.*, 2014).

Quant aux propriétés antimicrobiennes, la quasi-totalité des études documentées ont montré que les extraits et composés purs isolés de *S. guineense* ont effet inhibiteur de la croissance des bactéries gram négatif. Les travaux de Djoukeng *et al.* (2005) ont montré que les extraits aqueux de feuilles de *S. guineense* possèdent un effet contre les souches bactériennes *Shigella sonnei*, *E. coli* et *Bacillus subtilis* essentiellement liée à la présence de triterpènes avec des valeurs de concentrations minimales inhibitrices CMI allant de 0,75-50µg/mL. D'autres souches bactériennes gram négatif notamment *Salmonella entéritidis*, *Shigella dysenteriae.*, *Shigella flexneri.*, *E. coli.*, *Enterobacter aeruginosa* ont été sensibles aux extraits aqueux de feuilles (Tsakala *et al.*, 1996).

S'agissant des propriétés immuno-modulatrices, Ghildyal *et al.* (2010) ont montré que les polysaccharides isolés des feuilles de *S. guineense* augmentent l'activité phagocytaire suite à l'activation des macrophages. De même, ils augmentent la production des interleukines 6, 1α

et du facteur tumoral nécrosant alpha (TNF α), des espèces réactives d'oxygène et d'azote des cellules dendritiques B.

Quant à l'étude phytochimique, les travaux de Djoukeng *et al.*, (2005) ont permis d'isoler les triterpènes (les acides bétulinique, asiatique, arjunolique, ursolique, terminolique) dans l'extrait méthanolique de feuilles. De même, Nguyen *et al.* (2016) ont isolés 10 flavonoïdes notamment la gallocatéchine, la myricétine et ses dérivés, et les ellagitannins (casuarictine et la casuarinine) à partir de extrait méthanolique de feuilles. En accord avec ces résultats, Pieme *et al.* (2014a) avaient retrouvé en plus de ces deux classes de métabolites secondaires les alcaloïdes, les saponines et les glycosides cardiotoniques dans les feuilles et écorces *S. guineense*.



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué des feuilles et écorces de *Syzygium guineense*. Le choix des feuilles est guidé par leur utilisation traditionnelle fréquente dans le traitement des infections génitales, les aménorrhées et surtout le cancer du foie (Adjanohoun *et al.*, 1988 ; Tsakala *et al.*, 1999). Les écorces ont été adjointes aux feuilles à cause de la rareté des travaux scientifiques disponibles dans la littérature concernant leurs propriétés biologiques.

Une récolte unique des échantillons de feuilles et écorces a été effectuée au cours d'une matinée du mois de Novembre 2014 dans la localité de Ndjie par Batchenga dans la région du Centre en présence du Dr. GHOGUE Paul, botaniste en service à l'Herbier National du Cameroun (HNC) qui a ensuite procédé à l'identification de la plante par comparaison à un spécimen déposé sous le numéro 49885 HNC.

Les échantillons récoltés ont été nettoyés et séchés à l'abri de la lumière à température ambiante. Une fois séchés, ils ont été pulvérisés et les poudres obtenues ont été conservées pour extraction ultérieure.

II.1.2. Réactifs des tests antioxydants

Le réactif de Folin Ciocalteu, le 2,4, 6- Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), le (2,2 – Azinobis 3-ethylbenzthiazoline)- 6-sulfonic acid (ABTS), Le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl radical (DPPH) ayant servi respectivement pour la détermination de la teneur en phénols totaux, la capacité des extraits à chélater les métaux de transition (test du FRAP), l'activité piègeuse des radicaux ABTS⁺ et DPPH[•] ont été achetés à Sigma Aldrich, USA.

II.1.3. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude *in vitro*

Les cellules utilisées dans cette étude ont été obtenues à l'American Type Culture Collection (ATCC) et conservées dans l'azote liquide au Laboratoire d'Immunologie du Centre Avancé de Recherche, de traitement et d'Education sur le Cancer en Inde. Chaque lignée cellulaire était réactivée et mise en culture au moment de l'expérimentation. Six lignées cellulaires de caractéristiques différentes sont utilisées. Il s'agit de :

- MDA-MB231 et MCF7, deux lignées de cellules adhérentes du cancer du sein. MCF7 est une lignée hormono-dépendante porteuse du récepteur œstrogénique humain. MDA-

MB231 par contre est résistante à l'hormonothérapie car ne possède pas le récepteur œstrogénique humain.

- SiHa et HeLa, deux lignées de cellules adhérentes du cancer du col de l'utérus, porteuses respectivement des sous-types 16 et 18 du virus du papillome humain.
- K562 et HL-60, deux lignées de leucémie myéloïde chronique et aigue respectivement.

Les lignées MCF7 et MDA-MB231 sont choisies pour évaluer la capacité potentielle des extraits de plante à inhiber la prolifération des cellules du cancer du sein sensibles et résistants à l'hormonothérapie respectivement. Par ailleurs, les lignées SiHa et HeLa sont choisies parce qu'elles sont porteuses des sous types du virus du papillome humain les plus rencontrés dans les cas de cancer du col utérin diagnostiqués. Les lignées K562 et HL-60 ont été adjointes aux lignées précédentes dans le but d'élargir le champ d'expérimentation de ce travail étant donné la rareté dans la littérature des travaux relatifs aux propriétés antiprolifératives de cette plante.

II.1.4. Milieux de culture

Deux milieux de culture sont utilisés dans ce travail.

- Milieu Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) Invitrogen Life-Technologies, Grand Island, N.Y). Ce milieu a été utilisé pour la culture des cellules SiHa et K562.
- Milieu Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen Life-Technologies, USA). Il a servi à la culture des cellules des lignées MCF7, MDA-MB231, HL-60 et HeLa.

Les informations relatives aux compositions exactes, ainsi qu'à la préparation de ces milieux de culture sont données à la partie Annexe...

II.1.5. Réactifs utilisés pour la réalisation des tests anticancéreux

- Les antibiotiques : la pénicilline (100UI/mL; Alembic Chemicals India), Streptomycine (100mg/mL; Alembic Chemicals India), Mycostatine (5mg/mL; Sigma, USA), et Gentamicine (40mg/mL; Schering Corpn, India), entrent dans la préparation des milieux de culture complets et servent à prévenir toute contamination des cultures ;
- La L-Glutamine (2mM, Hi Media, India) est un acide aminé essentiel à la croissance des cellules.
- Le sérum de veau fœtal décomplémenté (10%) apporte les facteurs de croissance, protéines d'adhésion, et de transport.

- La RNase A a servi à inhiber l'action des ARN pour éviter toute interférence avec l'intercalation de l'ADN par l'iodure de propidium
- L'iodure de propidium est un agent intercalant l'ADN qui a servi à marquer les cellules pour l'analyse du cycle cellulaire
- La trypsine 0,3% a servi à détacher les cellules adhérentes de la paroi des boîtes de culture

II.1.6. Lignée cellulaire et souche de souris utilisées pour l'étude des propriétés anticancéreuses *in vivo*

La lignée KG-1 : les cellules de cette lignée sont des cellules en suspension obtenues à partir de la moelle osseuse d'un caucasien âgé de 59 ans atteint d'une leucémie érythromyéloïde qui a évolué en leucémie myéloïde aigue. Elles ont été cultivées dans le milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium). Les souris femelles de souche *Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency (NOD-SCID)* ont servi pour l'évaluation de la dose maximale tolérée et pour l'étude la capacité des fractions à inhiber la progression tumorale *in vivo*.

II.1.7. Localisation des laboratoires et appareils utilisés

La partie expérimentale relative à l'étude des propriétés antioxydantes a été réalisée au laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I et le fractionnement au Laboratoire de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaounde. L'étude des propriétés antiprolifératives *in vitro* et anticancéreuses *in vivo* quant à elle a été réalisée dans les laboratoires d'Immunologie et de recherches de nouvelles molécules anticancéreuses du Centre de Recherche « *ACTREC* » *Advanced Centre for Treatment, Research and Education in Cancer Tata Memorial Centre, Navi Mumbai 410210-India*.

S'agissant des appareils, la composition phytochimique des extraits bruts par chromatographie Liquide Haute Performance a été réalisée à l'aide d'un appareil CHLP Agilent 1200 à système multi-solvants tandis que celle des fractions les plus actives (L4 et L5) a été déterminée grâce à un chromatographe en phase gazeuse (Thermo Scientific Trace 13000) couplé à un spectromètre de masse (Thermo Scientific ISQ). Les cellules quant à elles étaient observées et comptées à l'aide d'un microscope de marque (Olympus) ; un incubateur à CO₂ de marque (fisher scientific) a servi pour la culture des cellules ; le lecteur de microplaque de marque (Sunrise Model, Tecan Company, Germany) a servi pour mesurer les densités optiques après le test à la sulforhodamine B. Pour l'analyse du cycle cellulaire, un cytomètre en flux

FACSCALIBUR de marque (Becton Dickinson, San Jose, USA) a servi. Pour mesurer la surface des bandes après réalisation du western blot, un densitomètre (Gel Analyzer, ShineTech Beijing, China) a été utilisé.

II.2. Méthodes

II.2.1. Organigramme méthodologique

La figure 10 ci-dessous est un résumé schématique de l'organigramme de la méthodologie expérimentale permettant une compréhension de l'ensemble du travail. Ce dernier a débuté par une récolte des échantillons de chacune des parties de la plante pour les extractions aqueuse, éthanolique et hydro-éthanolique. Il s'agit par la suite d'évaluer les propriétés anti-oxydantes et déterminer le profil phytochimique des extraits. A cet effet, nous avons déterminé les concentrations inhibitrices 50 (IC_{50}) de chaque extrait pour sa capacité à piéger les radicaux DPPH^{*} et ABTS⁺ ainsi que leur capacité antioxydante par les méthodes du FRAP et Phosphomolybdène. Par ailleurs, la teneur en phénols, flavonoïdes et flavonols totaux a été déterminée pour chaque extrait. Aussi, l'identification des composés phénoliques présents dans les extraits a été effectuée par Chromatographie Liquide Haute Performance (*HPLC*).

Le deuxième volet du travail a été consacré à l'évaluation des propriétés anticancéreuses des extraits bruts et fractions. Il est important de noter qu'à l'issue des tests anticancéreux avec les extraits bruts, l'extrait éthanolique de feuilles qui a présenté le deuxième meilleur profil inhibiteur de la prolifération des différentes lignées cellulaires utilisées a été choisi pour être fractionné au détriment de l'extrait aqueux d'écorces ayant présenté la meilleure activité antiproliférative en raison du faible rendement de l'extraction aqueuse d'écorces. Les fractions obtenues ont par ailleurs été retestées sur les mêmes lignées que les extraits bruts.

Sur la base des activités anticancéreuses remarquables démontrées sur toutes les lignées cellulaires, les fractions L₄ et L₅ ont été choisies pour l'étude du mécanisme d'action à savoir leurs effets sur le cycle cellulaire, leur capacité à induire l'apoptose ainsi que la voie apoptotique impliquée. Parallèlement, l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de ces fractions a été réalisée.

Enfin, nous avons étudié la capacité des fractions L₄, L₅ et l'extrait aqueux d'écorces à inhiber la progression de tumeur de leucémie myéloïde aigue induite par transplantation sous cutanée des cellules de la lignée KG-1 sur les souris femelles de souche NOD-SCID.

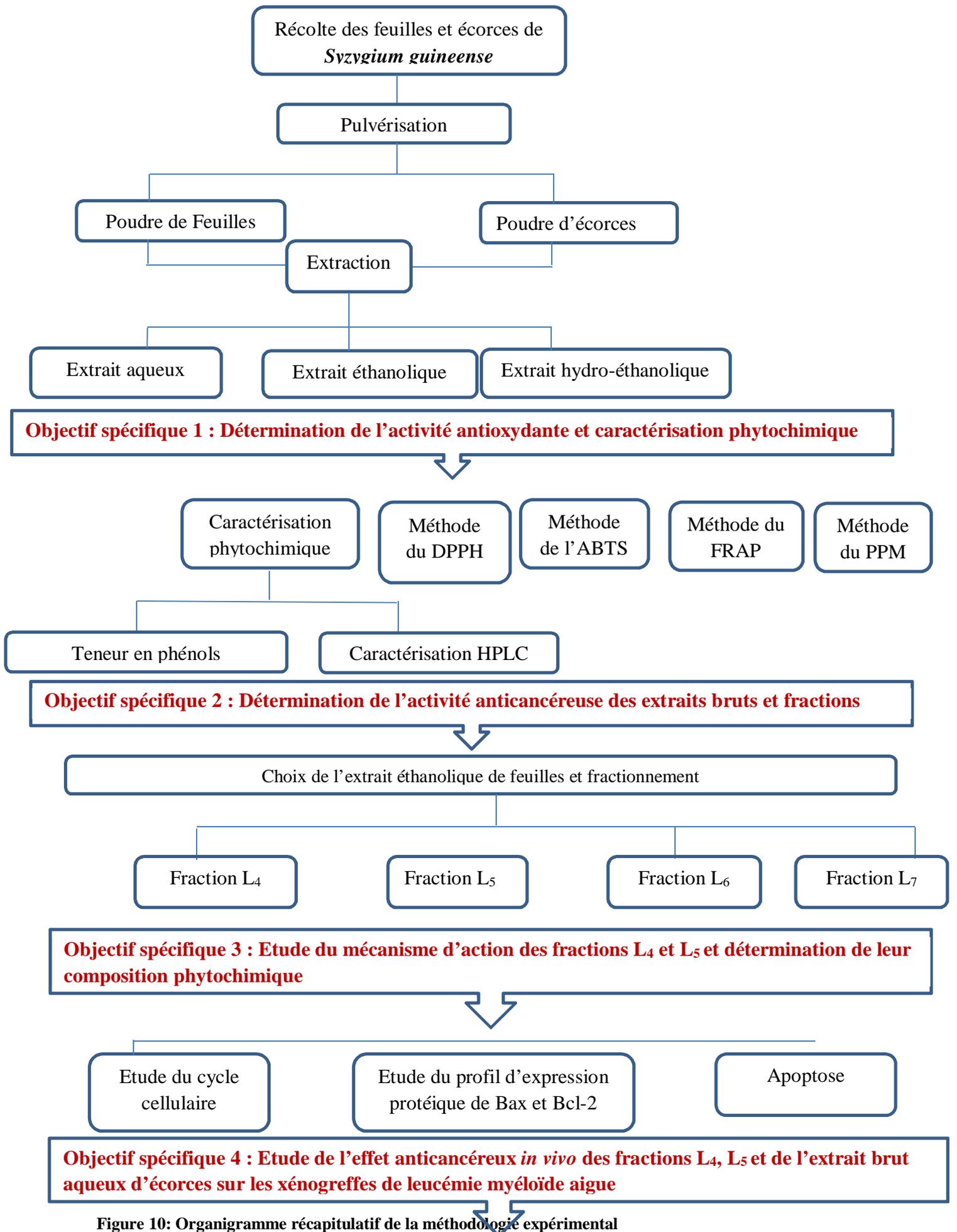


Figure 10: Organigramme récapitulatif de la méthodologie expérimental

II.2. Evaluation des propriétés anti-oxydantes et profil phytochimique des extraits de plantes

II.2.1. Préparation des extraits bruts

A partir des poudres de feuilles et d'écorces, six extraits dont trois de chaque partie (feuilles et écorces) ont été préparés tel que décrit sur la figure 11. Les extraits aqueux, éthanoliques et hydro-éthanoliques ont été obtenus respectivement par macération de 100 g de poudre de chaque partie de la plante dans un volume de 1 L d'eau, d'éthanol 95° et du mélange eau-éthanol 70:30 (v : v) pendant 48h suivie d'une filtration sur papier watmann N°1. Les filtrats obtenus ont été concentrés à l'évaporateur rotatif puis lyophilisés à l'exception des extraits éthanoliques qui ont été séchés à l'étuve à 45°C. Les différents extraits obtenus ont été codifiés tel que L₁: extrait éthanolique de feuilles ; B₁: extrait éthanolique d'écorces ; L₉: extrait aqueux de feuilles ; B₂: extrait aqueux d'écorces ; L₁₀: extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₃: extrait hydro-éthanolique d'écorces

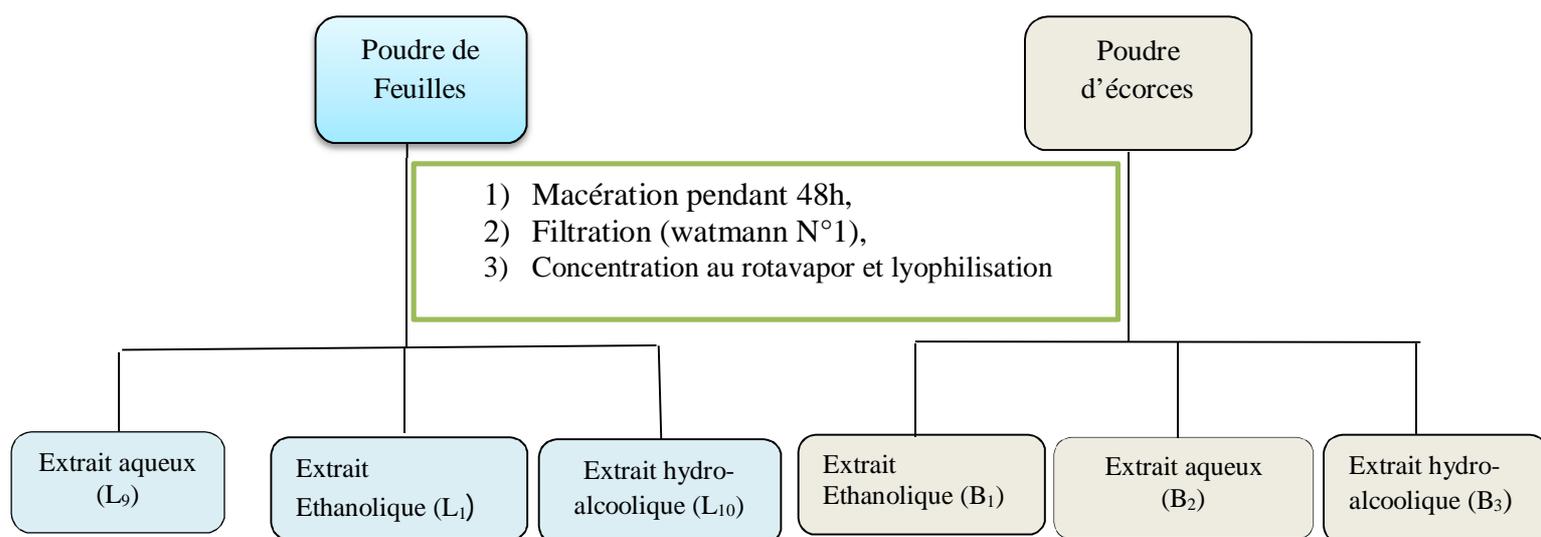


Figure 11: Procédure schématique de préparation des extraits bruts

II.2.2. Détermination de l'activité anti-oxydante des extraits bruts

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, plusieurs méthodes sont généralement mise en œuvre de façon concomitante pour évaluer la capacité anti-oxydante des extraits de plantes. Les méthodes du DPPH, de l'ABTS, du phosphomolybdene et du FRAP sont utilisées dans le cadre de ce travail. Les trois premières permettent d'évaluer la capacité des extraits à piéger les radicaux libres. Par contre, la méthode du FRAP détermine la capacité des extraits à prévenir la formation de ces derniers en chélatant les métaux de transition tels que le fer qui est impliqué dans la production des espèces réactives de l'oxygène.

II.2.2.1. Détermination de l'activité piégeuse du radical DPPH

Le test du DPPH est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer l'activité anti-radicalaire des extraits de plantes. La méthode décrite par Molyneux (2004) a été utilisée. A 3mL de chaque extrait, 1000 μ L d'une solution alcoolique de DPPH 0,1mM est ajouté. Après 30min d'incubation à l'obscurité à température ambiante, les densités optiques sont mesurées à 517nm. Avant chaque expérimentation, les concentrations croissantes suivantes 25, 75, 150, 200, et 300 μ g/ml d'extraits ou de Vitamine C (utilisée comme standard) ont été préparées à partir d'une solution mère de concentration 1mg/ml pour la détermination du pouvoir de piégeage pour chaque radical. Le pouvoir de piégeage du radical DPPH de chaque extrait a été calculé suivant la formule :

$$\text{Pouvoir de piégeage (\%)} = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

Où A_0 est l'absorbance du blanc et A_s l'absorbance de l'échantillon. La même formule a servi pour calculer la capacité des extraits à piéger le radical $ABTS^+$. De même, la vit C a servi comme standard pour évaluer la capacité des extraits à piéger le radical $ABTS^+$

II.2.2.2. Détermination de l'activité piégeuse du radical (2,2'-azino-bis- [3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) ($ABTS^+$)

Le radical $ABTS^+$ est également l'un des radicaux les plus utilisés pour évaluer le pouvoir anti-radicalaire des composés naturels. Cette méthode présente l'avantage d'être soluble aussi bien dans l'eau que les solvants organiques permettant ainsi son utilisation l'évaluation du pouvoir anti-radicalaire des composés extraits dans différents milieux contrairement au DPPH qui est sensible aux pH acides.

Principe

En réagissant avec un oxydant puissant tel que le permanganate de potassium (KMnO_4) ou le persulfate de potassium, l'ABTS forme le radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant à ce mélange, va réduire ce radical et provoquer sa décoloration dont le degré est mesuré par spectrophotométrie à 734 nm et proportionnel à la concentration en antioxydants selon les réactions ci-dessous

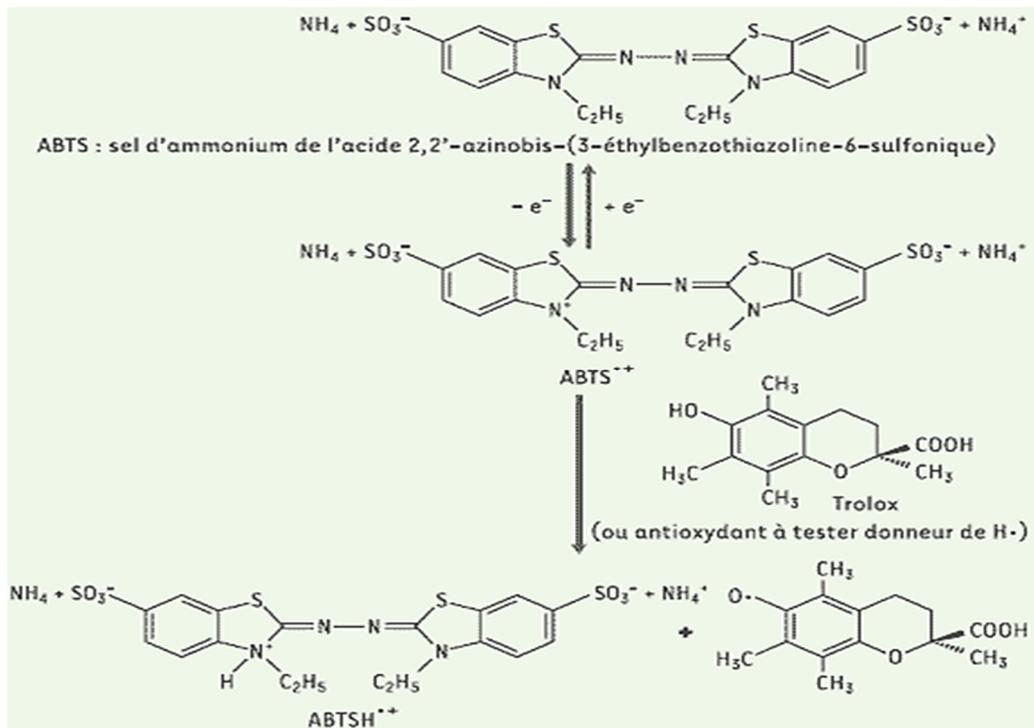


Figure 12 : Principe de la réaction de l'ABTS avec les molécules antioxydantes

La capacité de piégeage du radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a été déterminée selon la méthode décrite par (Re *et al.*, 1999) avec quelques modifications. Une solution d' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ prête à l'emploi a été préparée en diluant au $1/8^{\text{ème}}$ avec l'éthanol la solution stock (composée d'une solution d'ABTS 7,4mM et de persulfate de potassium 2,45mM dans les proportions 1:1 préalablement préparée et laissée à réagir pendant au moins 12h pour atteindre une DO de $0,7 \pm 0,05$ à 734nm. 75 μL de chacune des 5 concentrations de chaque extrait ont ensuite été ajoutés à 2000 μL de solution d' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ prête à l'emploi préalablement introduits dans chaque tube et les densités optiques mesurées après exactement 6min à 734nm.

II.2.2.3 Détermination de la capacité anti-oxydante par la méthode du phosphomolybdate

C'est une variante du test du DPPH en ce sens qu'il y a un transfert d'hydrogène et d'électrons du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (Phospho Molybdate).

Principe :

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) MoO_3 en présence d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V) à un pH acide dont on mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI).

La méthode décrite par (Prieto *et al.*, 1999) a été utilisée. Le réactif de phosphomolybdène a été préparé en mélangeant les solutions d'acide sulfurique 0,6M, de phosphate de sodium 28mM, et d'ammonium molybdate dans les proportions 1 :1 :1. 1000 μL de réactif de phosphomolybdène a été introduit dans chaque tube. Après ajout de 10 μL de chaque extrait à 1mg/mL, les tubes ont été homogénéisés et incubés dans un bain à 95°C pendant 1h et 30 minutes. Par la suite, les tubes ont été refroidis et l'absorbance mesurée à 695nm contre le blanc. La vit C a été utilisée pour l'étalonnage et les résultats exprimés en équivalent de Vit C/ g d'extrait sec.

II.2.2.4. Détermination de la Capacité antioxydante totale par la méthode du Ferric Reducing Antioxidant Power assay (FRAP).

Principe

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) (figure 12). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (Ou *et al.*, 2001). La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanure à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al.*, 2002).

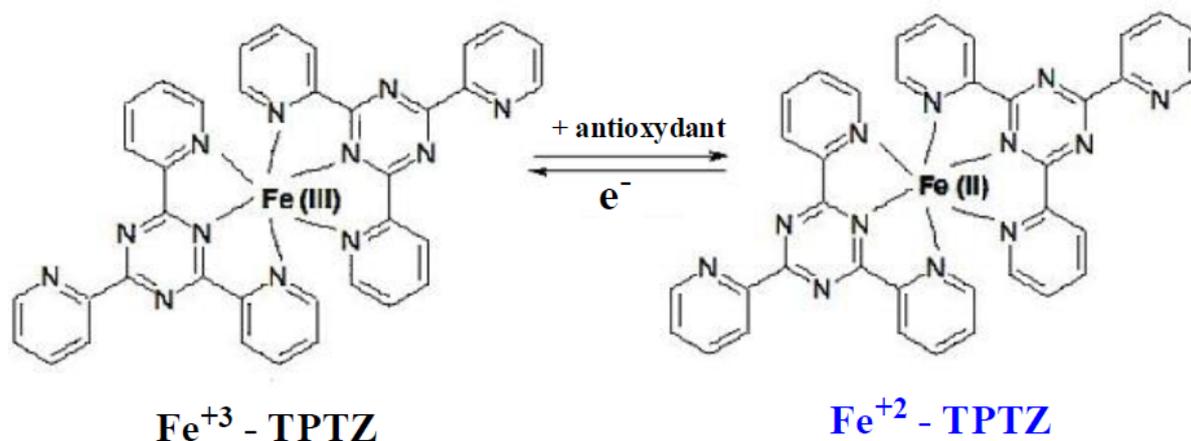


Figure 13: Equation de réduction du complexe ferrocyanure ferrique en ferrocyanure ferreux par un antioxydant AH

Procédure expérimentale

La méthode décrite par Benzie et Strain (1996) avec de légères modifications a été utilisée. 2000 μL de réactif de FRAP fraîchement préparé (tampon acétate (300 mM pH 3,6) 2,4, 6- Tri (2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ) (10 mM) et $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) dans les proportions 5:1:1 respectivement ont été introduits dans tous les tubes. Ensuite 75 μL de chaque extrait à 1mg/ml y ont été ajoutés. Le mélange a été laissé en incubation à température ambiante à l'obscurité et l'absorbance mesurée à 593 nm après 12 minutes. Une courbe d'étalonnage obtenue à partir des concentrations croissantes de Vit C a été utilisée pour déterminer la capacité antioxydante de chaque extrait et exprimée en équivalent de vit C/g d'extrait (mg eq Vit C/g DE).

II.2.3. Composition phytochimique des extraits bruts

II.2.3.1. Teneur en phénols totaux

Les composés phénoliques étant reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anticancéreuses. La teneur des extraits en phénols totaux est déterminée pour expliquer les activités biologiques observées. La teneur en phénols totaux a été évaluée suivant la méthode de Folin-ciocalteu basée sur la réduction du réactif du phosphotungstate-phosphomolybdate en milieu alcalin (Singleton et Draper, 1964).

Dans différents tubes à essai ont été introduits 200 μL de chaque extrait à 1mg/mL, 800 μL de réactif de Folin dilué au 1/10^{ème} et 2000 μL de carbonate de sodium 7,5%. Après

homogénéisation, le mélange a été gardé à l'abri de la lumière pendant 2h et l'absorbance a ensuite été mesurée à 765nm. La quercétine a été utilisée comme standard. Une courbe d'étalonnage obtenue à partir des concentrations croissantes de quercétine allant de 0- 300µg /mL a permis de déterminer les teneurs en phénols des différents extraits exprimées en équivalent de quercétine /g d'extrait sec

II.2.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes étant la sous classe la plus répandue des composés phénoliques et également reconnus pour leurs propriétés anti-oxydantes et anticancéreuses, leur teneur dans les extraits a été déterminée suivant la méthode de Zhishen *et al.* (1999). Pour ce faire, 100µL d'extrait ont été ajoutés à 300µL d'eau distillée et 30µL de NaNO₂ (5%). Après 5 minutes d'incubation, 30µL de AlCl₃ (10%) ont été ajoutés et le mélange incubé à nouveau pendant 5min. Le mélange a été traité par 200µL de NaOH 1 mM et le volume de chaque tube a été ajusté à 1000µL avec de l'eau distillée. La quercétine a été utilisée comme standard et la courbe d'étalonnage obtenue a permis de déterminer la concentration en flavonoïdes des extraits exprimée en équivalent de quercétine /g d'extrait sec.

II.2.3.3. Détermination de la teneur en flavonols

La même logique nous a conduite à évaluer la teneur en flavonols totaux qui est la sous classe des flavonoïdes la plus répandue. Elle a été déterminée suivant le protocole de Kumaran et Karunakaran (2007). Dans des tubes contenant au préalable 2000µL d'extrait ou de quercétine (standard) et 2000µL de chlorure d'aluminium 2%, 3000µL d'une solution d'acétate de sodium 50g/L ont été ajoutés, mélangés et le mélange incubé pendant 2h et 30 minutes à 20°C. L'absorbance ensuite a été mesurée à 440nm et la teneur en flavonols déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine et exprimée en mg équivalent de Quercétine /g d'extrait sec.

II.2.4. Détermination du profil polyphénolique des extraits bruts par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Après une évaluation quantitative de la teneur en composés phénoliques des extraits, la Chromatographie Liquide Haute Performance des extraits est réalisée dans le but d'identifier les composés phénoliques préalablement détectés lors de l'évaluation quantitative. C'est une technique de séparation des constituants d'un mélange. Ainsi, pour la caractérisation des

extraits bruts, nous avons eu recours à un appareil CHLP Agilent1200 à système multi-solvants équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, un injecteur d'un détecteur UV de longueur d'onde fixe, d'une colonne *SUPELCO SIL LC -18* de longueur 250 mm, diamètre 4,6 mm, taille des particules 5 mm). La température de la colonne était fixée à 20°C. Les échantillons ont été dissouts dans de l'eau ultra-pure suivant le ratio 0,3g/10mL et centrifugés à 4706 tr/min pendant 10 minutes. Après filtration du mélange obtenu à travers une membrane d'acétate de cellulose (0,20 µm or 0,45µm, Schleicher & Schuell), 25µL de filtrat ont été injectés dans l'appareil et élué comme suit :

Pendant les 2 premières minutes de l'élution, la phase mobile consistait en une solution aqueuse d'acide acétique 0,5% (v : v) (solution A) ;

A partir de la 2^{ème} minute jusqu'à la 60^{ème} minute, la phase mobile était constituée à 40% de la solution A et à 60% d'acétonitrile concentré (solution B). Le débit d'élution était fixé à 1mL / min. Les polyphénols étaient détectés à l'aide d'un détecteur UV à 280nm (Zuo *et al.*, 2002). Au préalable, les temps de rétention des composés d'intérêt (standards) ont été déterminés à l'aide d'une solution étalon unique à 100 mg/L. La concentration des composés d'intérêt dans les extraits a été déterminée à partir de la surface sous la courbe de chaque pic et exprimée en concentration relative à celle du standard correspondant.

II.3. Evaluation des propriétés anticancéreuses des extraits bruts.

II.3.1. Maintien et expansion des cellules

Chaque lignée cellulaire était au préalable cultivée en monocouches dans des boites en polystyrène de 75 cm² stériles dans un incubateur thermostaté à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO₂ (5%) et une humidité relative de 85%. Les cellules étaient maintenues dans le milieu RPMI-1640 pour les lignées SiHa et K562 et DMEM (Dulbeco's Eagle Modified Medium) pour les lignées HL-60, HeLa, MCF7 et MDA-MB231. Le milieu de culture était remplacé tous les 3 à 4 jours. L'expansion du nombre de cellules se faisait après passage dans de nouvelles boîtes stériles lorsqu'elles atteignaient un état de sub-confluence. Ceci consistait à une simple aspiration du milieu suivie d'un lavage avec du 1X PBS pour les lignée non adhérentes. Pour les lignées adhérentes, les cellules étaient au préalable détachées avec la trypsine (0,3%) préparée dans l'éthylène diamine tétra-acétate (0,02%) et reprises dans un milieu de culture neuf. Les nouvelles préparations étaient par la suite centrifugées à 1000 tours/min pendant 5 min et les cellules présentes dans les culots étaient comptées à l'aide d'un hémacytomètre et leur viabilité évaluée à l'aide de la méthode au Trypan bleu.

➤ Coloration au Trypan bleu

La coloration au bleu Trypan est basée sur la capacité des cellules vivantes à relarguer ce colorant de haut poids moléculaire contrairement aux cellules mortes qui se laissent pénétrer par ce dernier. En effet, le mécanisme d'exclusion de ce colorant est un mécanisme ATP-dépendant nécessitant de l'énergie. Ainsi, seules les cellules vivantes capables de produire de l'énergie en sont capables. Ces dernières apparaissent alors incolores à l'observation microscopique tandis que les cellules mortes ont une coloration bleue. Les tests antiprolifératifs ont été réalisés lorsque le pourcentage de viabilité des cellules était supérieur à 90%.

$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{nombre de cellules vivantes} - \text{nombre de cellules mortes}}{\text{nombre de cellules totales}}$

II.4. Etude des propriétés antiprolifératives *in vitro* des extraits bruts

Pour l'étude de l'effet antiprolifératif des extraits bruts, la méthode à la Sulforhodamine B (SRB) a été utilisée. C'est la méthode de référence recommandée par l'Institut National Américain du cancer (INC) pour le criblage des nouvelles molécules anticancéreuses.

Elle est basée sur la capacité de la sulfoRhodamine B à se fixer électrostatiquement aux résidus d'acides aminés basiques des cellules préalablement fixées sur des microplaques de culture par l'acide trichloroacétique (TCA). En effet, la SRB est un colorant amino-xanthène de coloration rose vif possédant deux groupements sulfoniques qui lui confèrent la capacité de lier les groupements basiques des aminoacides dans des conditions de pH légèrement acide et de s'en dissocier dans les conditions basiques. Ce dosage mesure la biomasse totale en colorant les protéines cellulaires. La fixation de SRB étant stœchiométrique, la quantité de colorant extraite des cellules est proportionnelle à la masse cellulaire (Vichai et Kirtikara, 2006). La proportion en SRB peut être mesurée en lisant l'absorbance à la longueur d'onde de 510nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

La méthode du SRB a été réalisée selon le protocole décrite par Chavan Rohit *et al.* (2016) pour déterminer l'effet antiprolifératif et cytotoxique des tous les extraits bruts. Pour ce faire, une solution mère de 100 mg/mL a été préparée pour chaque extrait. Environ 5 000 cellules ont été ensemencées dans des cupules de microplaques de 96 puits contenant 100µL de milieu approprié à chaque type de cellule et incubées pendant 24h. Après ce temps, le milieu a été renouvelé puis les cellules exposées à 100, 50, 10 et 1 µg / mL de chaque extrait. Parallèlement, l'Adriamycine (chlorhydrate de doxorubicine) a été utilisé comme témoin positif et testé aux concentrations de 10, 20, 40 et 80 µg/mL. Après ajout d'extraits, les préparations ont été incubées pendant 48 heures, puis fixées avec 50µL de TCA 30 et 50% (p / v)

respectivement pour les cellules adhérentes et non adhérentes et maintenues à 4°C pendant 1 heure. Les plaques ont ensuite été lavées 4 fois et séchées. Une fois sèches, les cellules ont été colorées avec 50 µL de SRB 0,4% préparées dans de l'acide acétique 1% pendant 30 min et l'excès de colorant a été éliminé par lavage répété avec une solution d'acide acétique 1% (v : v). Les plaques ont été séchées à nouveau et le colorant lié aux protéines dissout dans une solution de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 10,5). Les densités optiques (DO) du contenu de chaque puits ont été mesurées à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Trois mesures ont été réalisées:

- T_Z: valeur moyenne des DO de l'ensemble de la plaque contrôle 24h après l'ensemencement des cellules (avant ajout des extraits et Adriamycine)
- Contrôle (C): valeur moyenne des huit puits témoins (sans extrait ni adriamycine) 72 heures après l'ensemencement des cellules.
- T_i: valeur moyenne des DO de trois puits de chaque concentration 48h après ajout d'extrait ou d'Adriamycine.

Toutes les expériences ont été répétées trois fois et chaque concentration évaluée en triplicate. Deux plaques servant de témoin (T_Z) ont toujours été conservées et les densités optiques ont été mesurées après 24h de culture de cellules (au moment de l'addition des différentes concentrations d'extraits dans les plaques tests).

Le pourcentage de croissance a été déterminé selon la formule:

$$\% \text{ de croissance} = 100 \times [(T_i - T_z) / C - T_z].$$

Pour chaque extrait brut et chaque ligne cellulaire, une courbe dose-réponse a été tracée. De chaque courbe dose-réponse, l'équation de droite linéaire ($y=ax+b$) (où a est la pente de la droite et B le coefficient) a été utilisée pour calculer les valeurs des paramètres antiprolifératif (GI₅₀), et cytotoxiques (TGI et LC₅₀) comme suit :

- GI₅₀ est la concentration d'extrait inhibant 50% de croissance des cellules. Elle a été calculée selon la formule : $50 = ax + b$. ($y=50$)
- TGI est la concentration d'extrait entraînant une inhibition totale de la croissance et calculée comme suit : $ax + b = 0$. ($y=0$)
- LC₅₀ est la concentration d'extrait entraînant 50% de mort cellulaire. Ce paramètre a été calculé suivant l'équation $ax + b = -50$ ($y=-50$).

II.5. Fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles

A l'issue des tests antiprolifératifs, l'extrait aqueux d'écorces a présenté la meilleure activité inhibitrice de la prolifération des six lignées cellulaires utilisées. Cependant, le rendement d'extraction de ce dernier étant faible, nous avons choisi de fractionner plutôt l'extrait éthanolique de feuilles qui présentait la meilleure activité après l'extrait aqueux d'écorces. Sa forte teneur en composés phénoliques et flavonoïdes totaux nous a également conforté dans notre choix étant donné les nombreux travaux ayant montré que les composés phénoliques (flavonoïdes en particulier) sont une classe de métabolites secondaires dotés de propriétés antiprolifératives.

Le fractionnement a été fait par chromatographie liquide sous vide (chromatographie flash) tel que le décrit le dispositif de la figure 13.



Figure 14: Dispositif expérimental de la chromatographie sous vide (Photographie de Tankeu, 2017)

Une masse de 238,7 g d'extrait éthanolique de feuilles fixés à une masse équivalente de silice ont subi une chromatographie flash sur gel de silice éluée à l'hexane au mélange hexane-acétate d'éthyle et mélange acétate d'éthyle-méthanol de polarité croissante (figure 15). Les petites fractions de 200 mL sont recueillies, concentrées et regroupées sur la base des résultats de la Chromatographie sur Couches Minces (CCM) analytique pour donner 4 fractions L₄, L₅, L₆ et L₇.

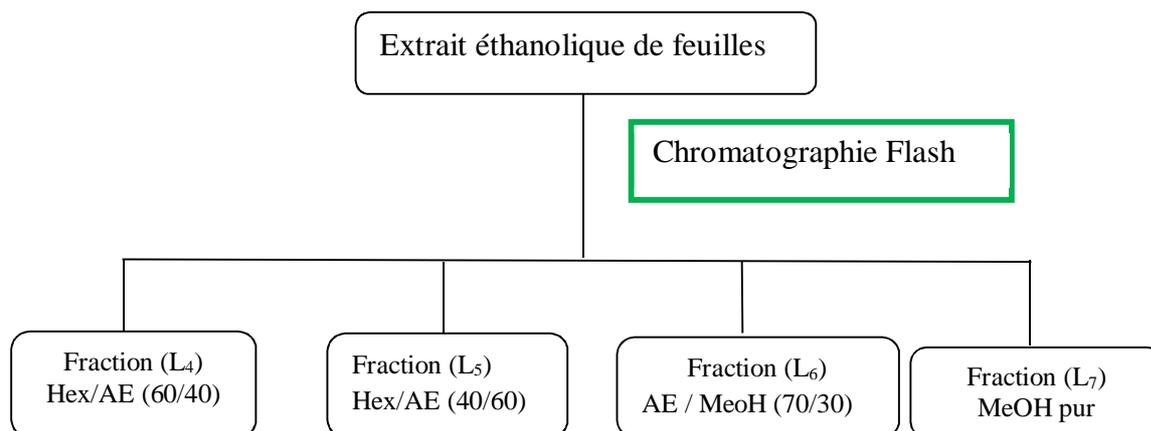


Figure 12: Protocole de fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles

II.6. Evaluation des propriétés antiprolifératives *in vitro* des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles

Les fractions L₄, L₅, L₆ et L₇ obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles ont été testées de nouveau sur les mêmes lignées cellulaires que celles utilisées précédemment avec les extraits bruts par la méthode du SRB suivant le même protocole que celui décrit précédemment (pages 61-63).

II.7. Etude du mécanisme d'action antiprolifératif et cytotoxique des fractions L₄ et L₅ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles

Dans le développement du cancer, la capacité à échapper aux signaux régulateurs de la division cellulaire ainsi que l'insensibilité aux signaux de mort sont deux caractéristiques majeures acquises par les cellules cancéreuses favorisant leur prolifération. Ainsi, le cycle cellulaire et l'apoptose constituent les principales cibles de nombreux médicaments anticancéreux. A cet effet, ces deux cibles ont été choisies pour évaluer étudier les mécanismes

d'action des fractions L₄ et L₅ qui ont présenté les meilleures propriétés antiprolifératives sur toutes les lignées cellulaires étudiées.

II.7.1. Analyse du cycle cellulaire et du contenu d'ADN

. Sur la base des paramètres antiprolifératifs obtenus après les tests anticancéreux, les fractions L₄ et L₅ ayant montré la meilleure activité sur toutes les six lignées cellulaires utilisées ont donc été choisies pour l'étude de leurs effets sur les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux ainsi que leur capacité à induire l'apoptose.

II.7.1. 1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode rapide d'analyse quantitative et qualitative d'un grand nombre de cellules en suspension véhiculées à grande vitesse jusqu'à une chambre d'analyse traversée par un ou plusieurs faisceaux lasers. L'interaction des cellules avec la lumière permet de caractériser et de classifier ces cellules selon différents critères tels que la taille, la forme, la complexité ou la présence d'une molécule révélée par un composé fluorescent. L'utilisation des composés fluorescents (fluorochromes) couplée à des anticorps, protéines, ou molécules permet la détection spécifique des composants cellulaires ou leur intégration. En effet, les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée. L'émission de fluorescence est canalisée et générée par la fibre optique jusqu'à une série de détecteurs (photomultiplicateurs) placés en aval des filtres qui transforment les informations lumineuses en signaux électriques. Ces signaux sont traités par un programme informatique qui construit des histogrammes mono paramétriques, bi-paramétriques ou multiparamétriques ou encore des cytogrammes.

II.7.1.2. Procédure expérimentale

Pour chaque lignée cellulaire, les concentrations des fractions utilisées sont choisies selon les valeurs GI₅₀ obtenues après les tests antiprolifératifs par la méthode du SRB. A cet effet, toutes les concentrations utilisées pour l'analyse du cycle cellulaire sont comprises entre 0,5 et 100 µg/mL.

Environ 0,2 x 10⁶ cellules / mL / puits ont été traitées avec différentes concentrations d'extrait pendant 48h. Au bout de ce temps, les cellules ont été récoltées par trypsinisation pour les lignées adhérentes et par aspirations et refoulements successifs pour les cellules non adhérentes. Elles ont ensuite été lavées avec 1 mL de tampon PBS 1X deux fois puis, centrifugées à 1000 trs / min pendant 10 minutes à 4°C. Les culots cellulaires résultants ont été

fixés à l'aide de l'éthanol 70% glacé sous agitation douce et transférés dans les tubes pour cytométrie de flux. Les cellules fixées ont été lavées avec du tampon PBS 1X et les culots remis en suspension dans 500 µL du même tampon; 50µL de RNase A (100µg/mL) et 50µL d'iodure de propidium 0,4 µg/mL sont ensuite ajoutés aux cellules et incubées à 37°C à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'acquisition des données (10000 évènements) a été réalisée immédiatement sur un cytomètre de flux FACS- Calibur de marque Becton Dickinson. Les distributions d'ADN résultantes ont été analysées par le logiciel Modfit 2.0 pour les proportions de cellules à chaque phase du cycle cellulaire ainsi que le pourcentage de cellules apoptotiques avec un pourcentage de cellules nécrotiques était inférieur à 5%.

II.7.2. Analyse de l'expression des protéines Bax et Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 dont les protéines pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2, sont impliquées dans la régulation de la perméabilisation membranaire mitochondriale qui déclenche la voie intrinsèque de l'apoptose. Pour déterminer si les évènements mitochondriaux sont impliqués dans l'apoptose induite par les fractions L₄ et L₅ de *S. guineense*, une analyse du profil d'expression protéique de Bax et Bcl-2 a été réalisée par western blot. Seules les lignées leucémiques (K562 et HL-60) sont utilisées en raison de des valeurs de GI₅₀ ≤ 20µg/mL valeur seuil pour les extraits de plantes recommandée par l'Institut National du Cancer.

Les concentrations de fractions utilisées pour traiter les cellules avant l'analyse du profil d'expression protéique de Bax et Bcl-2 sont celles qui ont révélé le pourcentage de cellules apoptotiques le plus élevé après analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux. Ainsi, les concentrations utilisées sont de 40 et 80µg/mL pour les lignées K562 et HL-60 respectivement.

Pour chaque lignée cellulaire, les cellules ont été traitées pendant 6, 12 et 24h et un puits contrôle pour chaque temps d'incubation (cellules sans extrait) a été conservé. La méthode utilisée est celle de Towbin *et al.* (1979).

II.7.2.1. Principe du western blot

Le western blot (aussi appelé immunotransfert) est une technique rapide et sensible employée pour détecter et caractériser les protéines d'un mélange. Cette technique exploite la spécificité inhérente des anticorps mono ou polyclonaux. Elle consiste à séparer les protéines du mélange en fonction de leur taille par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (*SDS-PAGE*). Les protéines ainsi séparées sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose (ou nylon) sous l'action d'un champ électrique supérieur à celui appliqué lors de

l'électrophorèse. Les protéines transférées sont alors détectées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique et d'un anticorps secondaire conjugué à une enzyme et de son substrat. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt et l'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire conjugué à une enzyme dont l'ajout du substrat chimiluminescent (ou chromogène) conduira à la formation d'intermédiaires excités (ou d'une coloration). Lorsque ces intermédiaires excités passent à un niveau d'énergie plus bas et retournent à leur état initial, ils émettent une coloration bleue à 450nm qui est capturée par des films photographiques à rayons x et développée avec un détecteur de signal luminescent.

II.7.2.2. Procédure expérimentale

Pour chaque lignée cellulaire, environ 2×10^6 cellules ont étéensemencées dans les plaques à 6 puits et cultivées dans le milieu de culture approprié pendant 24h pour adhérence. Après ce temps, les concentrations adéquates des fractions L₄ et L₅ pour chaque lignée ont été ajoutées et les cellules cultivées pendant 6, 12 et 24hrs. Un puits contrôle (sans extrait) pour chaque période d'incubation a été conservé. A la fin de chaque période d'incubation, les cellules des puits contrôle et tests ont été collectées par aspiration et centrifugées à 1200 tr / min pendant 10 min. Les culots cellulaires ont été lavés avec du tampon PBS 1X et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

- **Préparation des lysats cellulaires**

Les lysats cellulaires ont été préparés par incubation et sonication des culots cellulaires dans le tampon de lyse dont les détails de la préparation sont indiqués en Annex II. Le tampon préparé est conservé à -20°C. Avant l'utilisation, le tampon est complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases dans les proportions 9:1 (v : v). 50µL de tampon de lyse fraîchement préparé (contenant le cocktail d'inhibiteur de protéases) ont été ajoutés à chaque culot cellulaire, et le mélange incubé dans la glace pendant 30 min. Les surnageants ont été collectés dans des tubes eppendorf et conservés à -80°C jusqu'au dosage de la teneur en protéines totales après sonication à raison de 10 cycles d'une minute à haute amplitude et une centrifugation à 14000 trs /min à 4°C pendant 10 minutes.

- **Détermination de la concentration en protéines totales dans les lysats cellulaires**

La teneur totale en protéines totales dans les surnageants des différents lysats cellulaires a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) dans les plaques de 96 puits tel que résumé dans le tableau 1. L'albumine du sérum bovin (BSA) a été utilisée comme standard et testée aux concentrations 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,4 et 2 mg/mL.

Tableau I: Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Puits	Lysat cellulaire	Eau distillée	Réactif de Bradford
Blanc	-	5 μ L	245 μ L
Test	5 μ L	-	245 μ L

Les plaques ont été incubées à l'obscurité pendant 5min et les densités optiques mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque (Sunrise, Tecan Company, Germany) à 540nm sous agitation douce. Les concentrations en protéines totales exprimées en mg/ mL des puits tests sont déterminées par extrapolation à partir de la droite d'étalonnage de l'albumine du sérum bovin.

- **Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

L'électrophorèse que nous avons utilisée est celle en gel de polyacrylamide contenant du Laurylsulfate de sodium (en anglais *SDS*).

Principe :

C'est une électrophorèse en conditions dénaturantes où le SDS confère une charge négative à toutes les protéines permettant ainsi une séparation uniquement en fonction de la masse moléculaire de ces dernières. Les gels utilisés pour séparer les protéines par électrophorèse étaient discontinus ; composés d'un gel de séparation à pH 8,8 plus dense (à 15% d'acrylamide permettant la séparation en fonction de la taille), précédé d'un gel de concentration (pH 6,8) moins dense à 6% d'acrylamide permettant la concentration des échantillons avant leur entrée dans le gel de séparation ce qui entraîne une bonne séparation des bandes protéiques. Les détails de la préparation des gels sont indiqués en Annexe II.

La plaque a été remplie au $\frac{3}{4}$ avec le gel de séparation encore liquide et laissée pour polymérisation pendant 40min. Une fois polymérisé, le gel de concentration est donc ajouté pour compléter le dernier $\frac{1}{4}$ de la plaque et un peigne permettant la formation des puits est inséré dans le gel de concentration encore liquide. Cette seconde polymérisation dure également 45 minutes.

Un volume correspondant à une concentration de 20 μ g/mL de protéines (en fonction de la teneur en protéines totales de chaque échantillon) a été prélevé et le volume ajusté à 20 μ L avec le tampon de migration pour chaque échantillon. Le mélange est alors préalablement chauffé à 100°C sous agitation pendant 5 min afin de dénaturer les protéines pour leur permettre de migrer dans les mailles du gel une fois déposées.

Pour la migration, une fois les échantillons déposés dans les puits, le vide entre les plaques ainsi que la cuve a été rempli avec le tampon d'électrophorèse. Une tension de 80 volts

est appliquée pendant 1h et 30min pour permettre la migration. La migration des échantillons se fait en parallèle avec un mélange protéique coloré dont les poids moléculaires sont connus qui permettra de déterminer la position de la protéine d'intérêt une fois les protéines transférées sur la membrane.

- **Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose**

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le montage est préparé comme le montre la Figure 16.

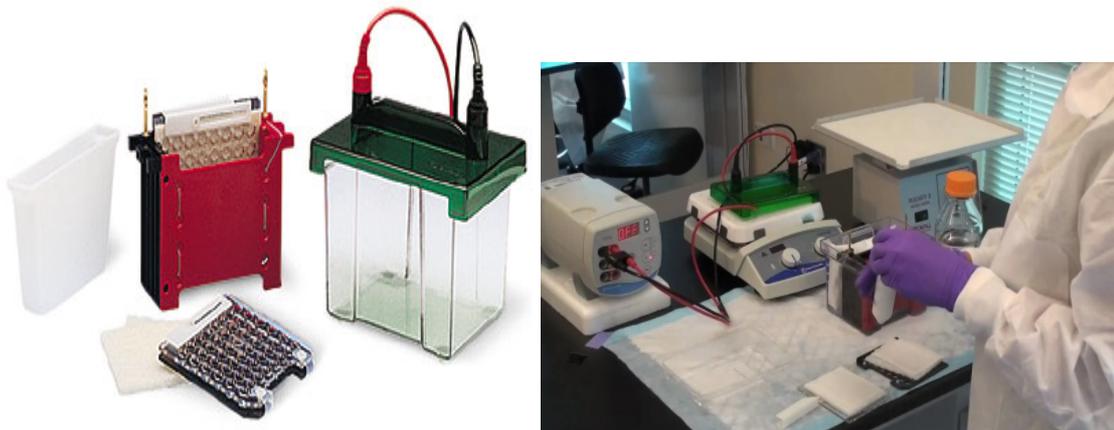


Figure 16: Dispositif utilisé pour le western blot (photographie de Tankeu, 2017)

Il consiste à placer le gel et la membrane nitrocellulose entre deux papiers filtres ; puis le tout entre deux mousses (les papiers filtres et les mousses étant préalablement humidifiés avec du tampon de transfert dont la composition est donnée en annexe II. La cassette est soigneusement fermée et placée dans le bac contenant le tampon de transfert. Les protéines sont transférées pendant 2h à 100 volts et à 4°C.

Une fois le transfert terminé, la membrane a été colorée avec une solution de rouge ponceau afin de confirmer le transfert des bandes protéiques du gel vers la membrane. Après élimination du rouge ponceau, la membrane a à nouveau été incubée dans une solution de lait écrémé à 5% pendant 1h sous agitation douce afin de bloquer les sites libres présents sur la membrane et empêcher ainsi les liaisons non spécifiques. Par la suite, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires anti- β -actine, anti-bax et anti-Bcl-2 dilués dans une solution de BSA 3% aux 1/2000^e pour la actine et 1/1000^e pour Bax et Bcl-2.

Le lendemain, les membranes ont été lavées pendant 15 minutes successivement 4 fois sous agitation forte avec le tampon TBST (Tris buffered saline-Tween) 1X afin d'éliminer l'excédent d'anticorps primaire et les éventuelles liaisons non spécifiques. A la fin de ces lavages, les membranes ont à nouveau été incubées à température ambiante pendant 1h sous

agitation douce avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de Raifort (HRPO) approprié dilué au 1/2000^e dans la même solution que précédemment. Les membranes sont lavées à nouveau comme précédemment avant la détection.

- **Révélation**

La révélation s'est faite par chimiluminescence. La luminescence est définie comme étant l'émission de lumière résultant d'une dissipation d'énergie à partir d'une substance à l'état excité. Enhanced chemiluminescence (ECL) est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse du western blot. Dans la chimiluminescence, l'excitation d'une substance est due à une réaction chimique. La peroxydase de Raifort couplée à l'anticorps secondaire, catalyse l'oxydation du luminol (composant du kit de détection) dans des conditions alcalines. Le luminol à l'état excité, retourne à l'état fondamental en émettant une lumière qui est capturée par des films photographiques à rayons X et les films sont développée grâce à un appareil de luminescence.

Les membranes sont incubées pendant 3 minutes à l'abri de la lumière avec un mélange des deux réactifs du kit de détection (Femto, ThermoFischer) dans les proportions 1:1 (v:v). Après élimination de l'excès de solution, les films à rayons x sont placés contre les membranes et la lumière capturée par les films est développée à l'aide d'un appareil de luminescence. Les aires des bandes protéiques ont ensuite été calculées à l'aide d'un appareil de documentation des gels (Gel Analyzer, ShineTech, Beijing, China).

II.8. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

II.9. Etude des propriétés anticancéreuses in vivo des fractions L4, L5 et de l'extrait aqueux d'écorces sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue

II.9.1. Détermination de la dose maximale tolérée

A l'issue de l'étude des propriétés antiprolifératives *in vitro*, les fractions L4, L5 ainsi ont été sélectionnés pour l'étude *in vivo* étant donné que leurs valeurs de GI₅₀ étaient $\leq 20\mu\text{g/mL}$ sur la lignée de leucémie myéloïde aigue. Par ailleurs, l'extrait aqueux d'écorces leur a été adjoint en raison de la possibilité de son utilisation pour la formulation d'un phytomédicament. Pour ce faire, une étude préalable visant à déterminer la dose maximale tolérée (DMT) de chaque extrait ou fraction par les animaux a été réalisée. 54 souris femelles de souche *NOD-SCID* réparties en 9 lots de 6 souris chacun ont été utilisées. Les souris ont été élevées dans les

cages physiologiques en polystyrène dans une enceinte stérile. La température de la salle était maintenue à $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et l'humidité relative entre 50-60%. Elles recevaient une alimentation standard et avaient accès libre à de l'eau préalablement autoclavée. Le véhicule utilisé était une solution de Tween 80 à 20% diluée dans une solution de NaCl 0,9% (v/v). L'administration des différents traitements s'est faite par voie orale en dose unique et les animaux observés pendant 5 jours. Les critères de toxicité étaient la perte de poids ≥ 4 grammes et le décès de l'animal. La dose de départ était 300mg/kg de poids corporel. La méthodologie utilisée pour cette partie est celle du Laboratoire de recherche de molécules anticancéreuses du centre de recherche Avancé de traitement, de Recherche et d'Education sur le Cancer. Ainsi, les doses ont été progressivement augmentées suivant une progression arithmétique d'ordre 3 jusqu'à la dose 900mg/kg, dose à laquelle les extraits n'étaient plus solubles. Au terme de la période d'étude, le gain de poids a été calculé suivant la formule :

$$\text{Gain de poids} = \left(\frac{\text{Poids au jour de la mesure}}{\text{Poids au jour 1}} - 1 \right) \times 100$$

II.9.2. Induction de la tumeur et traitement

Pour l'étude des propriétés anticancéreuses *in vivo*, les souris mâles de même souche âgées de 6-8 semaines et pesant entre 18-25g ont été utilisées. La tumeur a été induite par transplantation des cellules de la lignée humaine de leucémie myéloïde aigue KG-1 sur les souris NOD-SCID selon la méthode décrite par Chen *et al.* (2006) suivie de quelques modifications. Environ 1×10^7 cellules/ 0,2 mL cultivées dans le milieu IMDM ont été injectées par voie sous cutanée à 42 souris NOD-SCID. Le diamètre de la tumeur était mesuré tous les trois jours après la transplantation. Dix jours après, lorsque le volume tumoral avait atteint 5mm, les souris ont été réparties en 7 groupes comme suit :

- Un groupe témoin recevant le véhicule (tween 80 dilué à 20% dans du NaCl 0,9%
- Un groupe contrôle positif recevant l'Adriamycine (anticancéreux de référence) à 2,5mg/kg de poids corporel par voie intraveineuse une fois par semaine pendant 3 semaines
- Deux groupes recevant la fraction L₄ aux doses 100 et 200mg/kg de poids corporel par voie orale 5 fois par semaine pendant 4 semaines
- Deux groupes recevant la fraction L₅ aux doses 100 et 200mg/kg de poids corporel par voie orale 5 fois par semaine pendant 4 semaines et

- Un groupe recevant l'extrait aqueux d'écorces à 200mg/kg de poids corporel par voie orale 5 fois par semaine pendant 4 semaines.

Les doses à administrer ont été choisies à partir de la dose maximale tolérée obtenue à l'issue de la partie précédente. Ainsi, à l'issue de la détermination de la DMT, la dose 900mg/kg de poids corporel administrée en dose unique a été bien tolérée par les animaux. La prochaine dose à tester était 200mg/kg, administrée 5 fois par semaine pendant 4 semaines. Cette dose a donc été choisie comme dose maximale à administrer pour l'étude *in vivo*.

Après avoir débuté les différents traitements, le nombre de décès survenant dans chaque groupe était enregistré, le poids corporel des souris ainsi que le volume de la tumeur mesuré tous les 4 jours à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à la fin de l'étude. Au terme de l'étude, les souris ont été euthanasiées et les tumeurs prélevées et photographiées.

- Le volume de la tumeur a été calculé selon la formule du volume de la sphère :

$$VT \text{ (mm}^3\text{)} = 4 \pi r^3 / 3$$

$$VT \text{ (mm}^3\text{)} = (d_1 + d_2) / 2 \times \pi / 6$$

$$VT \text{ (cm}^3\text{)} = d^3 \times 0,5236 / 1000 \text{ où } d \text{ est le diamètre moyen et } 0,5236 \text{ le rapport } \pi / 6$$

- Le volume tumoral relatif de la tumeur (VRT) par rapport au jour 1 a été exprimé selon la formule suivante: $VRT = VT_n / VT_0$ avec VRT étant le volume relatif de la tumeur au jour de la mesure, VT le volume de la tumeur, n le jour de la mesure, et VT le volume de la tumeur au jour 1 (au début du traitement).
- La régression tumorale T / C exprimée en pourcentage (%) a été calculée en rapportant le volume moyen de la tumeur du groupe test au volume de la tumeur dans le groupe contrôle

$$T / C \text{ (\%)} = (\text{moyenne VRT du groupe traité}) / (\text{moyenne VRT du groupe témoin}) \times 100$$

II.10. Analyses statistiques

. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type des essais en triple. Le logiciel GraphPad Prism version 5.03 a servi pour l'analyse des données. Le test d'analyse de variance (ANOVA) a été utilisé pour évaluer l'influence des différents traitements par les extraits et fractions sur le pourcentage de cellules apoptotiques suivi d'un post hoc dunnett's multiple comparison afin d'établir les différences entre les moyennes. Le *t-test* de student a permis d'évaluer l'efficacité du traitement par chaque extrait/ fraction après l'étude des propriétés anticancéreuses *in vivo*. Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$.



**CHAPITRE III :RESULTATS
ET DISCUSSION**

III.1. Etude de l'activité antioxydante et détermination de la composition phytochimique des extraits bruts de *S. guineense*

III.1.1. Rendement d'extraction des extraits bruts de *S. guineense*

Au terme des extractions, les extraits ont été pesés et les rendements d'extraction calculés en rapportant la masse de chaque extrait brut obtenue à celle de la poudre macérée. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous. Il en ressort que le rendement d'extraction varie en fonction de la partie de la plante utilisée et du solvant d'extraction. Pour les feuilles, l'extrait éthanolique a présenté le meilleur rendement tandis que pour les écorces le meilleur rendement a été obtenu avec l'extrait hydro-éthanolique.

Tableau II: Rendements d'extraction des extraits bruts de *S. guineense*

		Rendement (%)		
	Extrait	EtOH	EtOH/H ₂ O	H ₂ O
<i>S. guineense</i>	Feuilles	14,05	12,41	11,63
	Ecorces	13,32	15,09	10,21

Abréviations : EtOH : extrait éthanolique ; EtOH/H₂O : extrait hydro-éthanolique ; H₂O : extrait aqueux.

III.1.2. Teneur en composés phénoliques des différents extraits bruts

Tableau III: Teneur en composés phénoliques des extraits bruts de *S. guineense*

Extrait	Phénols Totaux	Flavonoïdes	Flavonols
	(mEqQ/g extrait sec)	(μEqQ/g extrait sec)	(μEqQ/g extrait sec)
L₁	439,76±5,15 ^c	1040,00±51,16 ^c	11,54±1,41 ^b
L₉	148,96±0,76 ^e	1010,00±25,00 ^c	42,73±1,86 ^e
L₁₀	163,90±9,82 ^a	665,00±35,00 ^b	27,96±1,15 ^{bc}
B₁	352,85 ± 3,83 ^d	716,66 ± 23,62 ^e	18,15 ± 0,97 ^c
B₂	432,38 ± 11,41 ^c	961,66 ± 7,63 ^d	25,12 ± 5,12 ^b
B₃	236,19 ± 3,09 ^b	316,66 ± 12,58 ^a	4,02 ± 1,04 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type (n=3). Dans une même colonne les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes (p<0,05). mEqQ/g : milliéquivalent de quercétine par gramme d'extrait sec. L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉: Extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : Extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces.

Le tableau 3 ci-dessus reporte les concentrations en phénols, flavonoïdes et flavonols totaux des différents extraits bruts de *S. guineense*. Il ressort de l'analyse de ce tableau que tous les extraits contiennent toutes les trois classes de composés phénoliques mais dans des proportions variables. Ainsi, les extraits éthanolique de feuilles et aqueux d'écorces ont présenté les meilleures teneurs en phénols totaux ($p < 0,05$) avec les concentrations respectives de $439,76 \pm 5,15$ et $432,38 \pm 11,41$ mEq de quercétine / g d'extrait sec. A l'inverse, les extraits aqueux ($148,96 \pm 0,76$ mEq de quercétine / g d'extrait sec) et hydro-éthanolique de feuilles ($163,90 \pm 9,82$ mEq de quercétine / g d'extrait sec) ont présenté les plus faibles teneurs.

Quant à la teneur en flavonoïdes totaux, l'extrait éthanolique de feuilles a également présenté la meilleure teneur ($p < 0,05$) avec la concentration la plus élevée de $1040,00 \pm 51,16$ μ Eq de quercétine / g d'extrait sec suivi de son homologue aqueux ($1010,00 \pm 25,00$ μ Eq de quercétine / g d'extrait sec). En revanche, la plus faible concentration a été obtenue avec l'extrait éthanolique d'écorces ($316,66 \pm 12,58$ μ Eq de quercétine / g d'extrait sec).

Pour ce qui est de la concentration des extraits en flavonols, l'extrait aqueux de feuilles s'est avéré le plus riche ($42,73 \pm 1,86$ μ Eq de quercétine / g d'extrait sec) comparativement aux autres extraits tandis que l'extrait hydro-éthanolique d'écorces a présenté la plus faible concentration ($p < 0,05$).

III.1.3. Activité anti-oxydante des extraits bruts

➤ Activité piègeuse des radicaux DPPH et ABTS⁺

Tableau IV: Pourcentage de piégeage du radical DPPH par les extraits bruts de feuilles de *S. guineense*

Extrait	Concentration (μ g/mL)				
	25	75	150	200	300
L ₁	$55,56 \pm 0,51^a$	$60,44 \pm 1,36^a$	$71,74 \pm 0,76^a$	$80,14 \pm 5,21^b$	$91,69 \pm 0,42^b$
L ₉	$29,61 \pm 0,48^a$	$51,10 \pm 1,24^b$	$59,38 \pm 0,90^b$	$75,67 \pm 3,46^b$	$83,58 \pm 0,49^c$
L ₁₀	$52,34 \pm 1,39^a$	$61,08 \pm 0,59^a$	$73,08 \pm 1,38^a$	$81,48 \pm 1,66^b$	$89,74 \pm 0,30^b$
B ₁	$66,27 \pm 0,95^a$	$78,83 \pm 0,95^a$	$82,45 \pm 1,25^a$	$86,24 \pm 4,73^b$	$94,40 \pm 0,13^b$
B ₂	$59,52 \pm 0,56^a$	$69,74 \pm 0,16^a$	$79,30 \pm 0,68^a$	$84,45 \pm 0,61^b$	$93,57 \pm 1,68^b$
B ₃	$55,21 \pm 1,28^a$	$67,95 \pm 1,36^a$	$79,84 \pm 0,37^a$	$82,74 \pm 0,14^b$	$88,82 \pm 1,78^b$
Vit C	$74,43 \pm 1,79^a$	$85,83 \pm 0,66^a$	$88,45 \pm 0,62^b$	$93,18 \pm 2,58^b$	$98,31 \pm 0,27^c$

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type ($n=3$). Dans une même ligne, les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : Extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : Extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces.

La capacité des extraits à piéger le radical DPPH^{*} exprimée en pourcentage est résumée dans le tableau 4 ci-dessus. D'une manière générale, le pourcentage de piégeage du radical DPPH augmente avec la concentration en extraits. A l'exception de l'extrait aqueux de feuilles, le pourcentage de piégeage de tous les extraits est supérieur à 50% à la concentration 25µg/mL. Les valeurs obtenues varient de 29,61 ± 0,48 à 94,40 ± 0,13%. L'extrait éthanolique d'écorces a démontré le meilleur pourcentage de piégeage contrairement à l'extrait aqueux de feuilles qui a présenté la plus faible valeur. Toutefois, la Vit C utilisée comme antioxydant de référence a démontré une activité supérieure à celle de tous les extraits (98,31 ± 0,27%).

Tableau V: Pourcentage de piégeage du radical ABTS⁺ par les extraits bruts de feuilles de *S. guineense*

Extrait	Concentration (µg/mL)				
	25	75	150	200	300
L₁	29,23 ± 2,07 ^a	53,63 ± 1,50 ^b	75,09 ± 0,09 ^b	88,25 ± 1,48 ^c	96,11 ± 1,92 ^c
L₉	16,62 ± 0,12 ^a	19,24 ± 0,88 ^a	23,15 ± 0,84 ^a	27,58 ± 0,43 ^a	34,42 ± 0,92 ^b
L₁₀	12,63 ± 0,27 ^a	17,32 ± 1,64 ^a	23,88 ± 1,24 ^a	27,60 ± 0,95 ^a	37,21 ± 1,35 ^b
B₁	15,18 ± 0,80 ^a	39,10 ± 0,93 ^b	53,01 ± 0,36 ^c	67,56 ± 1,29 ^d	81,37 ± 0,94 ^e
B₂	19,95 ± 1,61 ^a	36,47 ± 1,11 ^b	78,34 ± 0,71 ^c	91,35 ± 0,15 ^d	97,15 ± 0,71 ^d
B₃	23,19 ± 0,66 ^a	26,54 ± 1,80 ^a	34,56 ± 1,97 ^b	38,26 ± 0,66 ^b	52,63 ± 0,71 ^c
Vit C	24,00 ± 1,22 ^a	64,91 ± 3,46 ^b	90,81 ± 2,40 ^c	91,81 ± 1,57 ^c	93,68 ± 1,16 ^d

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type (n=3), Dans une même ligne, les valeurs affectées de lettres alphabétiques différentes sont significativement différentes (p<0,05) ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉: Extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : Extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces.

Comme pour le radical DPPH, le pourcentage de piégeage augmente avec la concentration en extraits. Cependant, les extraits ont piégé très faiblement le radical ABTS⁺ (Tableau 5) contrairement au radical DPPH. Les pourcentages varient de 12,63 ± 0,27 à 97,15 ± 0,71%. Les meilleurs pourcentages ont été obtenus avec les extraits aqueux d'écorces et éthanolique de feuilles qui ont présenté des valeurs comparables (97,15 ± 0,71 et 96,11 ± 1,92% respectivement) tandis que les plus faibles valeurs respectivement 34,42 ± 0,92 et 37,21 ± 1,35 ont été obtenues avec les extraits aqueux et hydro-éthanolique de feuilles à 300µg/mL.

Tableau VI: Pouvoir antioxydant des extraits bruts de *S. guineense* vis-à-vis des radicaux DPPH et ABTS⁺

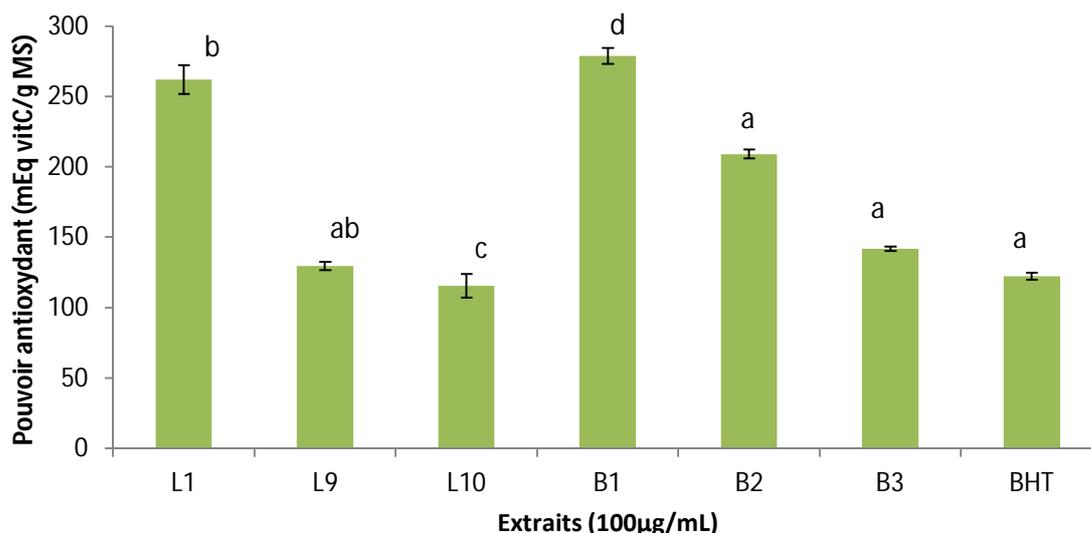
	1/IC ₅₀ (µg/mL)						
	L ₁	L ₉	L ₁₀	B ₁	B ₂	B ₃	Vit C
DPPH	0,37 ±0,02	0,51±0,01	0,32±0,02	0,43±0,04	0,38±0,05	0,3±0,01	0,54±0,03
ABTS ⁺	0,30±0,07	0,33±0,10	0,11±0,01	0,34±0,07	0,43±0,09	0,19±0,03	0,61±0,04

L₁ : Extrait éthanologique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanologique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanologique d'écorces B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanologique d'écorces. Vit C : Vitamine C.

Le tableau 6 ci-dessus présente les pouvoirs antioxydants (1/IC₅₀) des différents extraits bruts et de la Vit C vis-à-vis des radicaux DPPH et ABTS⁺. Il en ressort que pour le radical DPPH, l'extrait aqueux de feuilles a présenté le meilleur pouvoir antioxydant (0,51±0,01 µg/mL) comparativement aux autres extraits bien qu'il soit inférieur à celui de la Vit C. A l'inverse, l'extrait hydro-éthanologique de feuilles a démontré la plus faible activité avec un pouvoir antioxydant de 0,11±0,01 µg/mL. Quant au radical ABTS⁺, c'est l'extrait aqueux d'écorces qui a présenté la meilleure activité avec un pouvoir antioxydant de 0,43±0,09 µg/mL contrairement à l'extrait hydro-éthanologique de feuilles qui a présenté une valeur quatre fois moins élevée que celle de l'extrait aqueux d'écorces.

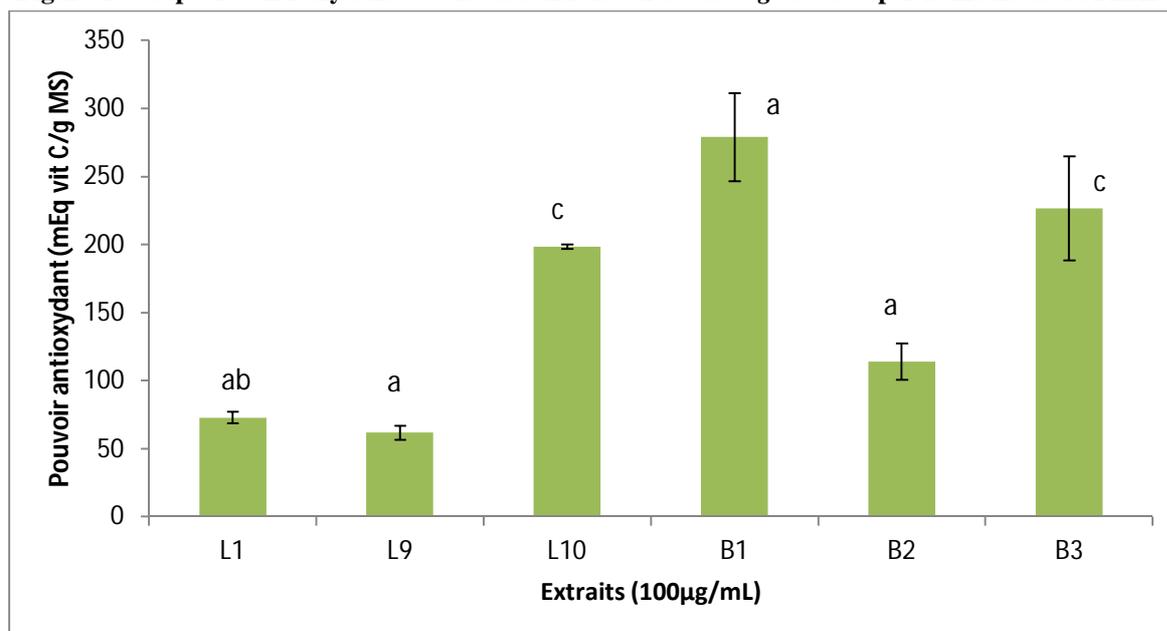
➤ **Capacité antioxydante totale**

Parallèlement à la capacité des extraits bruts à piéger les radicaux DPPH et ABTS⁺, nous avons également évalué leur capacité à réduire les ions ferriques en ions ferreux et le molybdène VI en molybdène (V). Les capacités antioxydantes pour chacune des méthodes sont présentées sur les figures 17 et 18.



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3), L₁ : Extrait éthanologique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanologique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanologique d'écorces ; B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanologique d'écorces ; BHT : Butyl hydroxytoluène.

Figure 17: Capacité anti-oxydante totale des extraits bruts de *S. guineense* par la méthode du FRAP



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₁ : Extrait éthanologique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanologique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanologique d'écorces ; B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanologique d'écorces.

Figure 18: Capacité anti-oxydante totale des extraits bruts de *S. guineense* par la méthode du phosphomolybdate

A l'analyse de ces figures, il ressort d'une manière générale que les effets des extraits sur la réduction de l'ion ferrique ont été plus importants que sur la réduction du molybdène. Les valeurs obtenues pour la réduction des ions ferriques varient de 115,49 \pm 8,5 à 278,88 \pm 5,75 meq vitamine C/g d'extrait sec) alors que pour la réduction du molybdène, elles varient de 61,66 \pm 5,2 à 278,88 \pm 32,50 meq vitamine C/g d'extrait sec). Toutefois, l'extrait éthanologique

d'écorces a présenté le meilleur effet ($p < 0,05$) aussi bien pour la réduction des ions ferriques que pour celle du molybdène comparativement aux autres extraits et au BHT utilisé comme molécule de référence avec des valeurs respectives de $278,88 \pm 5,75$ et $278,88 \pm 32,50$. A l'inverse, les plus faibles capacités réductrices ont été obtenues avec les extraits hydro-éthanolique et aqueux de feuilles respectivement pour le FRAP et le phosphomolybdène.

III.1.4. Détermination de la composition phytochimique des extraits bruts par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Suite au dosage des composés phénoliques par la méthode de Folin-ciocalteu dans les différents extraits bruts, une analyse par HPLC a été réalisée afin de les identifier. Quatorze standards différents ont été utilisés : les acides 3,4-hydroxy benzoïque, gallique, vanillique et syringique appartenant à la sous classe des acides hydroxy benzoïques ; les acides caféique, Ortho-coumarique, Para-coumarique à celle des acides hydroxycinnamiques, la quercétine et la rutine aux flavonols ; l'apigénine (flavones), la catéchine (flavanols), le tyrosol et hydroxytyrosol (alcools phénoliques) et l'eugénol (flavonol). La concentration de chaque composé a été déterminée en rapportant l'aire sous le pic obtenue à 280nm à celle du standard de concentration connue. Les concentrations de ces composés présents dans chaque extrait sont consignées dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau VII: Composition en composés phénoliques des extraits bruts par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Polyphénol Standard		L ₁	L ₉	L ₁₀	B ₁	B ₂	B ₃
	RT (min)	Teneur (mg/g MS)					
Acide Gallique	14,38			6,93			3,30±0,0
acide 3,4- OH benzoïque	19,10		8,34±0,0				
Tyrosol	21,77			3,21±0,0			
OH-tyrosol	21,91				39,93±0,0		
Catechine	23,48				64,19±0,0		
acide O- coumarique	25,11	3,13±0,0					
acide Vanillique	25,27		14,05±0,0				
acide Syringique	25,55				13,49±0,0	35,72±0,0	13,57±0,0
Acide caféique	25,67	11,31±0,0					
Eugenol	29,43			5,62±0,0			
Rutine	29,45		48,5±0,0		35,72±0,0		
Acide P- coumarique	30,52	5,17±0,0	2,90±0,0	4,12±0,0			13,92±0,0
Apigénine	33,49	0,076±0,0	0,086±0,0	0,0025±0,0	0,2±0,0	6,23±0,0	0,084±0,0
Quercétine	42,19		12,97±0,0				

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type (n=3). (mg/g MS): mg/ g de matière sèche ; TR : Temps de rétention L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanolique d'écorces

D'une manière générale, les différents composés phénoliques utilisés comme standards ont été retrouvés en concentrations variables dans les différents extraits. De plus, la nature des composés présents varie avec solvant d'extraction. Cependant, l'apigénine a été retrouvé dans tous les extraits. Toutefois, l'extrait aqueux d'écorces (B₂) avec une teneur de 6,23 mg/g d'extrait sec en contenait en concentration plus élevée (p<0,05) comparativement aux autres extraits contrairement à l'extrait hydro-éthanolique de feuilles qui a présenté la plus faible concentration (0,0025 mg/g d'extrait sec).

L'acide syringique a été retrouvé dans tous les extraits d'écorces bien que l'extrait aqueux ait également présenté la meilleure teneur (p<0,05) comparativement à ses homologues éthanolique et hydro-éthanolique. En plus de l'acide caféique composé majoritaire de l'extrait éthanolique de feuilles retrouvé à la concentration de 11,31 mg/g d'extrait sec, les acides para-coumarique, ortho-coumarique et l'apigénine ont également été retrouvés aux concentrations

respectives de 5,173 mg/g, 13 mg/g et 0,076mg/g d'extrait sec. Dans l'extrait aqueux de feuilles, 6 composés ont été identifiés avec une prépondérance l'acide vanillique présent à la concentration de 14,05mg/g d'extrait sec. Les autres composés étaient les acides hydroxybenzoïque (8,34mg/g d'extrait sec), p-coumarique (2,90 mg/g d'extrait sec), l'apigénine (0,086 mg/g d'extrait sec), la rutine (48,5 mg/g d'extrait sec) et la quercétine (389,29 mg/g d'extrait sec). Pour ce qui est de l'extrait hydro-éthanolique de feuilles, l'acide gallique était le composé majoritaire (6,93 mg/g d'extrait sec) parmi les 5 composés présents dans ce-dernier.

Quant à l'extrait éthanolique d'écorces, la catéchine était le composé majoritaire parmi les 5 composés identifiés avec une concentration de 64,19 mg/g d'extrait sec. Parmi les autres composés présents, (l'hydroxytyrosol, la rutine, l'apigénine, et l'acide syringique), l'hydroxytyrosol et la rutine ont été retrouvés en concentrations comparables.

Seuls l'acide syringique et l'apigénine étaient présents dans l'extrait aqueux d'écorces respectivement aux concentrations de 35,72 et 6,23 mg/g d'extrait sec. L'extrait hydro-éthanolique d'écorces était plus riche en acides p-coumarique (13,92 mg/g d'extrait sec) et syringique (13,57 mg/g d'extrait sec) présents en concentrations comparables contrairement à l'acide gallique et l'apigénine présents en concentrations plus faibles.

Les composés phénoliques identifiés (rutine, quercétine, acide gallique) ayant déjà démontré des propriétés anticancéreuses sur certaines lignées cellulaires, la seconde partie ce travail a été consacrée à l'évaluation des propriétés antiprolifératives de ces extraits sur six lignées cellulaires dont 2 lignées du cancer du sein (MCF7, MDA-MB231), du cancer col de l'utérus (SiHa et HeLa) et leucémiques (HL-60 et K562).

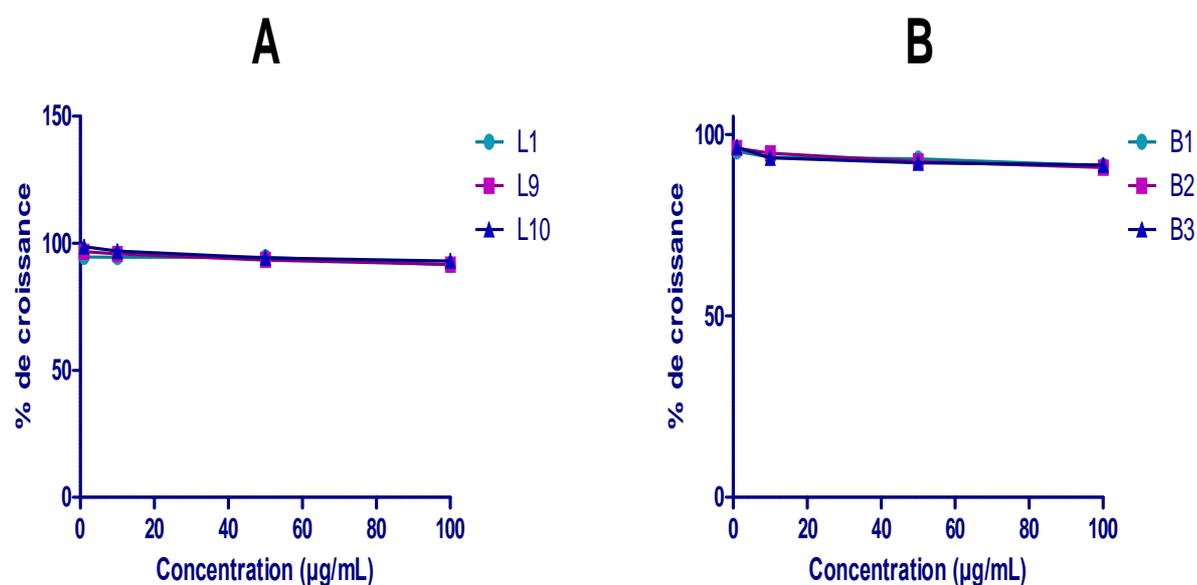
III.2. Etude des propriétés antiprolifératives des extraits bruts et fractions de *S. guineense var. macrocarpum*

III.2.1 Etude des propriétés antiprolifératives des extraits bruts

Au vu de la teneur en composés phénoliques (classe de métabolites secondaires reconnue pour ses propriétés anticancéreuses) et de la nature des composés phénoliques identifiés par HPLC, nous nous sommes consacrés dans cette seconde partie de ce travail à évaluer la capacité de ces extraits bruts et des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles à inhiber la croissance des cellules du cancer du sein, du col de l'utérus et leucémiques par la méthode à la Sulforhodamine B utilisant l'Adryamicine comme composé de référence. Nous avons par ailleurs déterminé le mécanisme d'action moléculaire sous-jacent de l'effet

anticancéreux par l'analyse du cycle cellulaire et déterminé la composition phytochimique des fractions les plus actives.

La figure 19 ci-dessous présente les pourcentages de croissance des lymphocytes B périphériques normaux utilisés comme lignée normale.

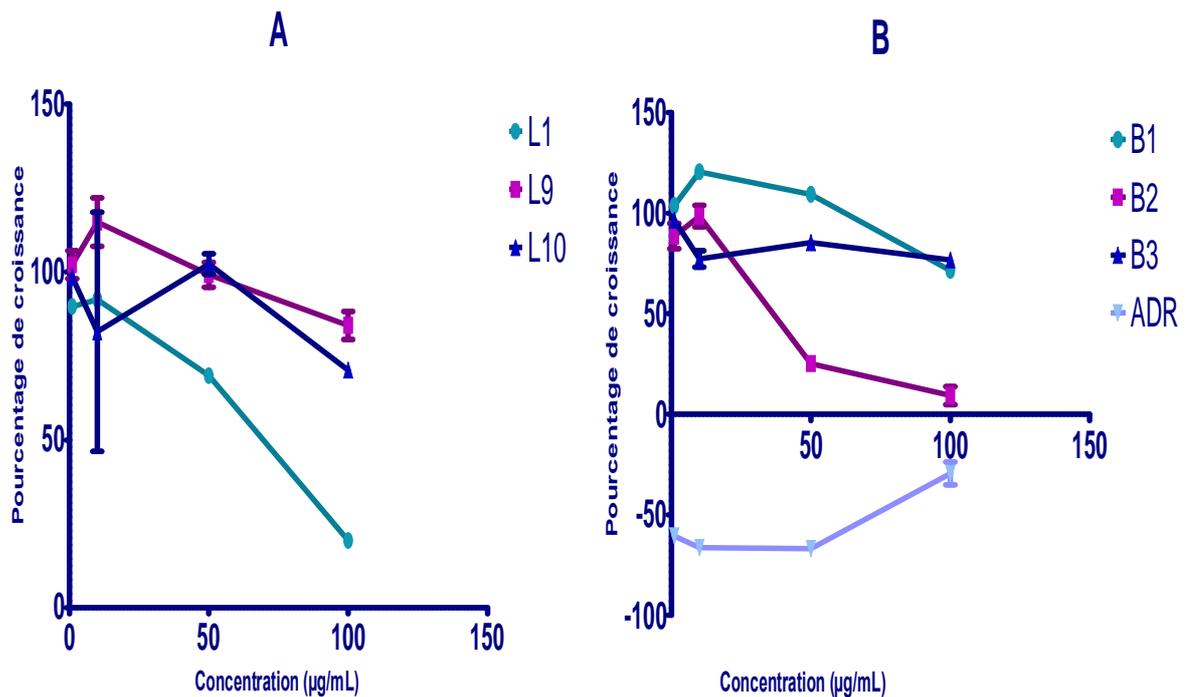


L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces ; A : extraits de feuilles ; B : extraits d'écorces. (n=3)

Figure 19 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les lymphocytes B

L'analyse montre que toutes concentrations testées n'ont pas eu un effet majeur sur la croissance des lymphocytes d'où les taux de croissance supérieurs à 90%. Les courbes ne présentant pas de pente, il n'a pas été possible de calculer les GI₅₀. Toutefois, les extraits ne sont considérés comme inhibant la croissance des cellules que lorsque les taux de croissance sont inférieurs à 50 aussi bien à faible qu'à forte concentration.

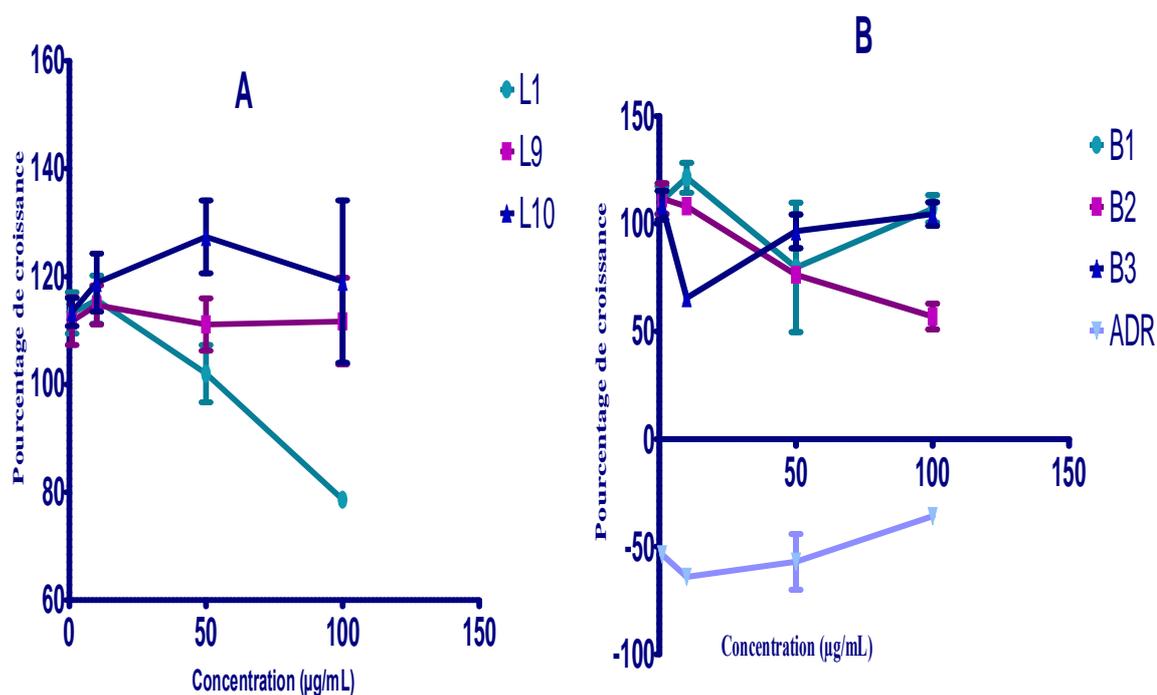
La figure 20 présente ci-dessous les résultats des tests antiprolifératifs exprimés en pourcentage de croissance par rapport au contrôle pour la lignée hormono-dépendante des cellules du cancer du sein (MCF7).



L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces ; A : extraits de feuilles ; B : extraits d'écorces. (n=3) ; ADR : Adryamicine.

Figure 20 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de *S. guineense* sur la croissance des cellules du cancer du sein (MCF7)

A l'analyse de cette figure, il ressort que l'inhibition de la prolifération des cellules MCF7 augmente avec la concentration en extrait. L'extrait éthanolique de feuilles a présenté le meilleur effet inhibiteur avec un pourcentage de croissance de $20,1 \pm 2,05\%$ à la concentration $100 \mu\text{g/mL}$ comparativement à ses homologues aqueux et hydro-éthanolique dont les pourcentages étaient respectivement de $84,1 \pm 7,23\%$ et $70,8 \pm 3,10\%$ à la même concentration. En revanche pour les extraits d'écorces, l'extrait aqueux a inhibé plus efficacement la croissance de ces cellules avec seulement $9,3 \pm 7,86\%$ de cellules viables à $100 \mu\text{g/mL}$ contre $71,5 \pm 4,23\%$ et $76,7 \pm 1,64\%$ pour les extraits éthanolique et hydro-éthanolique respectivement. Toutefois, l'adryamicine utilisé comme anticancéreux de référence a présenté une meilleure activité.



L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces ; A : Extraits de feuilles ; B : Extraits d'écorces ; ADR : Adryamicine. (n=3)

Figure 21 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de *S. guineense* sur la croissance des cellules du cancer du sein (MDA-MB231)

Les effets inhibiteurs des extraits vis à vis de la croissance des cellules de la lignée MDA-MB231 sont présentés sur la figure 21 ci-dessus. Bien qu'étant également une lignée du cancer du sein, les extraits ont à l'inverse stimulé la croissance des cellules de la lignée non hormono-dépendante MDA-MB231 (figure 21A). Pour ce qui est des extraits de feuilles, les pourcentages de croissance varient de $111,7 \pm 7,69$ à $124,5 \pm 11,7\%$. Seul l'extrait éthanolique a faiblement inhibé la prolifération cellulaire avec un pourcentage de $78,6 \pm 1,45$ à $100 \mu\text{g/mL}$. Le même effet (stimulation de la croissance) a été observé avec les extraits éthanolique et hydro-éthanolique d'écorces avec des valeurs allant de $121,3 \pm 12,1$ à $107 \pm 10,98$ contrairement à l'extrait aqueux qui, bien que faiblement a inhibé la croissance des cellules à la plus forte concentration testée ($56,8 \pm 10,40\%$). En comparant les effets de tous les extraits sur les deux lignées MCF7 et MDA-MB231, il ressort que la lignée hormono-dépendante MCF7 a été plus sensible aux extraits que la lignée non hormono-dépendante MDA-MB231.

Les équations de droite des courbes dose-réponse de chaque extrait ont permis de calculer trois paramètres pour chaque extrait : la GI₅₀, concentration de l'extrait qui inhibe la croissance de 50% de cellules ; la TGI, concentration de l'extrait entraînant une inhibition totale

de la prolifération cellulaire et la LC₅₀, concentration de l'extrait qui entraîne la mort de 50% de cellules. Les deux premiers paramètres (GI₅₀ et TGI) sont des indicateurs du pouvoir antiprolifératif des extraits tandis que le dernier est un indicateur de l'effet cytotoxique.

La valeur de GI₅₀ est obtenue à partir de l'équation de droite $y = (ax+b)$ en posant $y=50$

Pour TGI, on considère $y=0$ et pour la LC₅₀, $y=-50$. Le tableau 8 ci-dessous présente les valeurs des paramètres antiprolifératifs (GI₅₀ et TGI) et cytotoxique (LC₅₀) des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* sur les cellules du cancer du sein MCF7.

Tableau VIII: Valeurs des GI₅₀, TGI et LC₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* sur les cellules du cancer du sein MCF7

Lignée cellulaire (MCF7)			
Extrait	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₁	64,71±0,42	133,90±0,14	203,09±0,21
L ₉	ND	ND	ND
L ₁₀	174,51±0,49	318,02±0,03	461,53±0,15
B ₁	172,23±0,5	301,00±0,01	429,77±0,11
B ₂	46,06±0,12	100,16±0,19	154,26±0,13
B ₃	333,48±0,29	765,63±0,9	1197,78±0,11
ADR	<10	<10	<10

ND : Non Déterminé ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique +d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanolique d'écorces. ADR : Adryamicine

Il ressort de l'analyse de ce tableau que l'extrait aqueux d'écorces a présenté le meilleur effet antiprolifératif avec des valeurs de GI₅₀ et TGI de 46,06±0,12 µg/mL et 100,16±0,09 µg/mL respectivement suivi de l'extrait éthanolique de feuilles (GI₅₀ et TGI 64,71±0,2µg/mL et 133,90±0,14µg/mL respectivement). Les mêmes extraits ont également démontré le meilleur effet cytotoxique avec les plus faibles valeurs de LC₅₀ de 154,26 ±0,13 µg/mL et 203,09±0,21µg/mL respectivement. A l'opposé, l'extrait hydro-éthanolique d'écorces a présenté le plus faible effet antiprolifératif et cytotoxique (GI₅₀= 333,48±0,9 µg/mL et LC₅₀=1197,78±0,11µg/mL). Pour l'extrait aqueux de feuilles, les paramètres antiprolifératifs et cytotoxiques n'ont pas être déterminés.

Tableau IX: Valeurs des GI₅₀, TGI et LC₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du sein MDA-MB231

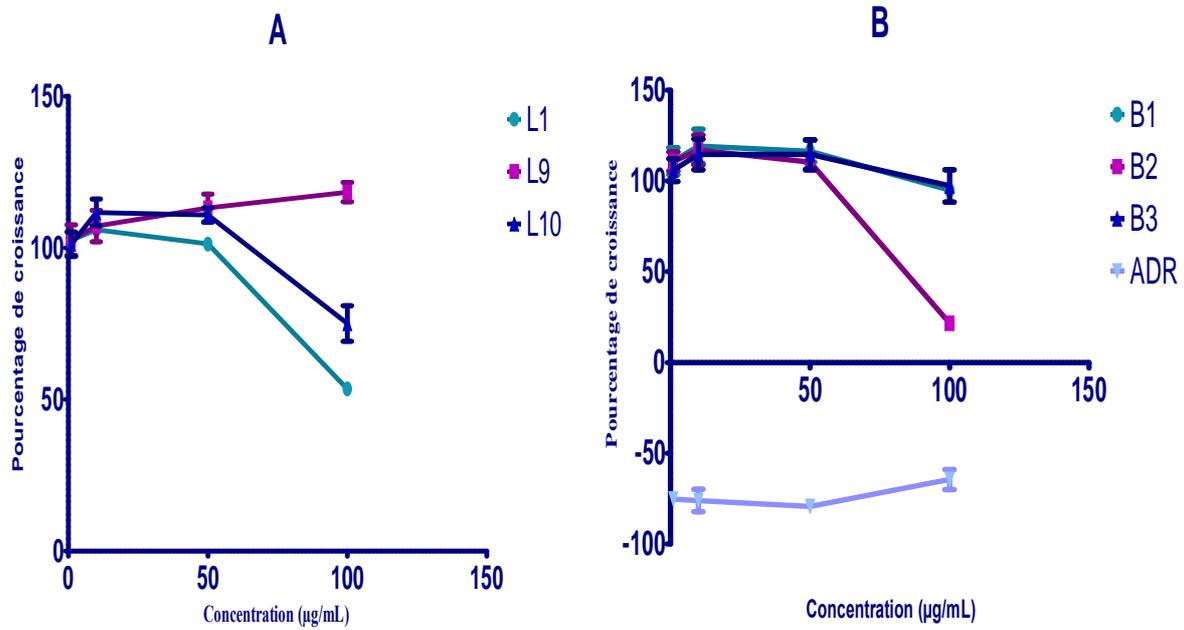
Lignée cellulaire (MDA-MB231)			
Extrait	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₁	184,51 ±0,12	320,38 ±0,08	456,25 ±0,14
L ₉	4062,58 ±0,08	7288,38 ±0,18	10514,19 ±0,1
L ₁₀	ND	ND	ND
B ₁	792,27 ±0,9	1386,80 ±0,09	1981,33 ±0,02
B ₂	115,26 ±0,1	205,60 ±0,21	295,93 ±0,09
B ₃	ND	ND	ND
ADR	<10	<10	<10

ND : Non Déterminé ; L₁ : Extrait éthanologique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanologique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanologique d'écorces B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanologique d'écorces. ADR : Adryamicine ; (n=3)

Le tableau 9 ci-dessus présente les valeurs de GI₅₀, LC₅₀ et TGI des extraits bruts vis à vis des cellules de la lignée du cancer du sein MDA-MB231. D'une manière générale, les valeurs pour chaque paramètre sont significativement plus élevées (p<0,05) comparativement à celles obtenues avec la lignée MCF7. Pour les GI₅₀, les extraits aqueux d'écorces et éthanologique de feuilles ont des valeurs 2,5 et 2,8 fois supérieures à celles obtenues avec la lignée MCF7 respectivement. Toutefois, les mêmes extraits (aqueux d'écorces et éthanologique de feuilles) ont présenté les meilleures activités antiprolifératives et cytotoxique. Par contre, c'est l'extrait aqueux de feuilles qui a démontré les plus effets inhibiteur de croissance et cytotoxique (GI₅₀=4062,58±0,08 µg/mL et LC₅₀=10514,19±0,1µg/mL) vis-à-vis de la lignée MDA-MB231.

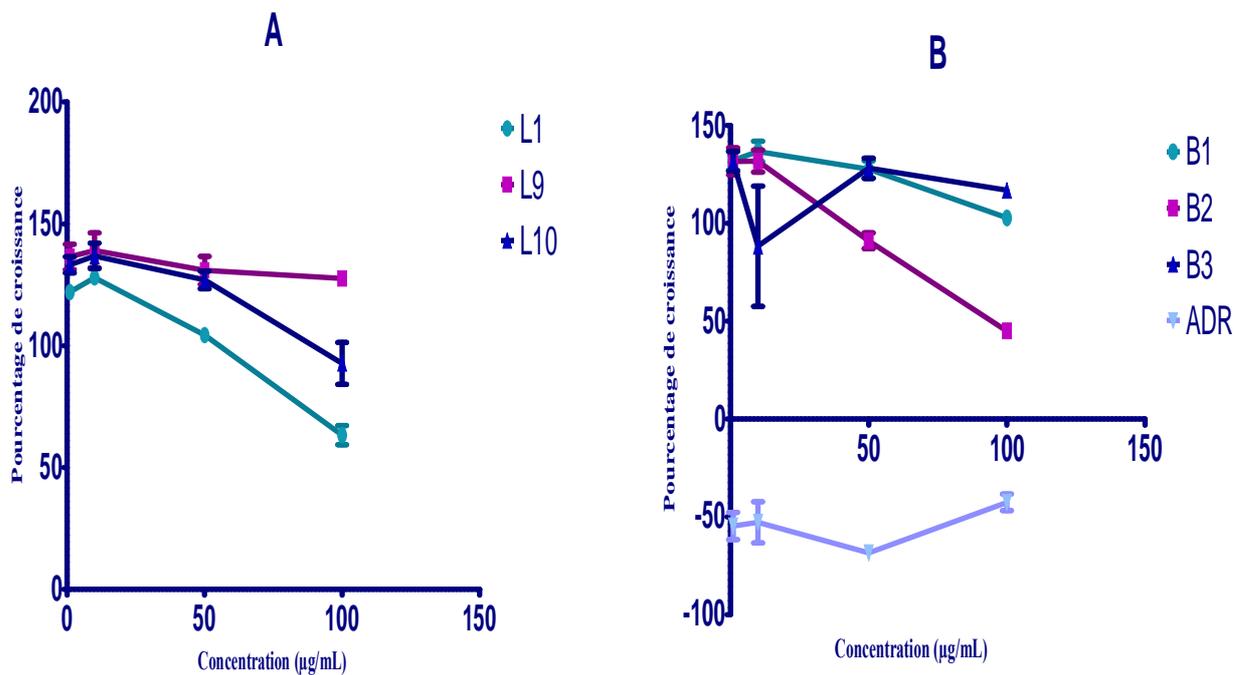
Parallèlement à l'étude de l'effet antiprolifératif des extraits sur les lignées du cancer du sein, nous avons également testé les mêmes extraits dans les mêmes conditions expérimentales sur les lignées du cancer du col de l'utérus SiHa et HeLa porteuses des sous types 16 et 18 de VPH respectivement.

Les pourcentages de croissance des cellules de chacune de ces deux lignées après traitement par les extraits bruts de feuilles et d'écorces sont présentés sur les figures 22 et 23.



L₁ : Extrait éthanologique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanologique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanologique d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanologique d'écorces A : Extraits de feuilles ; B : Extraits d'écorces ; ADR : Adryamicine. (n=3)

Figure 22 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de *S. guineense* sur la croissance des cellules humaines du cancer col de l'utérus (SiHa) ;



L₁ : Extrait éthanologique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanologique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanologique d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanologique d'écorces A : Extraits de feuilles ; B : Extraits d'écorces ; ADR : Adryamicine. (n=3)

Figure 23 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de *S. guineense* sur la croissance des cellules du cancer col de l'utérus (HeLa)

Concernant les feuilles, les extraits éthanolique et hydro-éthanolique ont démontré un effet inhibiteur de la croissance uniquement à 100µg/mL, concentration en deçà de laquelle ils ont plutôt un effet stimulateur de la prolifération cellulaire. De même, l'extrait aqueux a plutôt stimulé la croissance de ces dernières à toutes les concentrations testées avec des pourcentages de cellules vivantes supérieures à 100. Quant aux écorces, nous avons obtenu le même profil d'activité que celui des extraits de feuilles avec les pourcentages de croissance supérieurs à 100 à toutes les concentrations testées jusqu'à 50µg/mL. Toutefois, à 100µg/mL, les extraits éthanolique et hydro-éthanolique ont démontré une faible inhibition de la prolifération contrairement à l'extrait aqueux dont l'effet inhibiteur a été significatif avec 21,60±4,45% de cellules viables à 100µg/mL. Ces effets inhibiteurs expliquent les valeurs de GI₅₀, LC₅₀ et TGI (tableau 20).

Pour ce qui est de la lignée HeLa, les extraits dans l'ensemble ont démontré un profil d'activité quasi identique à celui présenté avec les cellules SiHa mais avec des pourcentages de croissance plus élevés. Cette faible sensibilité des cellules vis-à-vis des extraits justifie les valeurs des paramètres antiprolifératifs et cytotoxiques résumées dans le tableau 21.

Il ressort de l'analyse du tableau 10 que, tout comme pour les lignées cellulaires du cancer du sein (MCF7 et MDA-MB231), l'extrait aqueux d'écorces a présenté la meilleure activité antiproliférative (GI₅₀=84,54 ± 0,3µg/mL) sur les cellules SiHa suivi de l'extrait éthanolique de feuilles (GI₅₀=122,30 ± 0,11µg/mL). Les cellules ont été moins sensibles à l'extrait hydro-éthanolique d'écorces qui a présenté les valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ les plus élevées (GI₅₀=553,0 ± 0,14µg/mL ; TGI=990,40 ± 0,7µg/mL et LC₅₀=1429,7 ± 1,11µg/mL).

Quant à la lignée HeLa (Tableau 11), les extraits ont été moins actifs sur les cellules HeLa que sur les cellules SiHa. Toutefois, l'extrait aqueux d'écorce qui a été le plus actif a des valeurs de GI₅₀ et LC₅₀ de 95±0,80µg/mL et 204,80 ± 0,12µg/mL respectivement.

Tableau X: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du col de l'utérus (SiHa)

Lignée cellulaire (SiHa)			
Extrait	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₁	122,3 ± 0,11	222,8 ± 0,11	323,4 ± 0,21
L ₉	ND	ND	ND
L ₁₀	210,5 ± 0,12	381,8 ± 0,10	553,1 ± 0,14
B ₁	361,7 ± 0,22	628,2 ± 0,2	894,8 ± 0,02
B ₂	84,5 ± 0,3	140,0 ± 0,9	195,5 ± 0,07
B ₃	551,0 ± 0,5	990,4 ± 0,7	1429,7 ± 1,11
ADR	<10	<10	<10

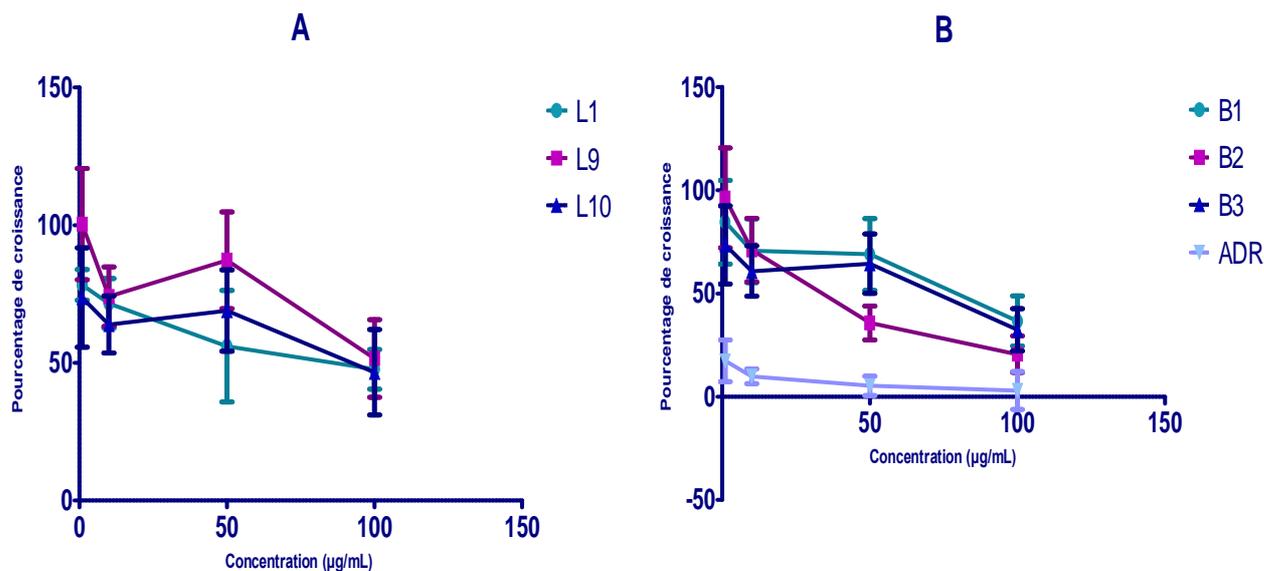
ND : Non Déterminé ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces. ADR : adryamicine.

Tableau XI: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* sur les cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa)

HeLa			
Extrait	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₁	126,4 ± 0,87	205,8 ± 0,11	285,1 ± 1,11
L ₉	813,5 ± 0,7	1276,6 ± 0,5	1739,6 ± 0,10
L ₁₀	211,8 ± 0,44	330,4 ± 0,8	448,9 ± 0,11
B ₁	276,1 ± 0,29	433,6 ± 0,9	591,2 ± 0,9
B ₂	95,0 ± 0,80	149,9 ± 0,5	204,8 ± 0,12
B ₃	ND	ND	ND
ADR	<10	<10	<10

ND : Non Déterminé ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanolique d'écorces. ADR : adryamicine. (n=3)

La figure 24 ci-dessous présente les pourcentages de croissance des cellules de la lignée K562 en fonction de la concentration après traitement des cellules des extraits bruts de feuilles et d'écorces. Contrairement à l'effet observé avec les cellules du cancer du sein (MCF7 et MDA-MB231) et du col de l'utérus (SiHa et HeLa), les extraits ont fortement inhibé la prolifération des cellules leucémiques K562. Cette forte inhibition se traduit par des pourcentages de croissance variant de 78,3±9,71% à 46,5±2,68% pour les extraits éthanolique et hydro-éthanolique de feuilles. Toutefois, il convient de noter que l'inhibition de la croissance des cellules n'augmente pas significativement avec la concentration en extraits contrairement aux extraits d'écorces qui bien qu'ayant démontré une faible activité inhibitrice à 1µg/mL, ont présenté les pourcentages de croissance les plus faibles à 100µg/mL. Ainsi, à 100µg/mL, les pourcentages de croissance des cellules varient de 36,6±2,04% à 20,6±1,27% pour les extraits d'écorces contre 51,6±2,35 % à 46,5±2,88% pour les extraits de feuilles.



A : feuilles ; B : écorces ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanolique d'écorces; ADR : Adryamicine. (n=3)

Figure 24 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de *S. guineense* sur la croissance des cellules de leucémie myéloïde chronique humaine (K562).

Le tableau 12 ci-dessous récapitule les valeurs des paramètres antiprolifératifs et cytotoxiques obtenus après traitement des cellules de la lignée K562 par les extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense*.

Tableau XII: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* sur les cellules de leucémie chronique humaine (K562)

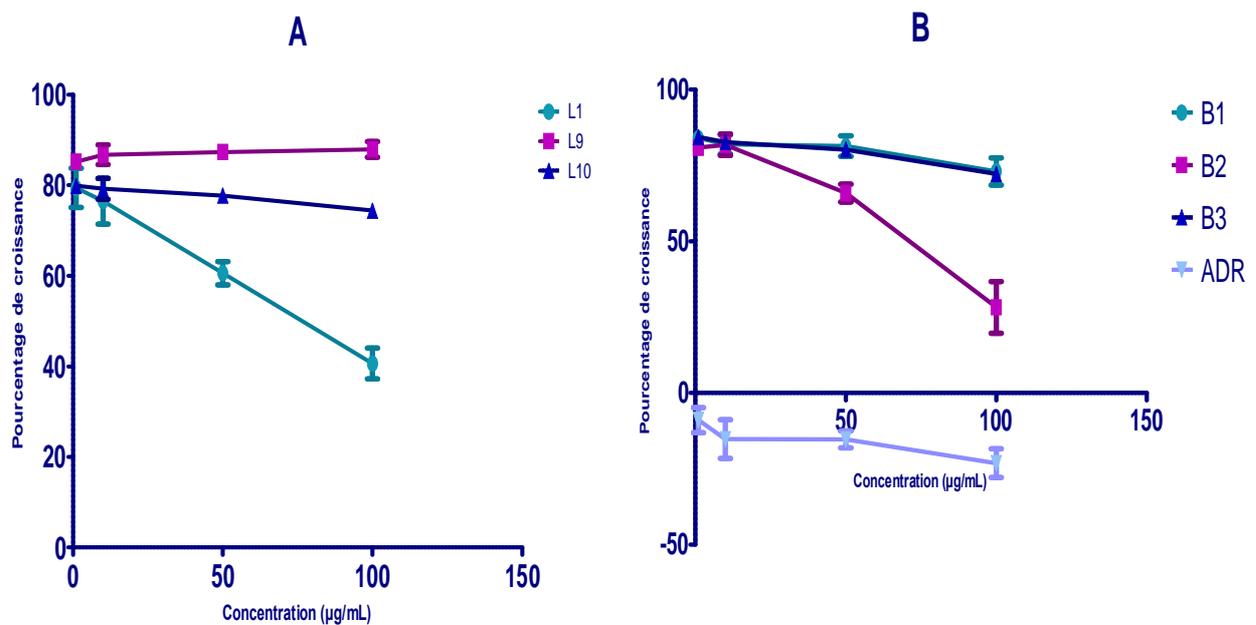
Lignée cellulaire (K562)			
Extrait	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₁	62,35 ± 0,69	204,08 ± 1,41	345,8 ± 0,97
L ₉	117,38 ± 0,21	414,19 ± 1,76	389,94 ± 0,97
L ₁₀	99,53 ± 0,14	321,74 ± 1,57	544,26 ± 1,18
B ₁	76,08 ± 0,30	193,98 ± 2,25	311,88 ± 1,09
B ₂	46,67 ± 0,35	114,24 ± 1,88	181,81 ± 1,06
B ₃	84,5 ± 1,88	250,01 ± 1,18	415,52 ± 2,00
ADR	<10	<10	<10

ND : Non Déterminé ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces B₂: extrait aqueux d'écorces ; B₃: Extrait hydro-éthanolique d'écorces. ADR : Adryamicine. A : Extraits de feuilles ; B : Extraits d'écorces ; (n=3)

Il ressort de l'analyse de ce tableau que les valeurs de GI₅₀ varient de 46,67µg/mL à 117,38µg/mL. L'extrait aqueux d'écorces a démontré le meilleur effet antiprolifératif et

cytotoxique avec des valeurs de GI_{50} et LC_{50} de $46,67\mu\text{g/ml}$ et $181,81\mu\text{g/mL}$ respectivement. Cependant, contrairement aux résultats obtenus sur les lignées du cancer du sein et du col de l'utérus, les extraits éthanolique et hydro-éthanolique d'écorces ont présenté une meilleure activité antiproliférative que l'extrait éthanolique de feuilles. De plus, pour l'extrait éthanolique d'écorces, les valeurs de GI_{50} obtenues sont 3 et 4 fois inférieures à celles obtenues avec les lignées HeLa et SiHa respectivement. De même, cette GI_{50} est 10 fois inférieure à la valeur obtenue avec le même extrait sur les cellules MDA-MB231 ce qui suggère une cytotoxicité sélective de cet extrait vis-à-vis des cellules K562.

En plus de la lignée leucémique myéloïde chronique K562, les effets antiprolifératifs des extraits ont également été testés sur la lignée leucémique myéloïde aigue HL-60 dont les pourcentages de croissance des cellules en fonction des concentrations sont présentés sur la figure 25.



L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces ; A : Extraits de feuilles ; B : Extraits d'écorces ; ADR : Adryamicine. (n=3)

Figure 25 : Effets des extraits bruts de feuilles et écorces de *S. guineense* sur la croissance des cellules de leucémie myéloïde aigue humaine (HL-60)

D'une manière générale, les extraits ont été moins actifs sur les cellules HL-60 en comparaison avec les pourcentages obtenus avec les cellules de la lignée K562. Bien que tous les extraits aient inhibé la prolifération de ces cellules, seuls les extraits aqueux d'écorces et éthanolique de feuilles ont un pourcentage de croissance inférieur à 50 à la plus forte concentration testée. Pour les autres extraits, les pourcentages varient de $87,9 \pm 3,02$ à $72,2 \pm 0,75\%$. A l'inverse, l'extrait aqueux de feuilles a démontré plutôt un effet stimulateur de la croissance avec des pourcentages qui augmentent avec la concentration en extrait ($85,2 \pm 0,55$ à $1\mu\text{g/mL}$ et $87,9 \pm 3,02 \mu\text{g/mL}$ à $100\mu\text{g/mL}$).

Le tableau 13 ci-dessous présente les valeurs de GI_{50} , TGI et LC_{50} de tous les extraits bruts après traitement des cellules HL-60.

Tableau XIII: Valeurs de GI_{50} , TGI et LC_{50} des extraits bruts de feuilles et d'écorces de *S. guineense* sur les cellules de leucémie humaine chronique (HL-60)

Lignée cellulaire (HL-60)			
Extrait	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TGI ($\mu\text{g/mL}$)	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
L ₁	$76,5 \pm 0,36$	$203,11 \pm 0,1$	$345,8 \pm 0,97$
L ₉	ND	ND	$389,94 \pm 0,97$
L ₁₀	$557,97 \pm 6,6$	$1489,06 \pm 0,3$	$544,26 \pm 1,18$
B ₁	$336,89 \pm 5,64$	$830,47 \pm 0,64$	$311,88 \pm 1,09$
B ₂	$66,34 \pm 0,5$	$158,54 \pm 0,24$	$181,81 \pm 1,06$
B ₃	$296,93 \pm 0,4$	$727,22 \pm 0,84$	$415,52 \pm 2,00$
ADR	<10	<10	<10

ND : Non Déterminé ; L₁ : Extrait éthanolique de feuilles ; L₉ : extrait aqueux de feuilles ; L₁₀ : Extrait hydro-éthanolique de feuilles ; B₁ : Extrait éthanolique d'écorces ; B₂ : extrait aqueux d'écorces ; B₃ : Extrait hydro-éthanolique d'écorces. ADR : Adryamicine

En accord avec les pourcentages de croissance, l'extrait aqueux d'écorces a présenté les meilleurs effets antiprolifératifs et cytotoxique avec des valeurs de GI_{50} et LC_{50} de $66,34 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ et $250,74 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$ respectivement, suivi de l'extrait éthanolique de feuilles dont les valeurs de GI_{50} et LC_{50} étaient respectivement de $76,5 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$ et $329,86 \pm 2,73 \mu\text{g/mL}$. En revanche, les cellules HL-60 ont été moins sensibles à l'extrait hydro-éthanolique de feuilles qui a présenté les valeurs de GI_{50} et LC_{50} les plus élevées.

III.2.2. Etude des propriétés antiprolifératives des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de *S. guineense*

Après avoir testé les extraits bruts sur les six lignées cellulaires choisies pour ce travail, toutes les valeurs de GI₅₀ obtenues ont été supérieures à 20µg/mL. D'après les lignes directrices de l'Institut Américaine de Recherche sur le cancer (INC), une valeur de GI 50 ≤ à 20µg/mL obtenue avec la méthode à la SRB est recommandée comme valeur seuil pour considérer un extrait brut ou une fraction comme étant doté d'une activité antiproliférative vis-à-vis d'une lignée cellulaire lors du screening des extraits de plantes pour le développement de médicaments. Bien que l'extrait aqueux d'écorces ait démontré le meilleur effet antiprolifératif sur toutes les lignées testées, nous avons entrepris de fractionner plutôt l'extrait éthanolique de feuilles qui présentait la meilleure activité après l'extrait aqueux d'écorces.à cause de la difficulté à obtenir de grandes quantités de poudre d'écorces. Ce choix a par ailleurs été conforté par son meilleur rendement d'extraction et ses meilleures teneurs en phénols et flavonoïdes totaux, classes de métabolites secondaires connus pour leurs effets antiprolifératifs.

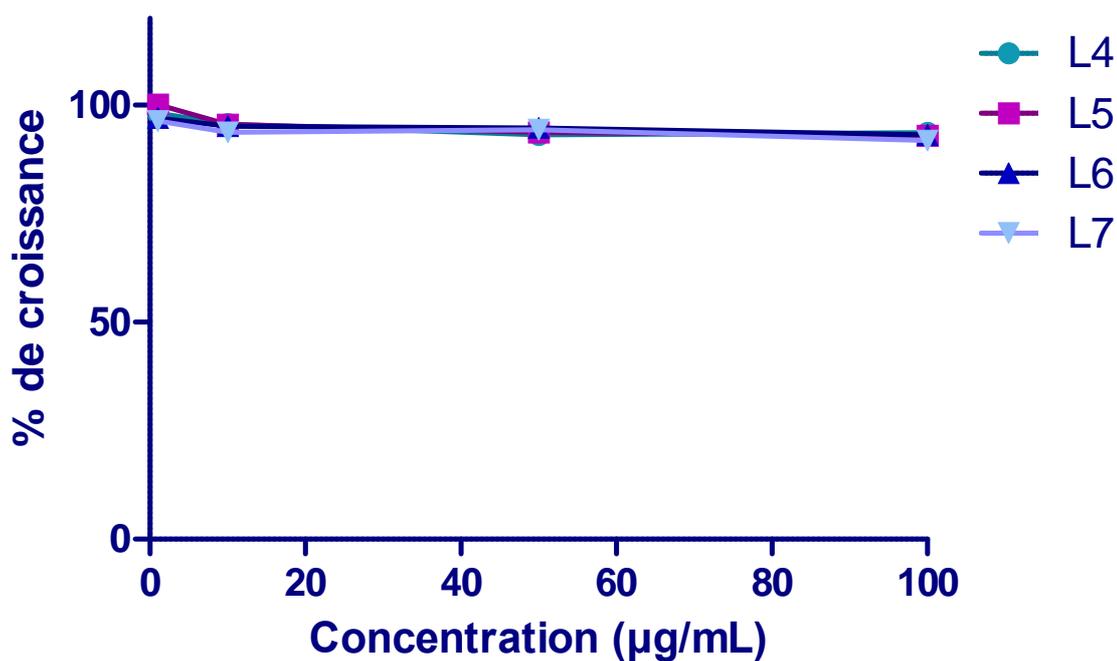
Les masses et les polarités des différentes fractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles sont présentées dans le tableau 14 :

Tableau XIV: Masse des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense*

Fraction	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇
Polarité	Hex /AE 6:4 (v:v)	Hex /AE 4:6 (v:v)	AE / MeOH 7:3 (v:v)	MeOH pur
Masse (g)	12,34	18,14	18,62	15,71

Les fractions ainsi obtenues ont été re-testées sur les mêmes lignées cellulaires dans les mêmes conditions expérimentales.

La figure 26 ci-dessous présente les pourcentages de croissance des lymphocytes B après traitement par les fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles

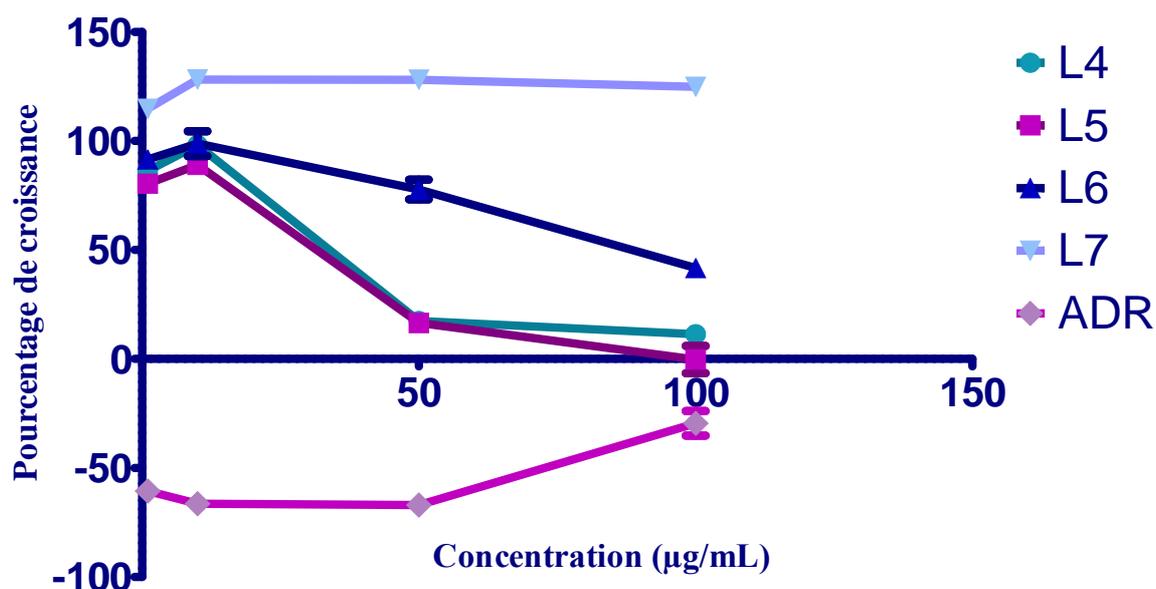


Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : adryamicine

Figure 26 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les lymphocytes B

L'analyse de cette figure montre que tout comme avec les extraits bruts, les fractions n'ont pas eu un effet inhibiteur de la croissance des lymphocytes B

Les figures 27 et 28 présentent respectivement les pourcentages de croissance des cellules MCF7 et MDA-MB231 après traitement par les fractions L₄, L₅, L₆ et L₇ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense*.



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur; ADR : adriamycine

Figure 27 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules humaines du cancer du sein (MCF7)

L'analyse de cette figure montre que les fractions L₄ et L₅ ont démontré un pouvoir inhibiteur de la croissance des cellules MCF7 significativement supérieur à celui des fractions L₆ et L₇. A la concentration 50µg/mL, les pourcentages de cellules vivantes sont inférieurs à 20% pour les fractions L₄ et L₅ tandis que pour L₆ et L₇, ils restent supérieurs à 50%. Par ailleurs, la fraction L₅ induit une mort cellulaire à la concentration 100µg/mL qui se traduit par un pourcentage de croissance négatif (-0,3±10,78%).

Le tableau 15 ci-dessous présente les valeurs des paramètres antiprolifératifs et cytotoxique obtenus après traitement des cellules de la lignée MCF7 par les fractions L₄, L₅, L₆ et L₇.

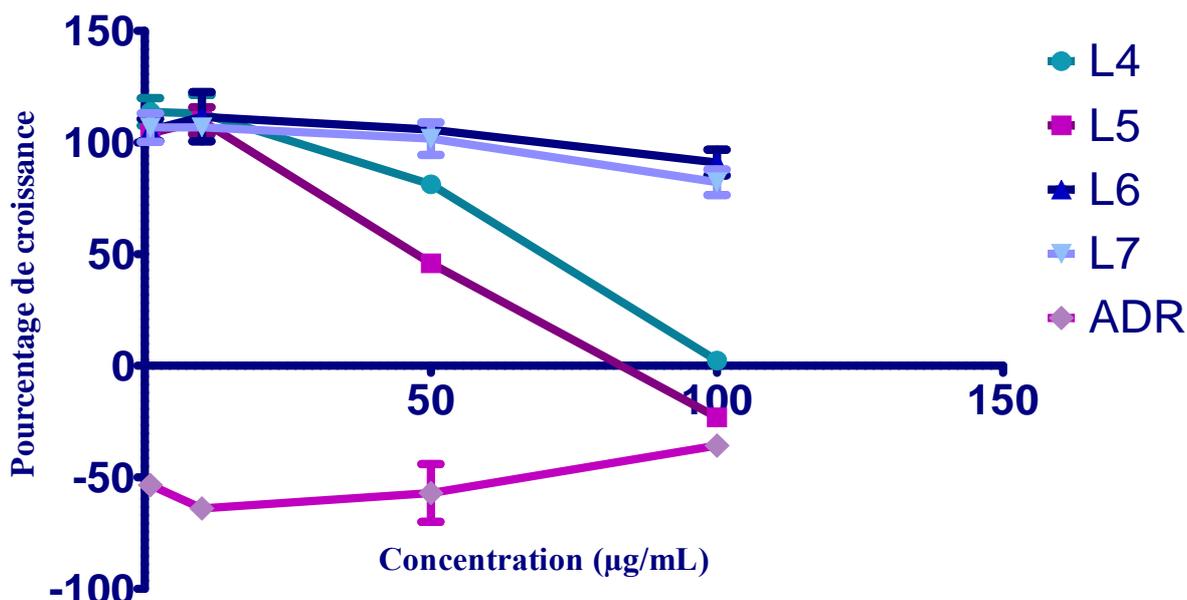
Tableau XV: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du sein (MCF7)

Lignée cellulaire (MCF7)			
Fraction	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₄	43,88 ± 0,3	99,43 ± 1,12	154,97 ± 1,18
L ₅	36,38 ± 0,29	90,02 ± 1,88	143,67 ± 1,09
L ₆	72,20 ± 0,44	135,40 ± 1,00	198,60 ± 1,06
L ₇	70,47 ± 0,69	177,5 ± 0,97	284,52 ± 2,01
ADR	<10	<10	<10

L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine.

Il ressort de l'analyse de ce tableau que la fraction L₅ a présenté le meilleur pouvoir antiprolifératif suivie de la fraction L₄ avec des valeurs de GI₅₀ de 36,38 ± 0,29 µg/mL et 43,88 ± 0,3 µg/mL respectivement. De même, les plus faibles valeurs de LC₅₀ ont été obtenues avec les fractions L₄ et L₅. A l'inverse, bien qu'ayant présenté une valeur de GI₅₀ plus faible que celle de la fraction L₇, la concentration de la fraction L₆ qui induit un effet cytostatique (TGI) sur les cellules MCF7 est inférieure à celle de la fraction L₇. En effet, L₆ et L₇ ont présenté respectivement les valeurs de TGI de 135,40 ± 1,00 µg/mL et 177,5 ± 0,97 µg/mL ; il en est de même des concentrations LC₅₀ avec une valeur de 198,60 ± 1,06 µg/mL pour la fraction L₆ contre 284,52 ± 2,01 pour la fraction L₇.

La figure 28 présente les courbes dose-réponse des cellules MDA-MB231 après traitement par les fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles.



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur; ADR : adryamicine

Figure 28 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules humaines du cancer du sein (MDA-MB231)

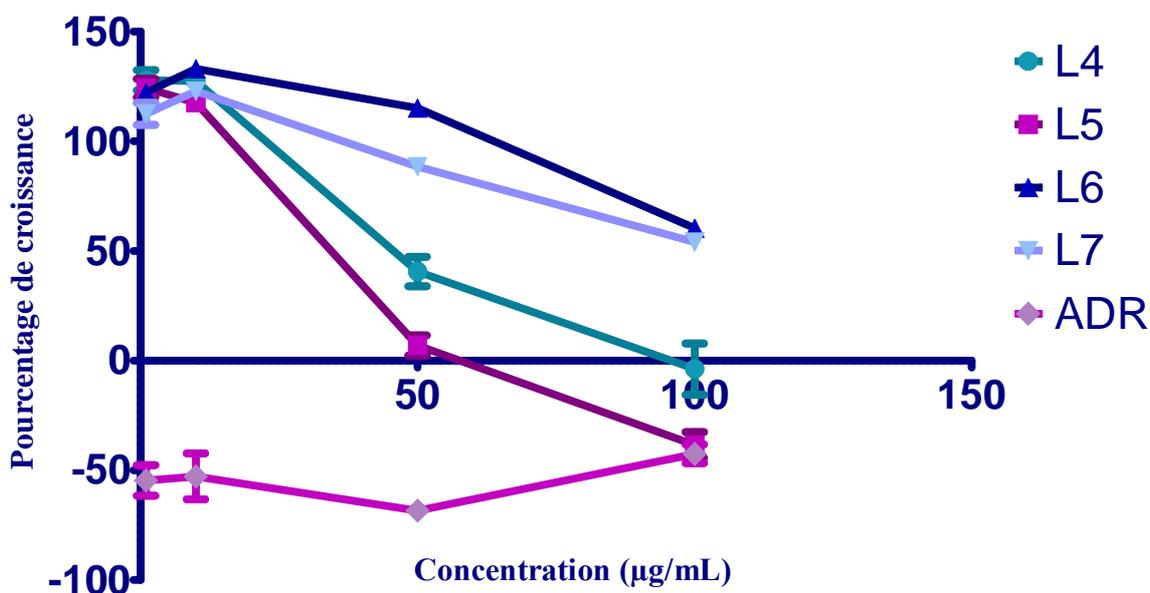
L'analyse de cette figure montre un profil inhibiteur de la croissance des cellules MDA-MB231 par les fractions similaire à celui observé avec les cellules MCF7. Néanmoins, les pourcentages de croissance restent supérieurs à 50 après traitement par toutes les fractions à 50 µg/mL à l'exception de la fraction L₅ (45,9 \pm 4,11%). A 100 µg/mL, on note un effet cytotoxique avec la fraction L₅ dont le pourcentage de croissance est de -23,1 \pm 3,06 et un effet quasi-cytostatique avec la fraction L₄. A contrario pour les fractions L₆ et L₇, la croissance reste supérieure à 80% à la plus forte concentration testée traduisant une faible sensibilité des cellules à ces fractions. Les paramètres antiprolifératifs et cytotoxique des fractions sont consignés dans le tableau 16. Comme précédemment avec les cellules MCF7, les fractions L₄ et L₅ (GI₅₀= 64, 48 et 46,45 µg/mL respectivement) ont présenté les meilleurs effets inhibiteur et cytotoxique vis-à-vis des cellules MDA-MB231. Toutefois, les valeurs ont été plus élevées que celles obtenues précédemment. La lignée MCF7 a été plus sensible aux fractions que la lignée MDA-MB 231.

Tableau XVI: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* vis-à-vis des cellules de la lignée du cancer du sein (MDA-MB231)

Lignée cellulaire (MDA-MB231)			
Fraction	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₄	64,48 ± 0,3	108,55 ± 2,12	152,58 ± 2,33
L ₅	46,45 ± 0,44	83,59 ± 0,75	120,73 ± 2,51
L ₆	331,18 ± 6,44	599,57 ± 2,88	867,95 ± 1,18
L ₇	231,84 ± 2,44	425,79 ± 0,97	619,74 ± 1,09
ADR	<10	<10	<10

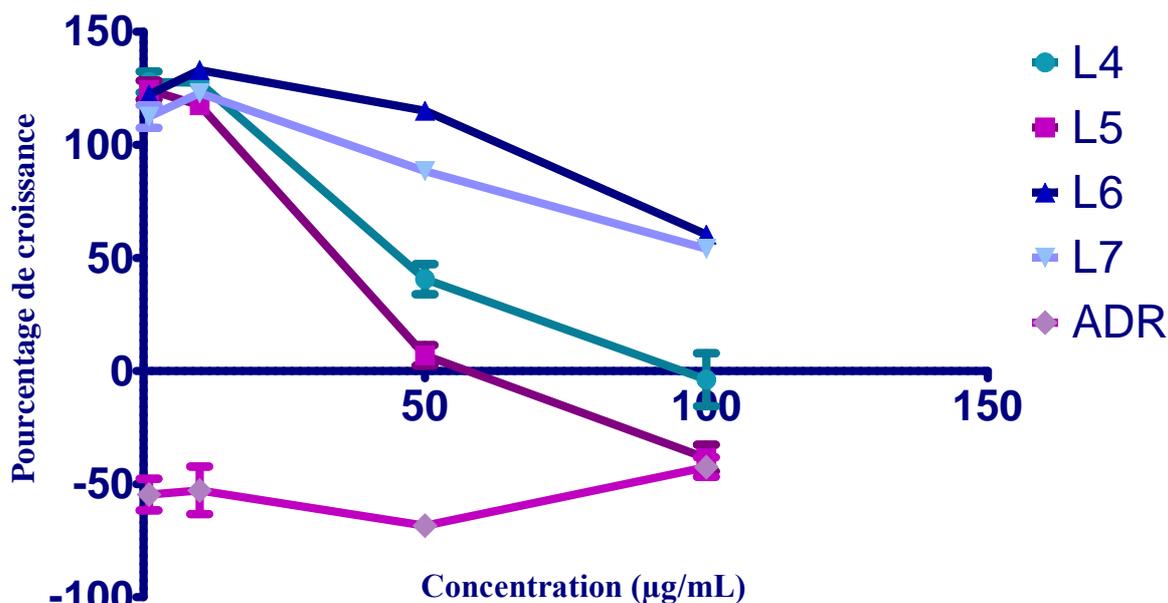
L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) : L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

Les valeurs de GI₅₀ obtenues à l'issue des tests antiprolifératifs avec les fractions L₄, L₅, L₆ et L₇ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles sur les cellules du cancer du sein ayant été supérieures à 20µg/mL, nous avons poursuivi les tests avec les cellules du cancer du col de l'utérus SiHa et HeLa. Les figures 29 et 30 ci-dessous présentent les pourcentages de croissance des cellules SiHa et HeLa en fonction de la concentration après traitement par les fractions L₄, L₅, L₆ et L₇.



Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) : L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

Figure 29 : Effets des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur la croissance des cellules humaines du cancer du col de l'utérus (SiHa)



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

Figure 30 : Effets des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules humaines du cancer du col de l'utérus (HeLa)

L'analyse de ces figures montre que toutes les fractions n'ont quasiment pas eu d'effet inhibiteur de la croissance à faible concentration. Au contraire, elles ont stimulé la croissance des cellules de la lignée HeLa à 1 et 10 µg/mL ; cet effet stimulateur de croissance s'est traduit par des pourcentages de croissance supérieurs à 100. Toutefois, à partir de la concentration 50 µg/mL, on note une inhibition significative de la croissance des cellules SiHa par les fractions L₄ et L₅. Cette inhibition augmente avec la concentration en extraits et aboutit à un effet cytotoxique à 100 µg/mL avec des pourcentages respectifs de $-17,6 \pm 6,95$ et $-48,5 \pm 7,84$ pour L₄ et L₅. Le même profil d'activité a été observé avec les cellules HeLa mais avec des pourcentages de croissance légèrement plus élevés comparativement à ceux obtenus avec la lignée SiHa.

Les paramètres antiprolifératifs et cytotoxiques des fractions sur les cellules des lignées SiHa et HeLa sont présentés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau XVII : Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa)

Lignée cellulaire (SiHa)			
Fraction	GI₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC₅₀ (µg/mL)
L ₄	48,1 ± 0,40	87,0 ± 0,33	125,9 ± 1,88
L ₅	33,2 ± 1,41	65,1 ± 0,75	97,0 ± 1,12
L ₆	156,1 ± 0,36	300,0 ± 0,64	444,0 ± 1,77
L ₇	654,5 ± 0,24	1305,6 ± 0,75	1956,7 ± 0,14
ADR	<10	<10	<10

L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) : L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

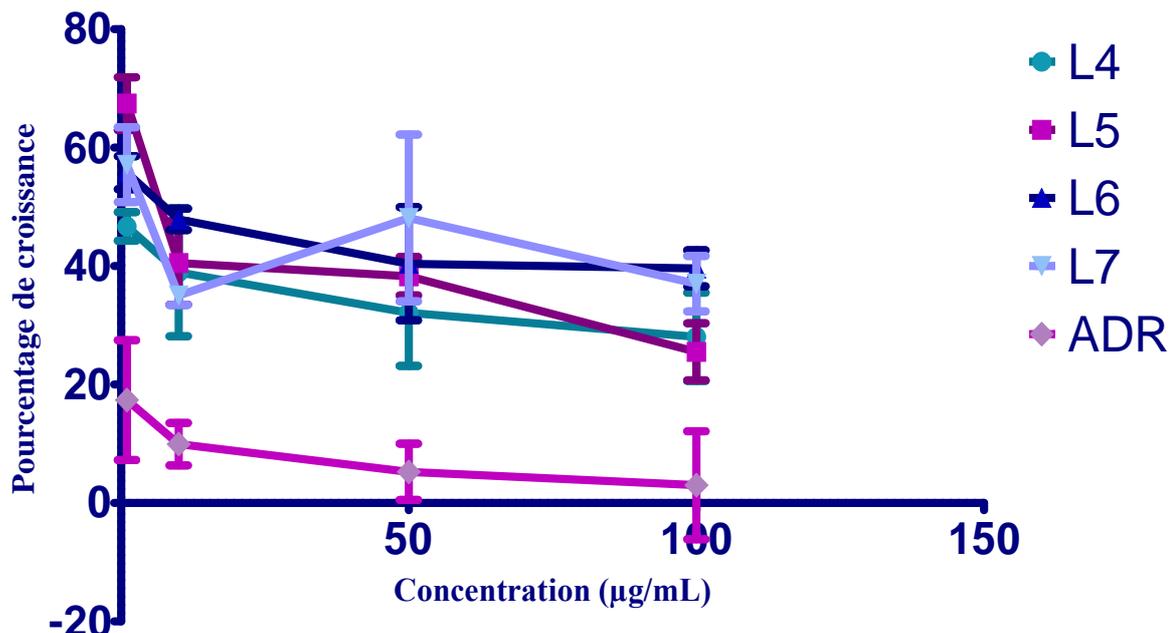
Tableau XVIII: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa)

Lignée cellulaire (HeLa)			
Fraction	LC₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	GI₅₀ (µg/mL)
L ₄	126,7 ± 1,76	91,6 ± 2,25	56,4 ± 0,41
L ₅	99,1 ± 1,57	70,4 ± 1,18	41,7 ± 0,53
L ₆	276,0 ± 2,25	201,2 ± 0,41	126,5 ± 0,76
L ₇	259,3 ± 2,73	183,5 ± 0,53	107,7 ± 0,43
ADR	<10	<10	<10

L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) : L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

Il ressort de l'analyse de ces tableaux que parmi toutes les fractions L₄ et L₅ ont été les plus actives aussi bien sur la lignée SiHa que HeLa. A l'inverse, la fraction L₇ a été la moins active sur les cellules SiHa avec une valeur de GI₅₀ de 654,5± 0,24µg/mL tandis que sur les cellules HeLa c'est la fraction L₆ qui a présenté la plus faible activité antiproliférative avec une valeur de GI₅₀ 126,50± 0,76µg/mL.

Etant donné que les valeurs de GI₅₀ obtenues avec les cellules du cancer du col de l'utérus étaient également supérieures à 20µg/mL, nous avons continué à évaluer la capacité des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles sur les cellules leucémiques (K562 et HL-60). La figure 31 ci-dessous présente les courbes dose-réponse des cellules K562 après traitement par les fractions L₄, L₅, L₆ et L₇



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

Figure 31 : Effets des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur la croissance des cellules humaines de leucémie myéloïde chronique (K562)

L'analyse de cette figure révèle que toutes les fractions ont inhibé la croissance des cellules de la lignée leucémique myéloïde chronique K562 aussi bien à faibles qu'à fortes concentrations. La fraction L₄ en particulier a inhibé la croissance des cellules de plus 50%. Toutefois, il est important de relever que l'inhibition de la croissance n'a pas augmenté significativement avec la concentration de la fraction (46,7 \pm 4,15% à 1 μ g/mL contre 28,1 \pm 12,92 à 100 μ g/mL pour la fraction L₄). En outre, bien que l'inhibition de la croissance ait été importante, il convient de noter qu'aucune fraction n'a entraîné un effet cytotoxique d'où les pourcentages de croissance positifs obtenus jusqu'à la concentration de 100 μ g/mL pour les fractions et 80 μ g/mL pour l'adryamicine utilisé comme médicament anticancéreux de référence. Cette absence de cytotoxicité explique les valeurs de LC₅₀ relativement élevées obtenues avec toutes les fractions tel que présentées dans le tableau 19.

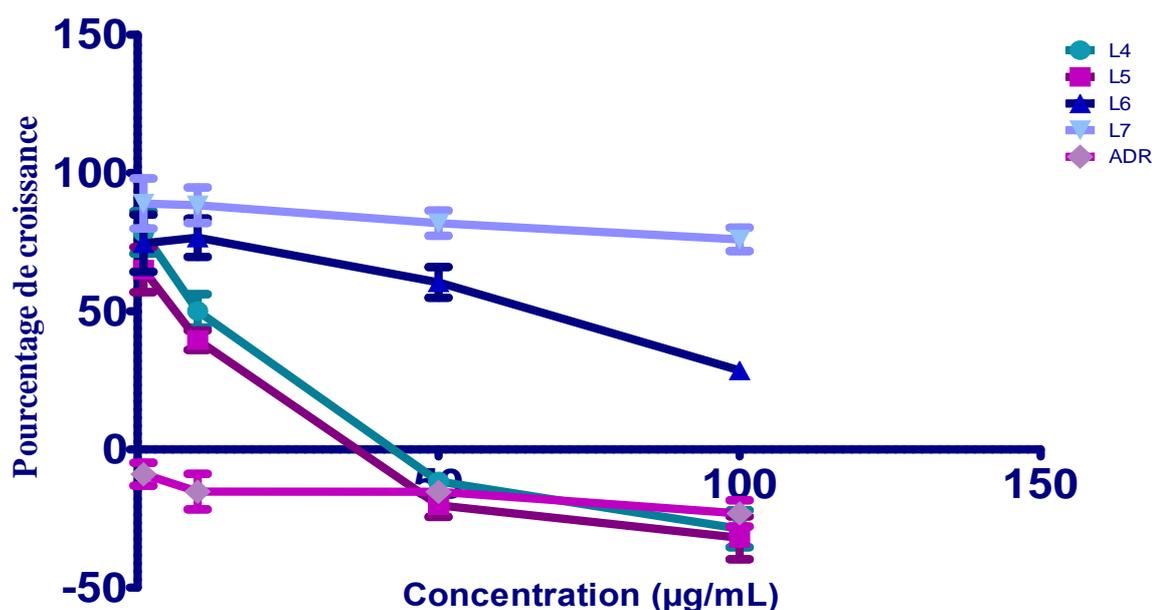
Tableau XIX: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules de leucémie myéloïde chronique humaine (K562)

Lignée cellulaire (K562)			
Fraction	GI₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC₅₀ (µg/mL)
L ₄	<1	259,41 ± 0,97	560,07 ± 0,44
L ₅	18,3 ± 0,14	173,39 ± 1,19	328,48 ± 0,80
L ₆	11,88 ± 0,33	360,06 ± 2,00	708,25 ± 0,29
L ₇	<1	475,91 ± 2,01	967,07 ± 3,87
ADR	<10	259,41 ± 1,19	560,07 ± 1,97

L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) : L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine.

L'analyse de ce tableau montre que malgré des valeurs de GI₅₀ des fractions L₄ et L₇ (<1µg/mL) significativement inférieures à celle de la fraction L₅ (18,3 ± 0,14µg/mL), cette dernière a présenté les valeurs de TGI et LC₅₀ les plus faibles. En effet, les valeurs de TGI et LC₅₀ pour la fraction L₅ étaient respectivement de 173,39 ± 1,19µg/mL et 328,48± 0,80 µg/mL contre 259,41± 0,97 µg/mL et 560,07± 1,97 µg/mL pour la fraction L₄ d'une part et 475,91 ± 2,01µg/mL et 967,07 ± 3,87µg/mL pour L₇ d'autre part. De même, la GI₅₀ de la fraction L₆ (11,88 ± 0,33µg/mL) était inférieure à celle de la fraction L₅ tandis que les valeurs de TGI et LC₅₀ de cette dernière étaient inférieures à celles de la fraction L₆. Du point de vue de la GI₅₀, les fractions L₄, L₆ et L₇ ont démontré un meilleur effet inhibiteur de la croissance que la fraction L₅, alors que du point de vue de l'effet cytostatique et cytotoxique, c'est la fraction L₅ qui a présenté la meilleure activité.

Parallèlement à l'étude des propriétés antiprolifératives des fractions L₄, L₅, L₆ et L₇ sur les cellules de la lignée de leucémie myéloïde chronique K562, nous avons également évalué les mêmes propriétés sur les cellules de la lignée de leucémie myéloïde aigue HL-60. La figure 32 ci-dessous présente les pourcentages de croissance des cellules HL-60 en fonction de la concentration après traitement par les fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles.



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

Figure 32 : Effets des fractions dérivées de l'extrait brut éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur la croissance des cellules humaines de leucémie myéloïde aigue (HL-60)

D'une manière générale, les fractions L₄ et L₅ ont inhibé plus efficacement la croissance des cellules HL-60 que les fractions L₆ et L₇ avec des pourcentages de croissance variant de 78,5 \pm 13,35 à -31,9 \pm 13,46 pour les fractions L₄ et L₅ contre 89,6 \pm 15,73 à 28,6 \pm 5,33 pour L₆ et L₇. Contrairement à la lignée K562, on note un effet cytotoxique induit par les fractions L₄ et L₅ à partir de la concentration 50 μ g/mL se traduisant par des pourcentages de croissance négatifs. Le tableau 20 ci-dessous présente les valeurs des paramètres antiprolifératifs et cytotoxiques des fractions L₄, L₅, L₆ et L₇ vis-à-vis des cellules HL-60.

Tableau XX: Valeurs de GI₅₀, TGI et LC₅₀ des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles de *S. guineense* sur les cellules de leucémie myéloïde aigue humaine (HL-60)

HL-60	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
L ₄	13,64 \pm 0,02	61,28 \pm 0,84	108,83 \pm 1,75
L ₅	1,68 \pm 0,01	53,97 \pm 0,39	106,27 \pm 2,40
L ₆	61,24 \pm 0,49	165,14 \pm 1,47	269,05 \pm 3,36
L ₇	283,23 \pm 0,84	641,40 \pm 1,18	999,57 \pm 1,49
ADR	<10	<10	<10

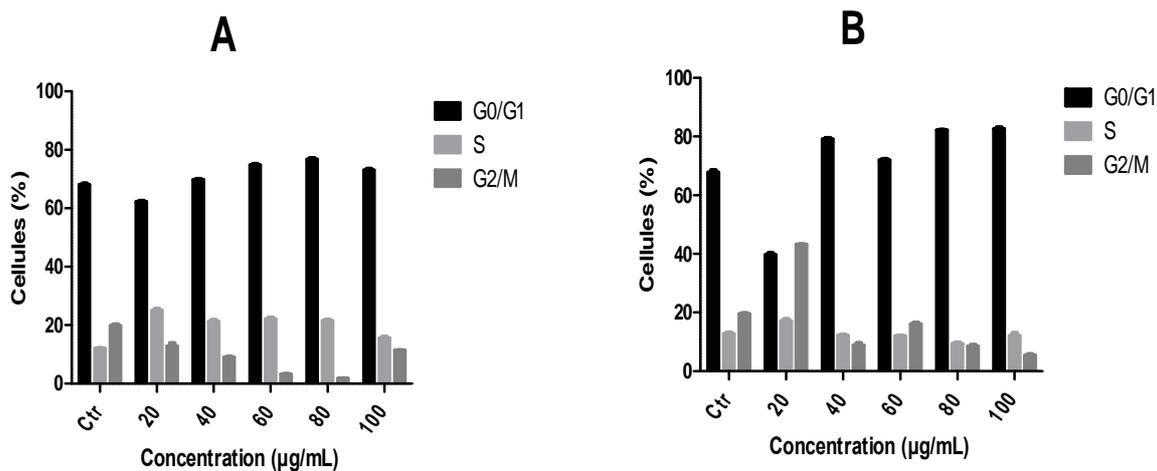
L₄ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) L₅ : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; L₆ : Fraction Acétate d'éthyle/MeOH (70/30) ; L₇ : Fraction au Méthanol pur ; ADR : Adryamicine

En accord avec les pourcentages de croissance, la fraction L₅ a démontré le meilleur antiprolifératif et cytotoxique sur les cellules HL-60 avec des valeurs de GI₅₀ et LC₅₀ de $1,68 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ et $106,27 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$ respectivement suivie de la fraction L₄ (GI₅₀= $13,64 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ et LC₅₀= $108,83 \pm 1,75 \mu\text{g/mL}$). A contrario, la fraction L₇ a été la moins active avec une GI₅₀ de $283,23 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$. En comparant les résultats obtenus avec les deux lignées leucémiques K562 et HL-60 à ceux obtenus avec les cellules du cancer du sein et du col de l'utérus, il ressort que les fractions L₄ et L₅ ont un effet antiprolifératif et cytotoxique sélectif vis-à-vis des cellules leucémiques K562 et HL-60 tandis que les fractions L₆ et L₇ ont démontré une action sélective vis-à-vis des cellules de la lignée de leucémie myéloïde chronique K562 (GI₅₀ < $20 \mu\text{g/mL}$). Sur la base des valeurs de GI₅₀ obtenues, les fractions L₄ et L₅ peuvent être candidates pour le développement des médicaments contre les leucémies myéloïdes chronique et aigue selon les lignes directrices de l'INC (GI₅₀ < $20 \mu\text{g/mL}$), alors que les fractions L₆ et L₇ peuvent être considérées comme actives uniquement contre la leucémie myéloïde chronique. Les fractions L₄ et L₅ ayant démontré une constance d'activité vis-à-vis des six lignées cellulaires testées ont donc été choisies pour l'étude du mécanisme d'action en vue de comprendre quels sont mécanismes responsables de l'activité inhibitrice de la prolifération cellulaire et cytotoxique de ces dernières.

III.3. Etude du mécanisme d'action antiprolifératif et cytotoxique des fractions L₄ et L₅ dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles.

III.3.1 Etude des effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire et l'apoptose

Dans cette partie du travail nous nous sommes consacré à étudier les effets du traitement par les fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire et l'apoptose des cellules du cancer du sein, du col de l'utérus et leucémiques. En effet, l'échappement l'insensibilité aux signaux de mort cellulaire ainsi qu'une dérégulation de la division cellulaire sont deux phénomènes importants responsables de la genèse et la progression du cancer. Rappelons que les concentrations utilisées dans cette partie de l'étude ont été choisies en fonction des valeurs de GI₅₀ obtenues pour chaque fraction et sur chaque lignée cellulaire. Elles varient de 0,5 à $100 \mu\text{g/mL}$. La figure 33 ci-dessous présente la répartition des cellules de la lignée MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire après 48h de traitement par les fractions L₄ et L₅.

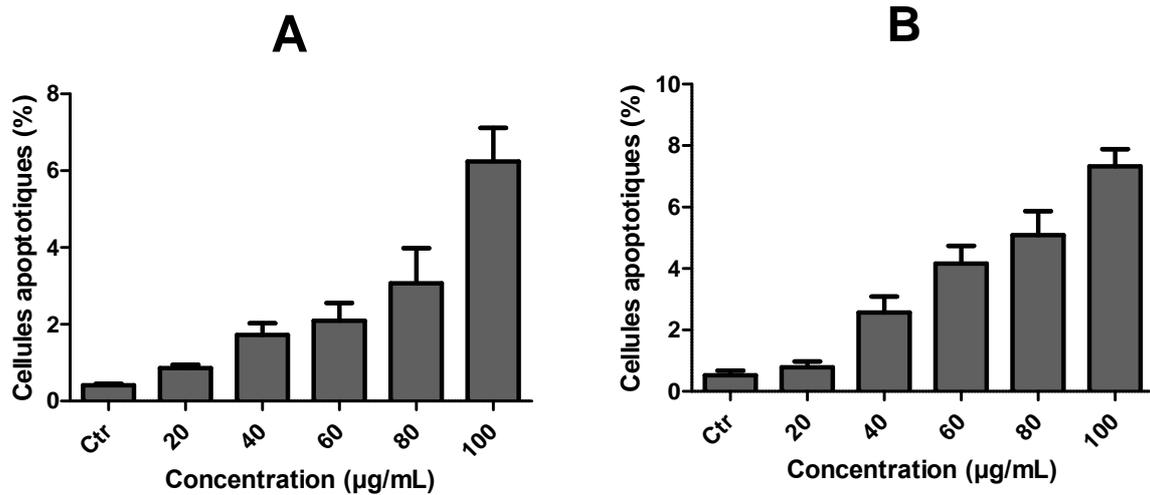


Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A: Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60)

Figure 33 : Effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée du cancer du sein (MCF7).

L'analyse de cette figure montre que le traitement des cellules MCF7 par la fraction L₄ (33A) entraîne une augmentation du nombre de cellules en phase S à toutes les concentrations testées exceptée à 100µg/mL comparativement au contrôle (12,07 \pm 0,15%) avec un maximum (24,92 \pm 0,71%) à 20µg/mL. Parallèlement on note une augmentation de la sous-population des cellules en phase G₀/G₁ avec la concentration jusqu'à la concentration 80µg/mL au détriment des cellules en phase G₂/M. Par ailleurs, la fraction L₄ induit une mort cellulaire par apoptose (Figure 34A) dont le pourcentage maximal de cellules apoptotiques (6,24 \pm 0,03%) est atteint à 40µg/mL.

Quant à la fraction L₅ (figure 33B), elle induit des changements différents en fonction de la concentration. Néanmoins, l'effet majeur est un arrêt en phase G₂/M du cycle cellulaire à la concentration 20µg/mL avec un doublement de cette sous population par rapport aux cellules non traitées (43, 17 \pm 0,12% contre 19,54 \pm 0,27% pour le contrôle). Cette augmentation des cellules en phase G₂/M se fait au détriment de la population cellulaire en phase G₀/G₁ qui diminue significativement de 67,74 \pm 0,7% à 39,71 \pm 0,5%. On note une induction concomitante de l'apoptose concentration dépendante (figure 34B).



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A: Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 34 : Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules du cancer du sein (MCF7) par les fractions L4 et L5.

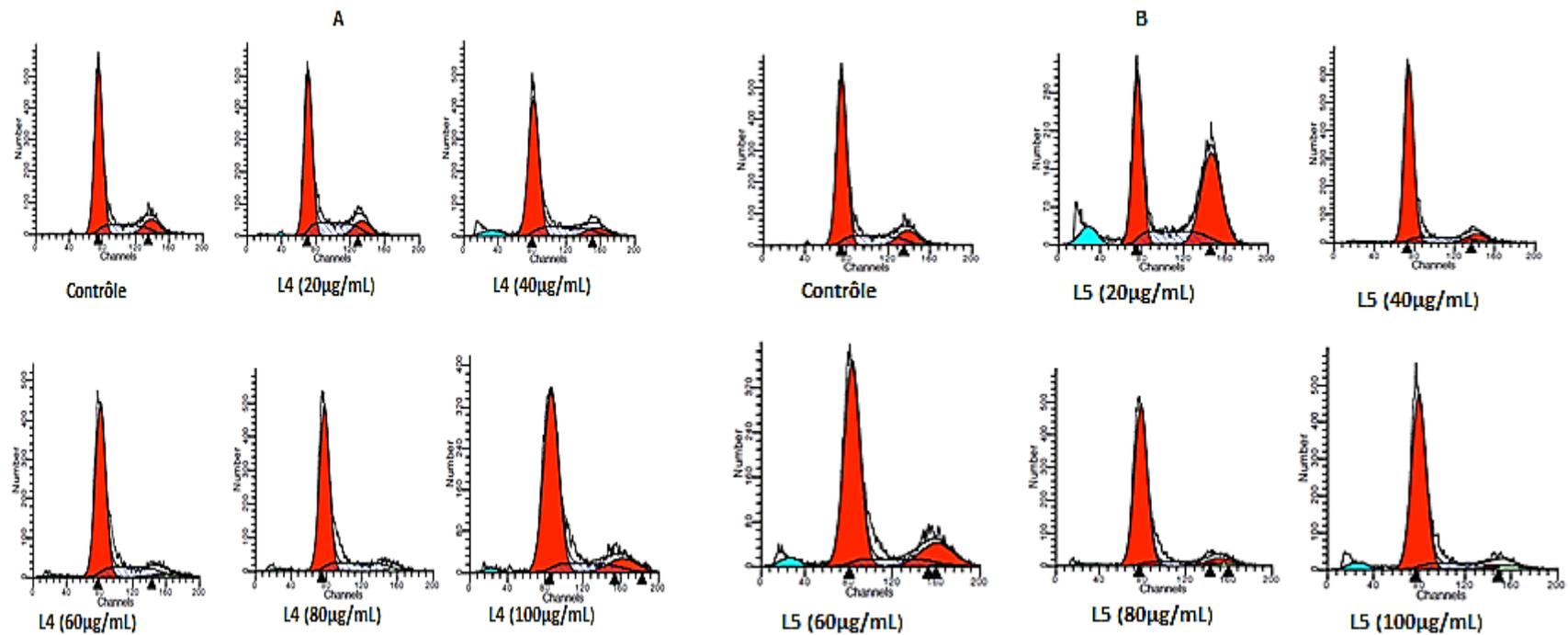


Figure 35 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du sein (MCF7) par les fractions L₄ et L₅ A : fraction L₄ ; B : fraction L₅

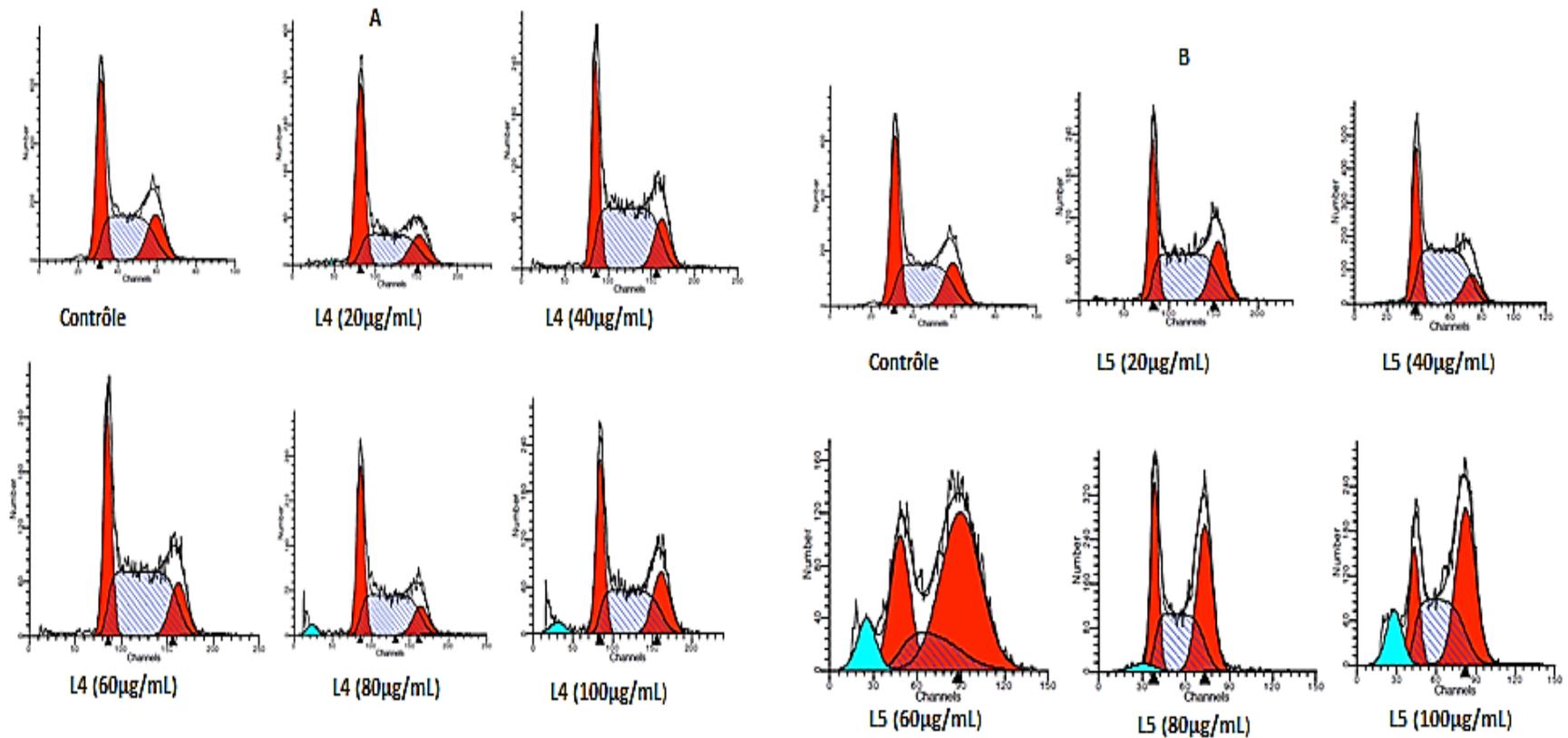
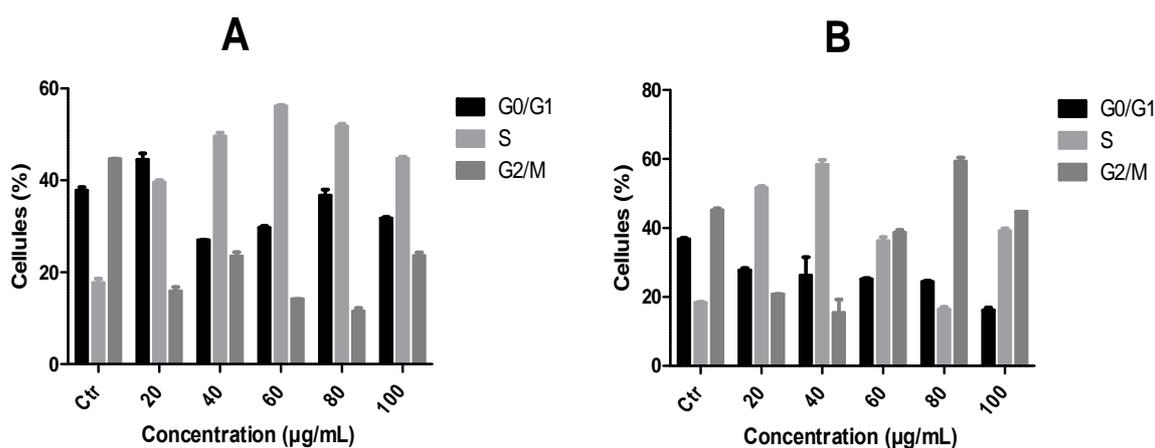


Figure 36 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du sein (MDA-MB 231) par les fractions L₄ et L₅ ;
A : fraction L₄ : Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; **B : fraction L₅** : Hexane/Acétate d'éthyle (40/60)

Les fractions L₄ et L₅ ont toutes deux induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S comparativement aux cellules non traitées de la lignée cellulaire MDA-MB231 mais à des concentrations différentes (Figure 37).

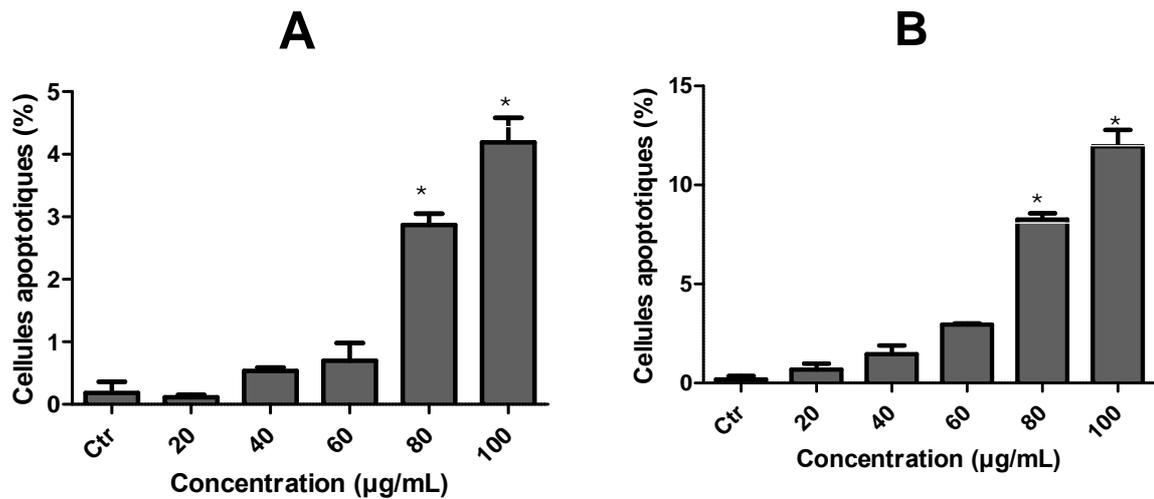
En effet, le pourcentage de cellules en phase S le plus élevé (56,10±0,33%) a été observé à la concentration 60µg/mL avec la fraction L₄ (figure 37A) tandis que pour la fraction L₅ (figure 37B), le maximum de cellules a été obtenu à 40µg/mL (58,37±1,42%) contre 18,27±0,29% pour les cellules non traitées.



Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 37 : Effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire des cellules du cancer du sein (MDA-MB231).

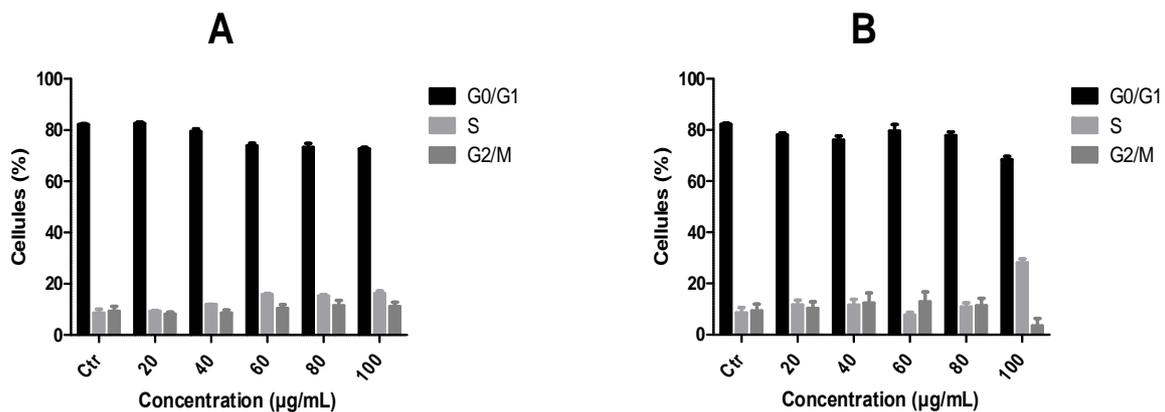
La figure 38 ci-dessous présente les pourcentages de cellules apoptotiques après traitement des cellules de la lignée du cancer du sein MDA-MB231 par les fractions L₄ et L₅. Il ressort de l'analyse de cette figure que les deux fractions ont induit la mort cellulaire par apoptose au sein des cellules MDA-MB231. Toutefois, il convient de noter que le pourcentage de cellules apoptotiques augmente avec la concentration (figures 38A et 38B).



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

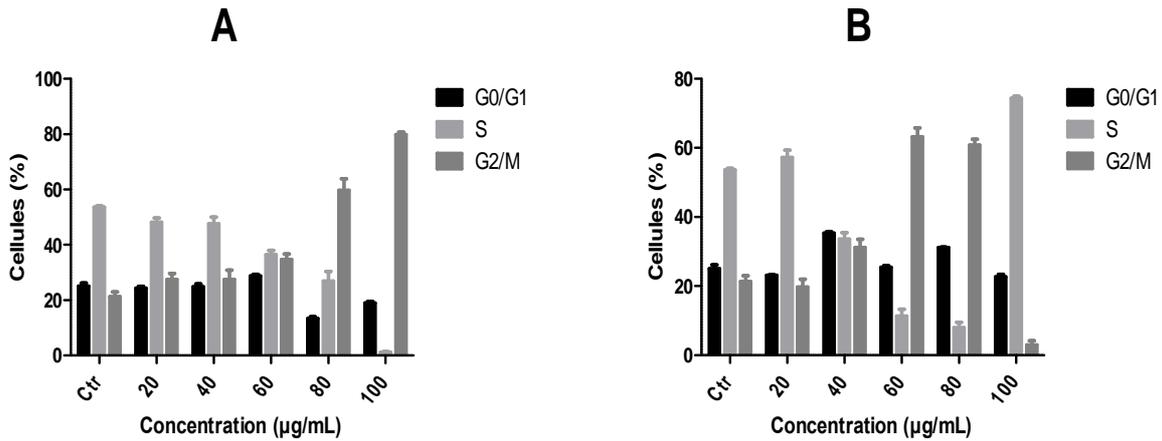
Figure 38 : Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules de la lignée du cancer du sein (MDA-MB231) par les fractions L4 et L5.

Les figures 39 et 40 ci-dessous présentent les effets du traitement par les fractions L4 et L5 sur le cycle cellulaire des cellules du cancer du col de l'utérus SiHa et HeLa.



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 39 : Effets des fractions L4 et L5 sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée du cancer du col de l'utérus (SiHa)

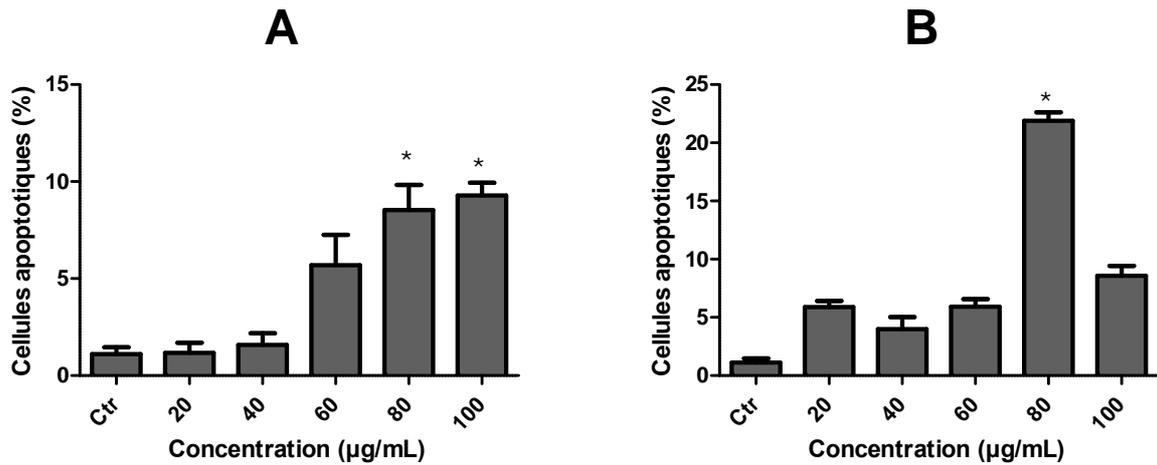


Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 40: Effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire des cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa).

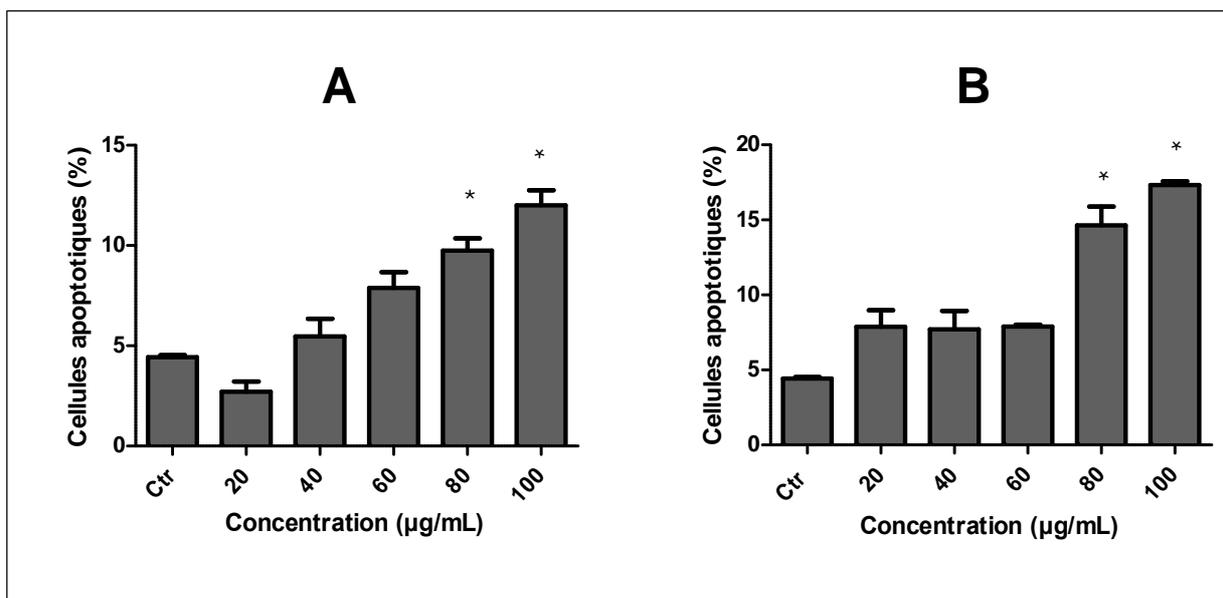
L'analyse de ces figures montre que les deux fractions ont induit un arrêt en phase S et G₂/M du cycle cellulaire sur les cellules des lignées SiHa et HeLa respectivement. En effet, s'agissant de la lignée HeLa, on note une augmentation de la population cellulaire en phase G₂/M qui passe de $19,69 \pm 0,21\%$ pour les cellules non traitées à $79,07 \pm 2,59\%$ et $60,75 \pm 1,46\%$ après traitement par les fractions L₄ et L₅ respectivement. Néanmoins, il est à noter qu'à la concentration 100 µg / mL pour la fraction L₅ (figure 40B), il y a une augmentation marquée de la population des cellules en phase S concomitamment à une baisse du nombre de cellules en phase G₂/M avec les pourcentages respectifs de $74,95 \pm 0,47\%$ et $1,68 \pm 0,04\%$. En revanche, les mêmes fractions ont plutôt induit une accumulation de cellules en phase S sur les cellules SiHa avec respectivement $17,2 \pm 0,98\%$ et $29,8 \pm 2,12\%$ pour les fractions L₄ et L₅, contre $10,01 \pm 2,19\%$ pour les cellules non traitées.

En plus des altérations observées dans les phases du cycle cellulaire après traitement avec les fractions L₄ et L₅, la présence d'un pic sub-G₁ caractéristique des cellules apoptotiques a également été notée. L'analyse a révélé l'induction de l'apoptose de manière dose-dépendante (figures 41 et 42). Cependant, il convient de relever que le pourcentage le plus élevé (%) de cellules apoptotiques a été observé plutôt à $80 \mu\text{g} / \text{ml}$ avec L₅ sur des cellules SiHa (figure 41B).



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60). Les valeurs affectées d'une asterisque sont significativement différentes

Figure 41: Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa) par les fractions L₄ et L₅



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 42: Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa) par les fractions L₄ et L₅.

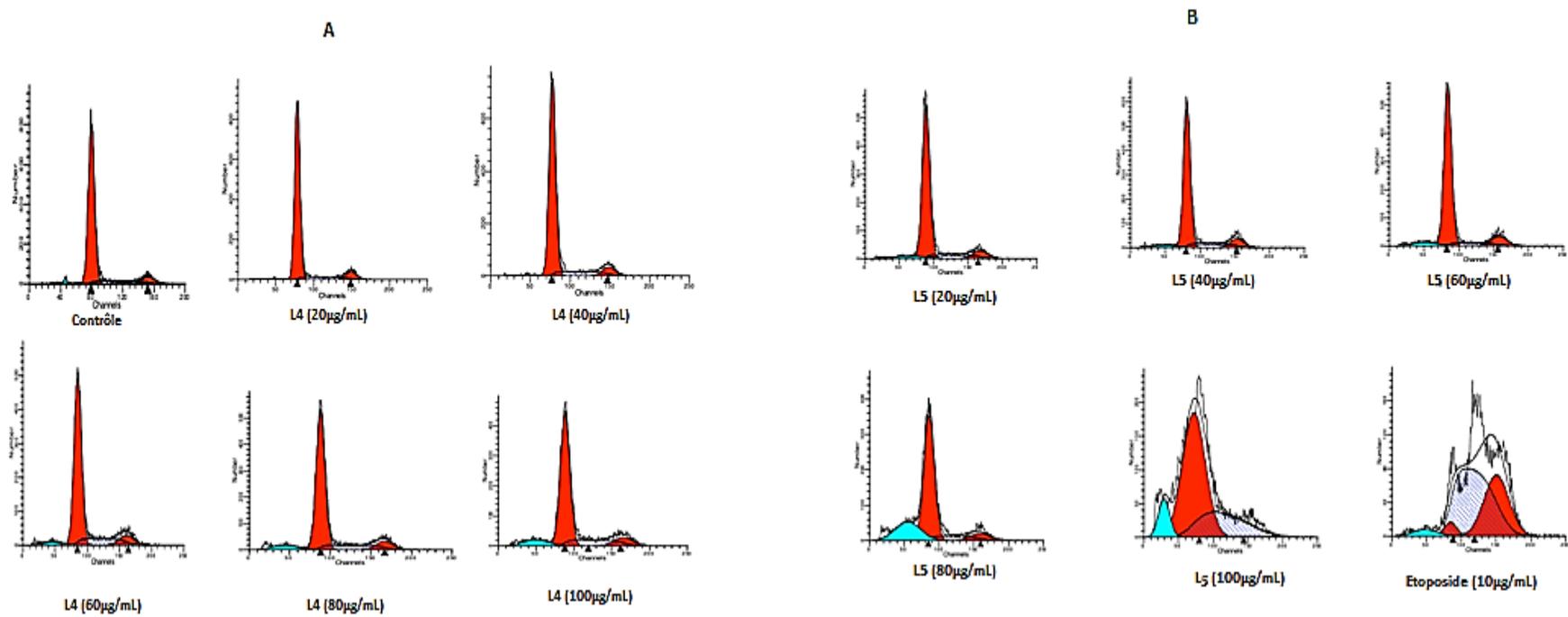


Figure 43 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (SiHa) par les fractions L₄ et L₅ ; **A** : fraction L₄ : Hexane/Acétate d'éthyle (60/40 ; **B** : fraction L₅ Hexane/Acétate d'éthyle (40/60

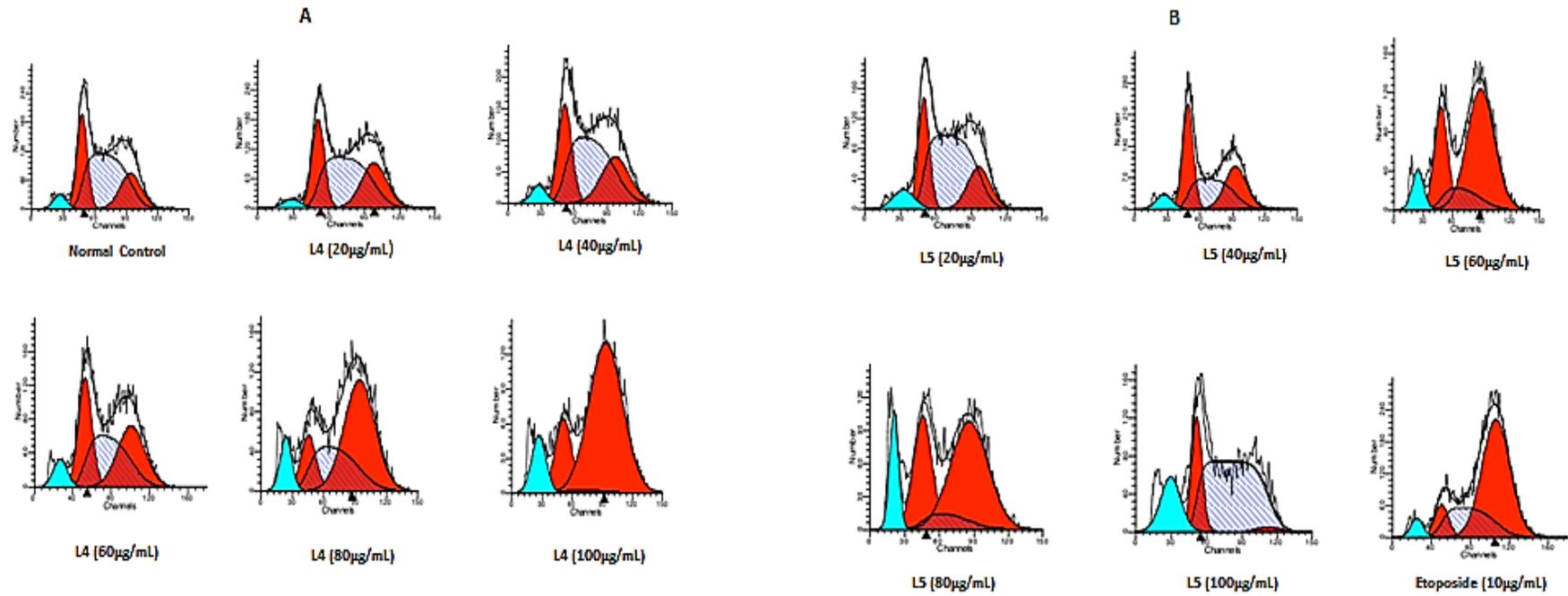


Figure 44 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules du cancer du col de l'utérus (HeLa) par les fractions L4 et L5 ; A : fraction L4 : Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : fraction L5 : Hexane/Acétate d'éthyle (40/60)

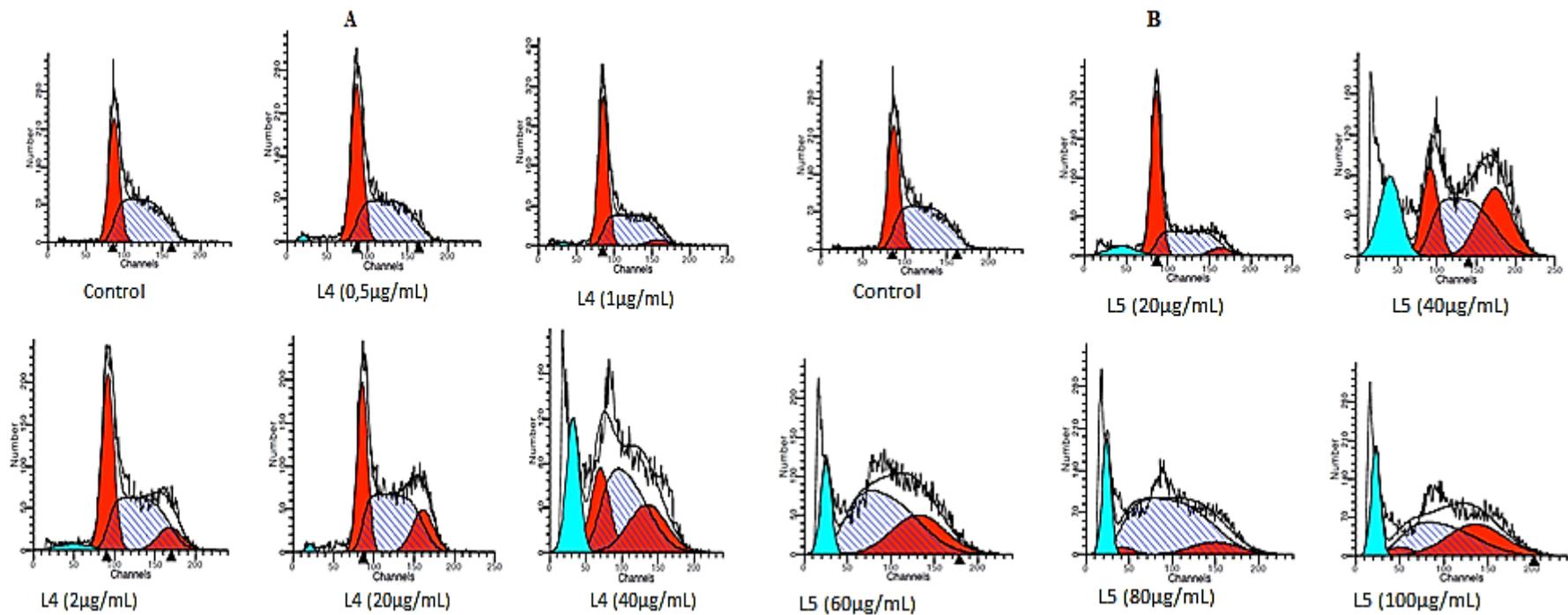
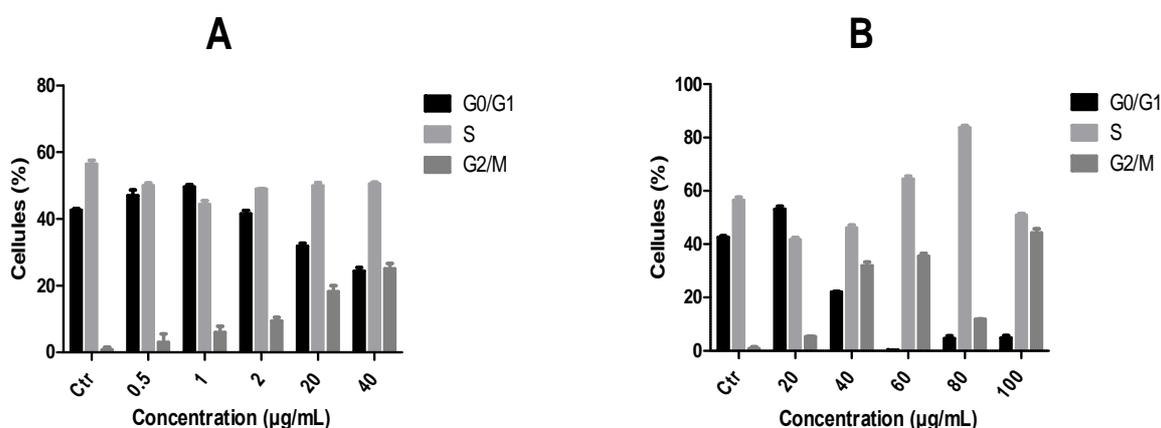


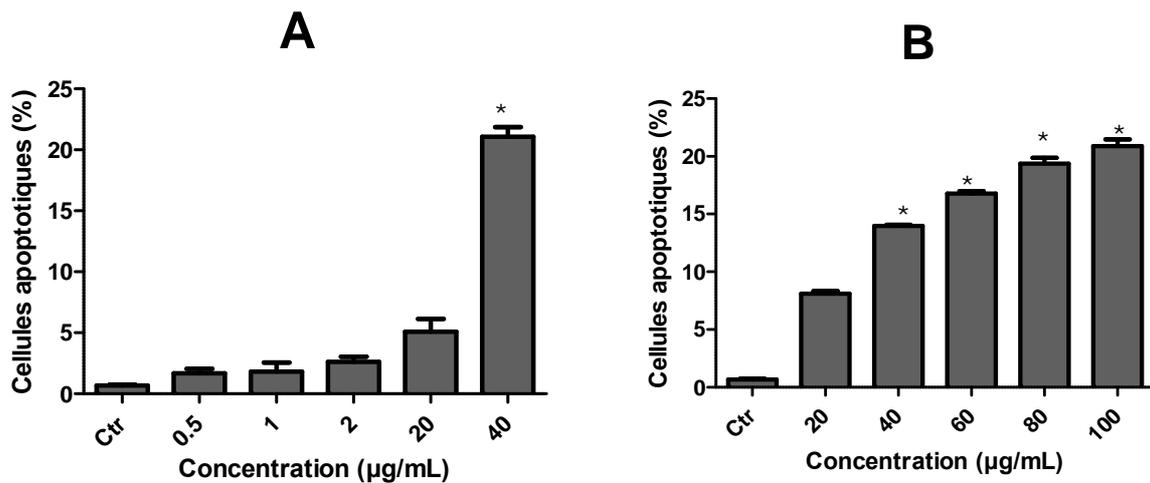
Figure 45 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules de leucémie myéloïde chronique K562 par les fractions L₄ et L₅
A : fraction L₄ : Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : fraction L₅ : Hexane/Acétate d'éthyle (40/60)

Quant à la lignée leucémique myéloïde chronique K562, des modifications ont été observées dans la quasi-totalité des phases du cycle cellulaire de ces cellules traitées avec la fraction L₄ comparativement aux cellules non traitées (figure 45A). Toutefois, l'analyse des histogrammes (figure 46A) révèle que l'effet majeur est une augmentation du nombre de cellules en phase G₂/M en fonction de la concentration dont le maximum est atteint à la concentration 40 µg/mL. En effet, à cette concentration, on note une augmentation exponentielle de la population cellulaire en phase G₂/M correspondant à un arrêt de la division cellulaire à cette phase. Cet arrêt est associé à une diminution concomitante du pourcentage de cellules en phase G₀/G₁ qui évolue en sens inverse du pourcentage de cellules en phase G₂/M. Outre cet arrêt de la division cellulaire, l'apparition d'un pic sub-G₁ dont l'amplitude augmente avec concentration attestant de la présence des cellules apoptotiques a été observée. Les mêmes effets ont été obtenus avec la fraction L₅ qui a induit à la fois un arrêt de la division cellulaire en phase G₂/M et l'apoptose.



Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 46: Effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée de leucémie myéloïde chronique (K562).



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 47 : Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules de leucémie myéloïde chronique (K562) par les fractions L₄ et L₅.

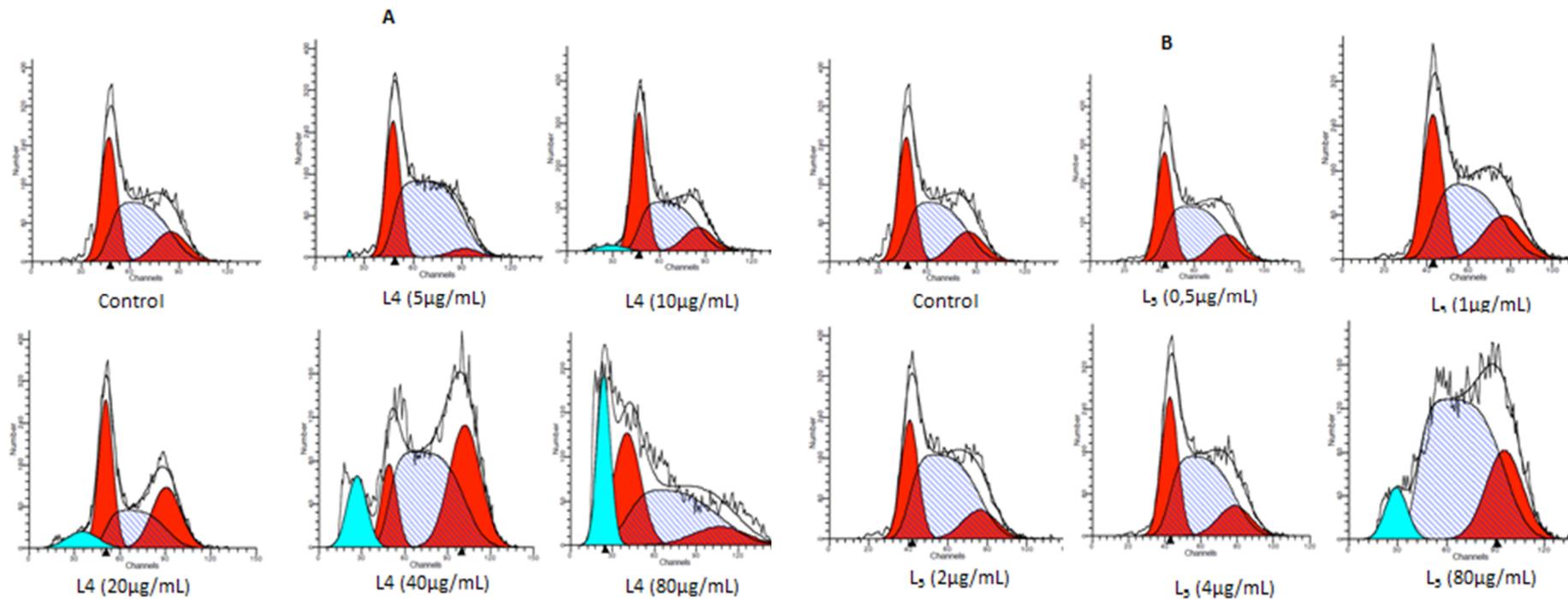
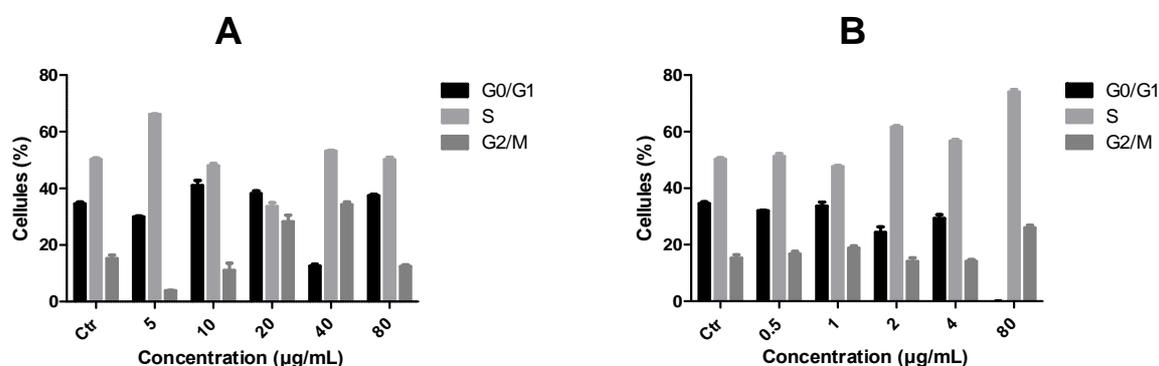


Figure 48 : Analyse du cycle cellulaire après traitement des cellules de la lignée leucémique myéloïde aigue (HL-60) par les fractions L₄ et L₅ ;
 A : fraction L₄ : Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : fraction L₅ : Hexane/Acétate d'éthyle (40/60)

Les figures (49A et 49B) présentent les effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée leucémique myéloïde aigue HL-60.

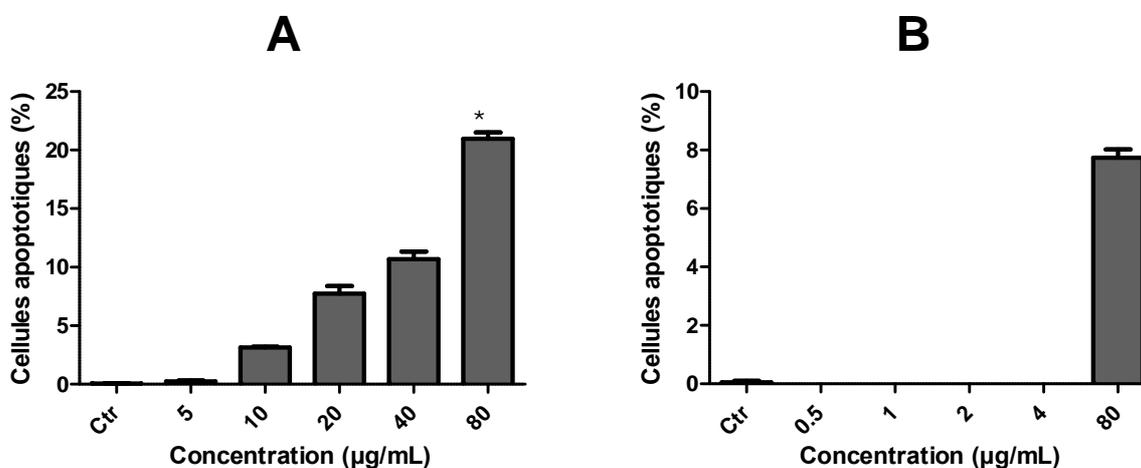


Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) ; B : Fraction Hexane/Acétate d'éthyle (40/60).

Figure 49 : Effets des fractions L₄ et L₅ sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée de leucémie myéloïde aigue (HL-60).

Le traitement des cellules de la lignée leucémique myéloïde aigue HL-60 par les fractions L₄ et L₅ a montré des effets différents en fonction de la concentration. Ainsi, après traitement par la fraction L₄ à la concentration 5 µg/mL, on note une augmentation du nombre de cellules en phase S (50,16 \pm 0,87% pour le contrôle et 66,12 \pm 0,22% pour la fraction L₄) au détriment de la sous population de cellules en phase G₂/M dont on note une diminution significative (15,26 \pm 1,26% et 3,89 \pm 0,06%) pour le contrôle et la fraction L₄ respectivement. A l'inverse, à la concentration 40 µg/mL, la même fraction entraîne plutôt un arrêt en phase G₂/M marqué par un doublement de la population cellulaire comparativement au contrôle (15,26 \pm 1,66% et 34,22 \pm 1,32% respectivement pour le contrôle et la fraction L₄). Parallèlement à l'arrêt du cycle cellulaire, le traitement par la fraction L₄ a entraîné une mort cellulaire par apoptose dont l'efficacité augmente avec la concentration tel que le montre la figure 50A. Quant à la fraction L₅ (figure 49B), l'effet remarquable est une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire. Cette accumulation est consécutive à une réduction exponentielle du nombre de cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire (34,57 \pm 0,79% pour le contrôle contre 0,06 \pm 0,03% pour la fraction L₅) qui est quasi inexistante après traitement par cette dernière à la concentration 80 µg/mL. Concernant la capacité de la fraction L₅ à induire la mort cellulaire par apoptose, parmi toutes les concentrations testées, seule la concentration 80 µg/mL a entraîné

un effet comparativement au contrôle ($0,05 \pm 0,0\%$ et $7,74 \pm 0,39\%$ respectivement) tel que le montre la figure 50B.



Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type (n=3). A : Fraction L₄ (Hexane/Acétate d'éthyle 60/40) ; B : Fraction L₅ (Hexane/Acétate d'éthyle 40/60).

Figure 50: Pourcentage de cellules apoptotiques après traitement des cellules de leucémie myéloïde aigue (HL-60) par les fractions L₄ et L₅.

Les résultats de la partie précédente ayant montré que l'apoptose est l'un des mécanismes responsables de l'effet cytotoxique des fractions L₄ et L₅, nous avons entrepris dans la suite de ce travail, d'évaluer le profil d'expression des protéines pro-apoptique Bax et anti-apoptotique Bcl-2 après traitement par ces fractions. En effet, les protéines de la famille Bcl-2 dont Bax et Bcl-2 sont impliquées dans la régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale qui est l'un des phénomènes clés pour l'activation de la voie apoptotique intrinsèque. Ainsi, cette partie nous a permis de connaître laquelle des voies apoptotiques (intrinsèque ou extrinsèque) est modulée après le traitement par les fractions L₄ et L₅.

III.3.2. Effets du traitement des cellules leucémiques myéloïde chronique et aigue (K562) et (HL-60) par les fractions L₄ et L₅ sur le niveau d'expression des protéines pro apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2

Pour ce volet du travail, seules les lignées leucémiques (K562 et HL-60) ont été choisies. Par ailleurs, les concentrations utilisées pour traiter les cellules sont celles ayant induit le plus grand pourcentage de cellules apoptotiques après étude du cycle cellulaire. Ainsi, les cellules de la lignée K562 ont été traitées avec les fractions L₄ et L₅ à la concentration 40µg/mL tandis

que les cellules HL-60 ont été traitées à la concentration 80µg/mL. La quantification des protéines totales dans chaque lysat cellulaire préalablement à l'analyse par western blot a été réalisée par la méthode de Bradford. Les tableaux 31 et 32 ci-dessous présentent les teneurs en protéines totales des cellules K562 et HL-60 respectivement.

Tableau XXI: Teneur en protéines totales des lysats des cellules de la lignée leucémique myéloïde chronique (K562) et aigue (HL-60) après 6H, 12H et 24H de traitement par les fractions L₄ et L₅

Teneur en protéines (mg/mL)									
Lignée cellulaire	6H			12H			24H		
	Ctr	L ₄	L ₅	Ctr	L ₄	L ₅	Ctr	L ₄	L ₅
K562	4,8±0,21	3,9±0,11	4,2±0,09	4,4±0,03	4,3±0,19	4,3±0,02	4,85±0,08	3,1±0,07	3,7±0,06
HL-60	3,3±0,15	3,9±0,13	3,4 ±0,01	2,9±0,09	4,0±0,08	3,9±0,08	3,04±0,10	3,7±0,03	3,4±0,06

D'une manière générale, pour la lignée K562, la teneur en protéines totales a diminué dans les lysats de cellules traitées par les fractions L₄ et L₅ comparativement aux lysats des cellules non traitées quel que soit le temps d'incubation (tableau 21). A l'inverse, pour la lignée HL-60, la teneur en protéines totales a plutôt augmenté dans les lysats des cellules traitées par L₄ et L₅ quel que soit le temps d'incubation (tableau 22)

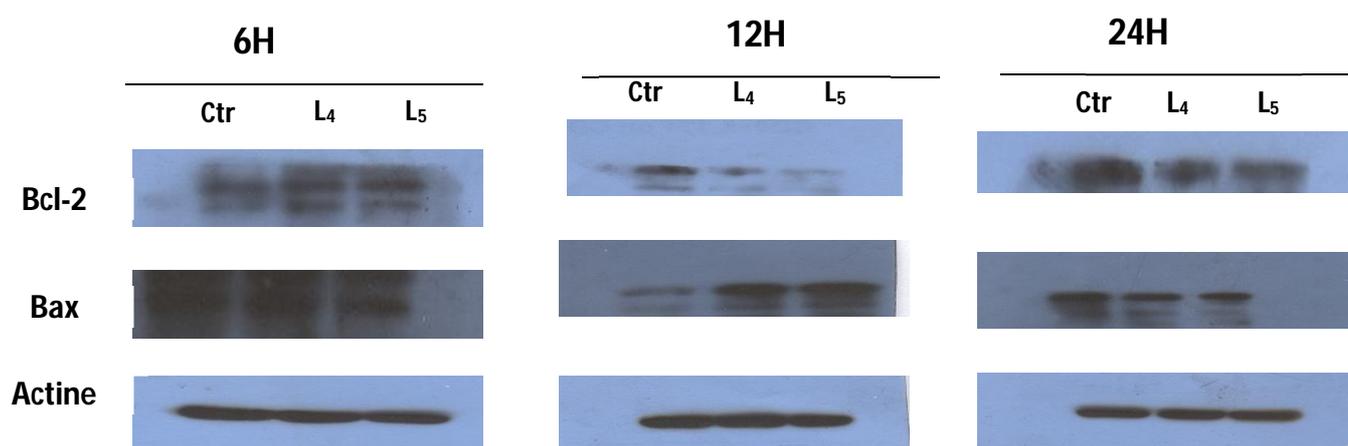


Figure 51 : Bandes protéiques obtenues après révélation des membranes de western blot des cellules de la lignée leucémique myéloïde chronique (K562)

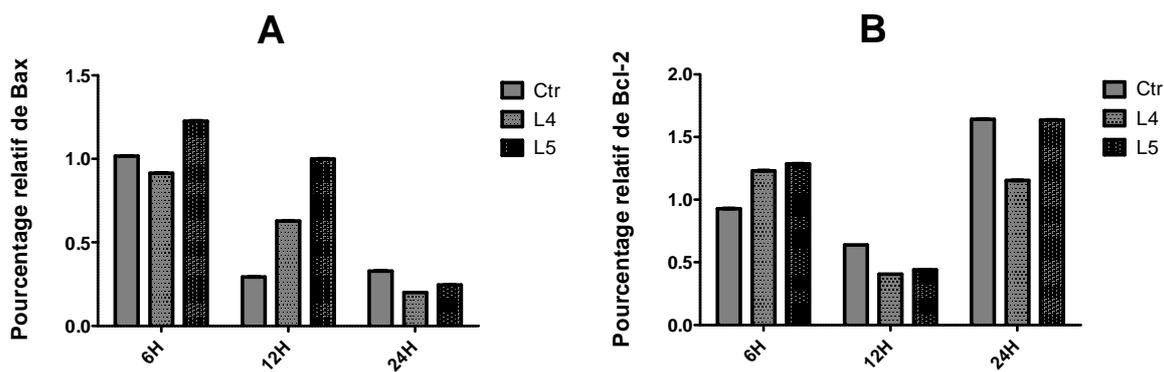


Figure 52 : Profil d'expression des protéines pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2 après traitement des cellules de Leucémie myéloïde chronique (K562) par les fractions L₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) et L₅ : Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) ; A : Bax ; B : Bcl-2.

La figure 51 ci-dessus présente les bandes des protéines pro-apoptotique Bax, anti-apoptotique Bcl-2 et d'actine (contrôle interne ou positif) obtenues après révélation des membranes de western blot sur des films à rayons x pour la lignée leucémique myéloïde chronique (K562). L'observation de cette dernière révèle après 6h de traitement, une bande plus intense pour la protéine Bax au niveau du puits de la fraction L₅ tandis que celle du puits de la fraction L₄ apparaît moins intense que celle du puits contrôle. Pour le même temps de traitement pour la protéine Bcl-2, on note une augmentation de l'intensité des bandes aussi bien pour le puits de la fraction L₄ que L₅. A l'inverse après 12h de traitement, on note une évolution en sens inverse de l'intensité des bandes des protéines Bax et Bcl-2 pour les fractions L₄ et L₅ comparativement au contrôle tandis qu'après 24H de temps, l'intensité des bandes diminue aussi bien pour la protéine Bax que Bcl-2 par rapport au contrôle.

Les figures 52A et 52B ci-dessus présentent respectivement le profil d'expression des protéines Bax et Bcl-2 après 6h, 12h et 24h de traitement des cellules K562 par les fractions L₄ et L₅. Ces histogrammes ont été obtenus en rapportant les valeurs de la densité totale de la surface de chaque bande des protéines Bax et Bcl-2 sur la densité de la surface de la bande de l'actine mesurée par densitométrie à l'aide du logiciel UVP du système d'imagerie Gel Doc system. L'effet majeur qui ressort de l'analyse de cette figure est une augmentation du niveau d'expression de Bax concomitamment à une baisse du niveau d'expression de Bcl-2 après 12h de traitement.

Quant à la lignée leucémique myéloïde aigue HL-60, le traitement pendant 24h par les fractions L₄ et L₅ a entraîné une augmentation des niveaux d'expression de Bax et de Bcl-2 tel que le montrent les figures 53A et 53B. Toutefois, il convient de souligner que l'effet sur le

niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bax a été plus important chez les cellules traitées par la fraction L₄ que celles traitées par la fraction L₅.

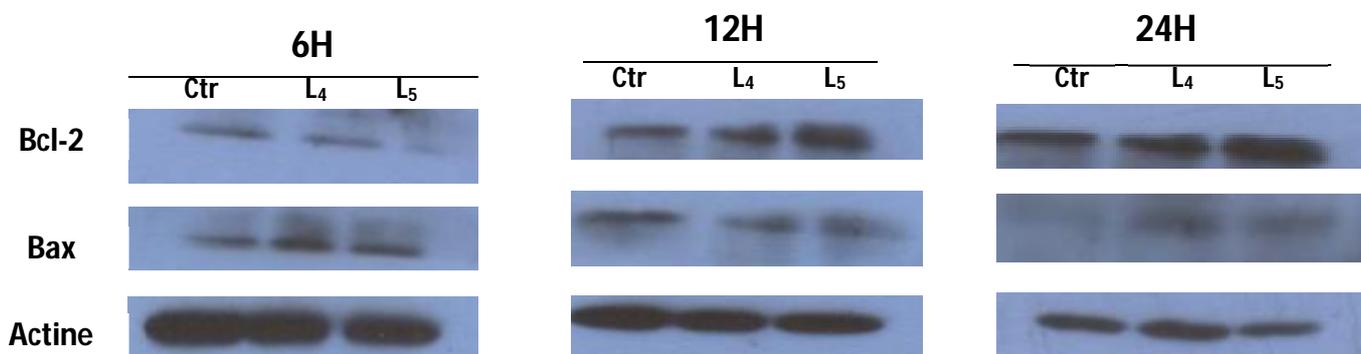


Figure 53 : Bandes protéiques obtenues après révélation des membranes de western blot des cellules de leucémie myéloïde aigue (HL-60)

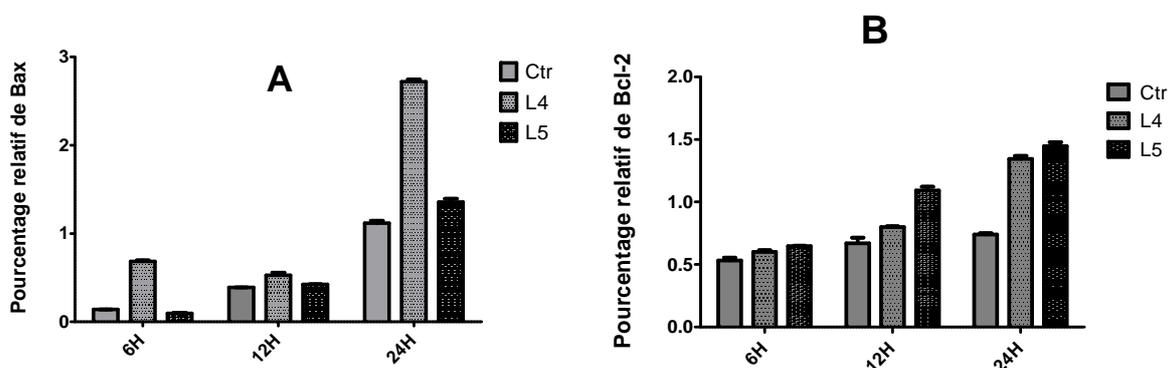


Figure 54 : Profil d'expression des protéines pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2 après traitement des cellules de Leucémie myéloïde aigue (HL-60) par les fractions L₄: Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) et L₅ Hexane/Acétate d'éthyle (40/60)

A : Bax ; B : Bcl-2.

par Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (CPG/SM)

L'activité biologique des extraits de plantes étant étroitement liée à la nature de leurs métabolites secondaires constitutifs, les fractions L₄ et L₅ ont fait l'objet d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en vue de déterminer les constituants responsables de leurs effets antiprolifératif et cytotoxique. L'annexe V présente les chromatogrammes obtenus après analyse. Le chromatogramme de la fraction L₄ présente 146 pics tandis que celui de la fraction L₅ en présente 126. Les composés majoritaires obtenus après comparaison avec les composés disponibles dans la base NIST sont consignés dans les tableaux 23 et 24. Le méthyl hydrogène disulfure, retrouvé à 54,58% est le composé majoritaire

de la fraction L₄. Les autres composés présents appartiennent à la classe des terpènes, acides gras, hydrocarbures et stérols.

Quant à la fraction L₅, le composé majoritaire est le Dimethylsulfoxoniumformylmethylide (20,27%). Les autres composés retrouvés dans cette fraction sont des hydrocarbures soufrés, oxygénés et azotés,

Tableau XXII: Composés majoritaires retrouvés dans la fraction L₄ : Hexane/acétate d'éthyle (60:40 (v:v) après analyse par CG/SM

Temps de Retention	Nom commun	Aire (%)	Nom systematique
0,996	-	54,58	Methyl hydrogen disulfide
1,099	-	0,45	Methacrolein
1,169	-	5,46	Ethyl Acetate
1,317	-	0,01	Cyclohexane
17,963	-	0,40	Copaene
19,127	α -Bourbonene	0,07	1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,4,7,8,8a-hexahydro-3,6,8,8
19,373	Spathulenol	0,04	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-
19,692	β -cubebene	0,02	1HCyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-,
20,416	acoradiene	0,03	Spiro[4,5]dec-7-ene, 1,8-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-
21,459	Curcumene,	9,04	Benzene, 1-(1, 5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-
22,115	α -bergamotene	0,40	Bicyclo[3,1,1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3
22,406	-	0,89	Ledol
22,713	-	0,69	Cedrene
26,263	-	0,16	tau,muurolol:
26,795	Trans-nuciférol	1,50	6-(p-Tolyl)-2-methyl-2-heptenol
31,792		1,76	,alpha,-Bisabolol
32,337	Phytol	1,49	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol

Tableau XXIII : Composés majoritaires retrouvés dans la fraction L5 Hexane/acétate d'éthyle (40:60 (v:v) après analyse par CG/SM

Temps de Retention	Aire (%)	Nom systématique
3,097	20,27	Dimethylsulfoxoniumformylmethylide
3,170	9,7	Hepta-4,6-diyn-2-ol
3,201	9,31	Sulfurdioxide
3,292	10,56	Tetrafluoroformamidine
3,398	3,87	Aminomethanesulfonicacid
3,457	2,40	Disulfide, dimethyl
3,630	4,42	Ethene, 1,1-difluoro-
3,675	6,98	Ethene, 1,2-difluoro-
3,722	4,78	Methanesulfonylazide
3,767	1,05	Methanesulfonic anhydride
3,795	2,99	(N-(-2-Acetamido))-2-aminoethanesulfonic acid
3,892	4,02	Dimethyl sulfone
3,972	2,15	Tetrazolo[1,5-b]pyridazine, 6-chloro-
3,990	1,08	2-Propanol, 1,3-dichloro-
4,205	1,34	2-Aminoethyl hydrogen sulfate
4,280	3,89	3-Thiatricyclo[3,1,1,0(2,4)]heptane 3-oxide
4,372	2,51	Sulfurous acid, dimethyl ester
4,421	1,94	Methanesulfonylchloride
4,450	1,40	Thiophosphordiamide, S-methyl ester

V. Etude de l'activité anticancéreuse *in vivo* des fractions L₄, L₅ et de l'extrait brut aqueux d'écorces sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue

V.1. Détermination de la dose maximale tolérée

Après les études *in vitro* sur les lignées de cellules cancéreuses, la prochaine étape dans le développement des médicaments anticancéreux est la détermination de la dose maximale tolérée (DMT) qui servira à l'étude sur les modèles animaux (essais précliniques) préalablement aux essais cliniques. Les tableaux 25-33 ci-dessous présentent les variations de poids des souris obtenues lors de l'évaluation de la dose maximale tolérée des fractions L₄, L₅ et de l'extrait aqueux d'écorces utilisant les souris de souche NOD-SCID.

Tableau XXIV : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) à la dose 300mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	20,8	21,0	20,5	21,2	20,3	-2,4
2	19,4	20,3	19,87	19,5	19,0	-2,06
3	19,4	19,9	19,8	20,2	20,0	3,09
4	21,0	21,3	21,3	21,2	21,6	2,86
5	21,4	21,8	22,1	21,8	20,1	-6,07
6	20,0	20,5	20,7	20,4	21,4	7,0

Tableau XXV : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L₅ (Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) à la dose 300mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	22,7	23,0	22,5	22,7	22,3	-1,76
2	21,2	21,5	21,3	21,8	21,3	0,47
3	20,3	20,4	20,4	21,0	20,1	-0,99
4	23,0	23,4	23,0	23,6	23,1	0,43
5	20,0	20,4	20,0	20,5	20,8	4,0
6	19,9	20,2	20,0	20,8	20,0	0,50

Tableau XXVI : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 300mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	20,2	20,7	21,0	21,1	20,7	2,48
2	20,9	21,5	22,5	22,1	21,3	1,91
3	18,5	18,8	18,7	18,5	18,3	-1,08
4	21,2	21,3	21,5	21,9	21,8	2,83
5	20,0	20,2	20,6	21,1	20,5	2,50
6	21,0	21,3	21,4	21,6	20,9	-0,48

Tableau XXVII : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L4 Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) à la dose 600mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	18.2	17.7	18.4	18.6	18.7	2.75
2	22.3	22.2	22.6	22.2	22.4	0.45
3	20.5	21.0	21.7	21.5	21.7	5.85
4	19.8	20.2	20.8	19.8	20.0	1.01
5	20.8	20.5	20.9	20.3	20.5	-1.44
6	20.7	21.2	21.3	20.8	21.0	1.45

Tableau XXVIII: Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L5 Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) à la dose 600mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	19,9	21,2	21,1	21,3	21,4	7,54
2	20,6	20,5	20,5	20,4	20,5	-0,49
3	20,0	20,0	20,2	20,5	20,6	3,0
4	21,4	21,5	21,0	21,3	21,5	0,47
5	20,8	19,9	20,2	20,4	20,6	-0,96
6	19,5	19,5	20,4	19,8	20,0	2,56

Tableau XXIX: Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 600mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	19,9	19,5	19,3	19,4	19,5	-2,01
2	20,5	21,0	20,2	19,8	19,9	-2,93
3	21,8	22,0	21,3	21,4	21,5	-1,38
4	22,5	22,1	22,0	22,0	22,2	-1,33
5	21,2	20,7	21,5	22,1	22,3	5,19
6	21,4	20,9	20,8	20,9	21,0	-1,87

Tableau XXX : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L4 Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) à la dose 900mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	22,9	22,8	22,7	22,6	22,9	0,0
2	25,2	23,7	23,7	24,4	24,2	-3,97
3	21,9	21,8	21,7	22	22,3	1,83
4	22,5	22,2	22,0	21,9	22,0	-2,22
5	24,4	23,6	23,5	24	24,3	-0,41
6	23,3	22,6	22,7	22,9	22,9	-1,72

Tableau XXXI : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de la fraction L₅ Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) à la dose 900mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	21,0	21,2	20,0	20,0	19,8	-5,71
2	23,3	22,3	22,3	22,6	23,3	0,0
3	20,5	21,0	21,5	21,7	21,6	5,37
4	24,1	23,9	24,0	24,2	24,7	2,49
5	22,9	22	21,8	22,9	22,4	-2,18
6	21,5	21,8	21,1	21,3	21,7	0,93

Tableau XXXII : Variations de poids des souris NOD-SCID après administration de l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 900mg/kg de poids corporel

N° souris	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅	Gain de poids % (g)
1	23,2	22,9	23,9	23,8	24,3	4,74
2	21,4	20,8	20,5	20,8	21,6	0,93
3	22,9	21,4	21,6	21,2	22,9	0,0
4	20,5	20,0	19,8	20,5	20,9	1,95
5	22,2	21,5	21,6	21,5	21,5	-3,15
6	21,2	21,3	21,7	21,8	21,3	0,47

L'analyse de ces tableaux montre que tout au long de l'étude, il ya eu aussi bein des gains que des pertes de poids (valeurs négatives). Toutefois, aucune perte de poids $\geq 4g$ n'a été enregistrée. Le tableau 34 ci-dessous récapitule les différentes observations et les conclusions de la détermination de la dose maximale tolérée.

Tableau XXXIII : Synthèse des résultats de la détermination de la dose maximale tolérée pour les fractions L₄, L₅ et l'extrait brut aqueux d'écorces (B₂)

Fraction /extrait	Dose testée (mg/kg)	Taux de survie (%)	Perte de poids ≥4g	Appréciation	Future dose à tester
L ₄	300	100	-	Bien tolérée	600
L ₄	600	100	-	Bien tolérée	900
L ₄	900	100	-	Bien tolérée	200 mg/kg, 5fois/semaine pendant 4 semaines
L ₅	300	100	-	Bien tolérée	600
L ₅	600	100	-	Bien tolérée	900
L ₅	900	100	-	Bien tolérée	200mg/kg, 5fois/semaine pendant 4 semaines
B ₂	300	100	-	Bien tolérée	600
B ₂	600	100	-	Bien tolérée	900
B ₂	900	100	-	Bien tolérée	200mg/kg, 5fois/semaine pendant 4 semaines

L'analyse de ce tableau montre que l'administration en dose unique par voie orale des fractions L₄, L₅ et de l'extrait aqueux d'écorces aux doses de 300, 600 et 900mg/kg de poids corporel n' a entraîné aucun décès chez les souris de souche NOD/SCID d'où un taux de survie de 100% à toutes les doses testées. Par ailleurs, ces différentes doses n'ont entraîné aucune perte de poids ≥4 grammes. Selon les recommandations de l'INC, les fractions L₄, L₅ et l'extrait aqueux d'écorces sont considérées comme étant bien tolérées par les souris de souche NOD-SCID jusqu'à la dose 900mg/kg de poids corporel. Toutefois, il convient de souligner que les doses supérieures à 900mg/kg de poids corporel administrées en dose unique n'ont pas été testées à cause de l'insolubilité des extraits à ces doses.

La dose de 200mg/kg de poids corporel 5 fois par semaines a été considérée comme dose maximale tolérée et a servi comme dose maximale à administrer lors de l'étude *in vivo*.

V.2. Etude de l'activité anticancéreuse *in vivo* des fractions L₄, L₅ et de l'extrait brut aqueux d'écorces sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue

Dans cette partie, nous avons étudié la capacité des fractions L₄, L₅ et de l'extrait aqueux d'écorces à inhiber la progression tumorale sur les souris NOD-SCID préalablement

transplantées des cellules de la lignée leucémique myéloïde aigue KG-1. La figure 52 ci-dessous, présente l'évolution du volume de la tumeur dans chaque groupe en fonction du temps.

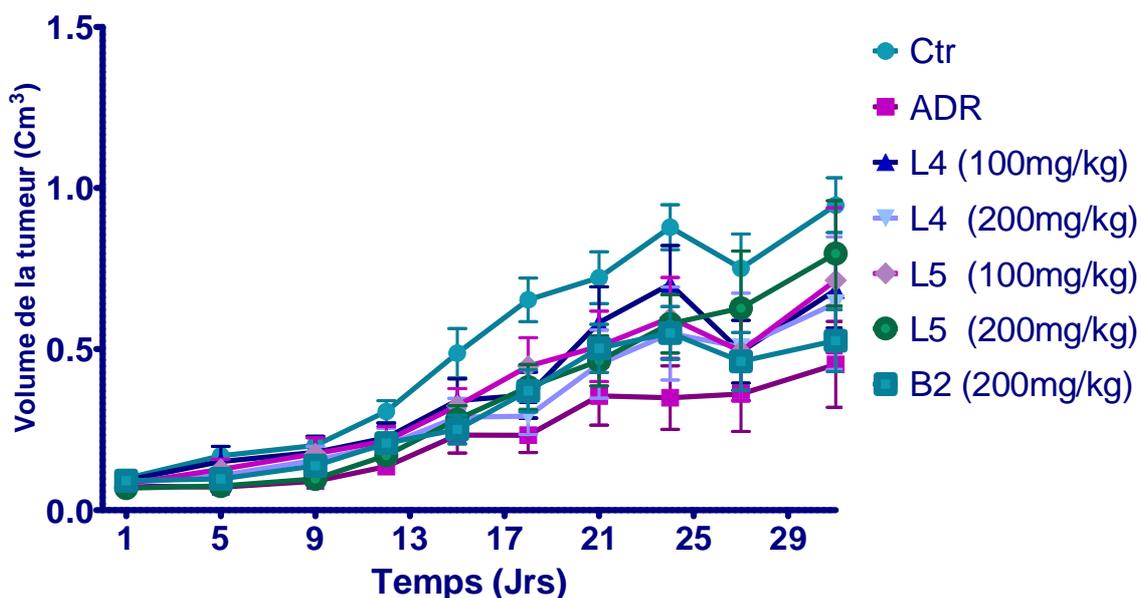


Figure 55 : Evolution du volume de la tumeur dans chaque groupe

L'analyse montre que les souris du groupe contrôle (non traitées) présentent le plus grand volume de tumeur comparativement aux autres groupes. A l'inverse, les souris du groupe traité à l'Adriamycine (contrôle positif) présentent le plus faible volume tumoral. En comparant les groupes traités à différentes doses d'extraits, il ressort que l'extrait brut aqueux d'écorces à la dose 200mg/kg de poids corporel a inhibé plus efficacement ($p < 0,05$) la progression tumorale que tous les autres extraits. Toutefois, il convient de noter que la fraction L₅ a démontré une plus grande efficacité à la dose de 100mg/kg comparativement à la dose 200mg/kg de poids corporel.

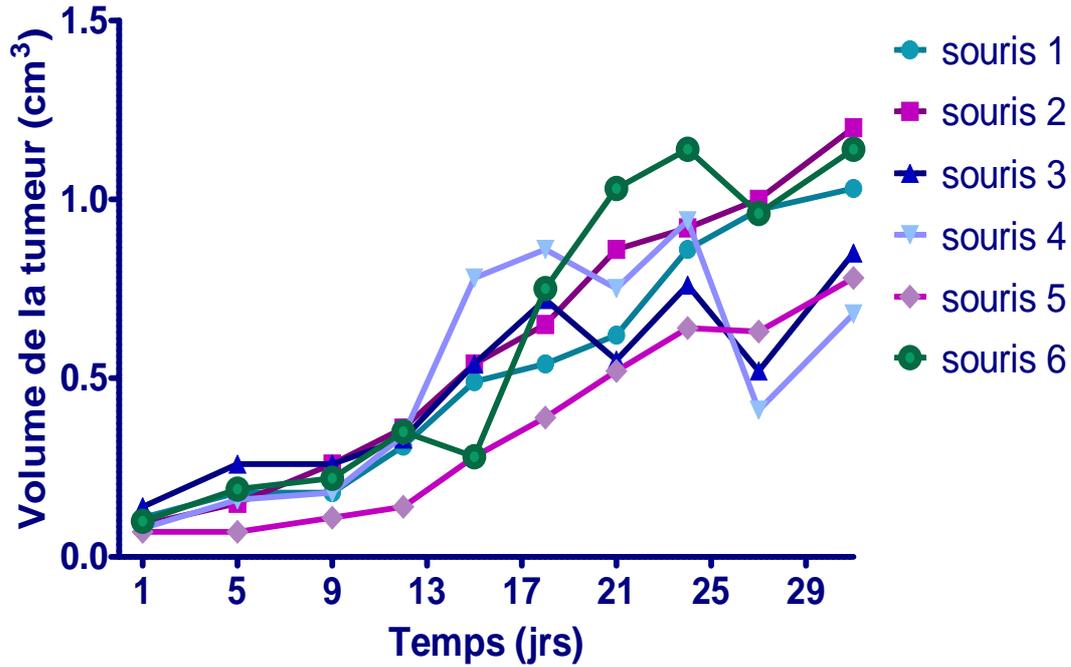


Figure 56 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps dans le groupe contrôle

La figure 56 ci-dessus présente volume tumoral des souris du groupe contrôle en fonction du temps. Il ressort de l'analyse de cette figure que la tumeur augmente quasiment chez toutes souris jusqu'au jour 24. Entre le jour 24 et le jour 27, on note une diminution du volume de la tumeur chez la moitié des souris qui augmente de nouveau entre le jour 27 et le jour 31.

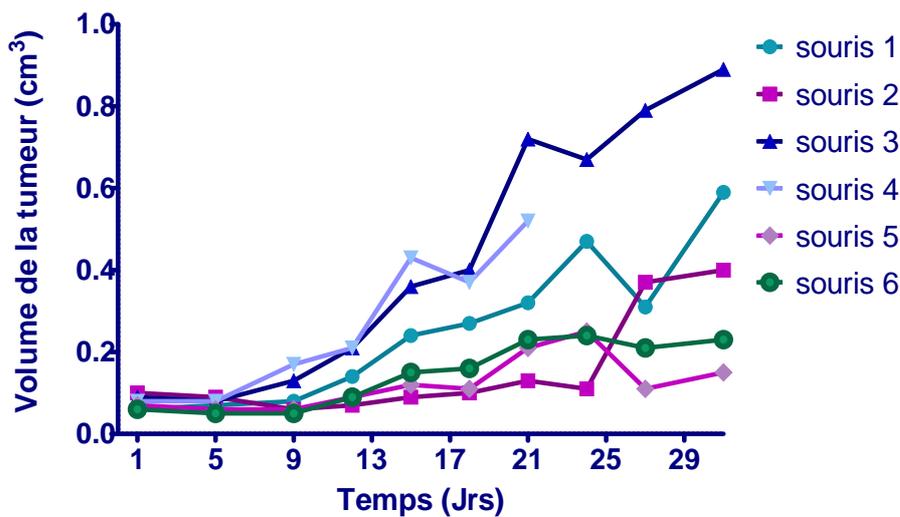


Figure 57: Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps dans le groupe traité à l'Adriamycine

Dans le groupe traité à l'Adriamycine (figure 57), les souris répondent presque uniformément au traitement jusqu'au jour 15 à partir duquel la souris 3 présente une augmentation significative du volume tumoral comparativement aux autres souris du même groupe.

Les figures 58 et 59 ci-dessous présentent les variations du volume tumoral en fonction du temps dans les groupes traités par les fractions L₄ et L₅ aux doses de 100 et 200mg/kg de poids corporel. Leur analyse montre que le traitement avec la fraction L₄ à la dose de 200mg/kg de poids corporel a significativement inhibé le développement de la tumeur chez la moitié des souris comparativement à la dose 100mg/kg (figure 58A et 58B). A l'inverse, les groupes ayant reçus la fraction L₅ aux doses 200mg/kg et 100mg/kg n'ont présenté aucune différence (figure 59A et 59B).

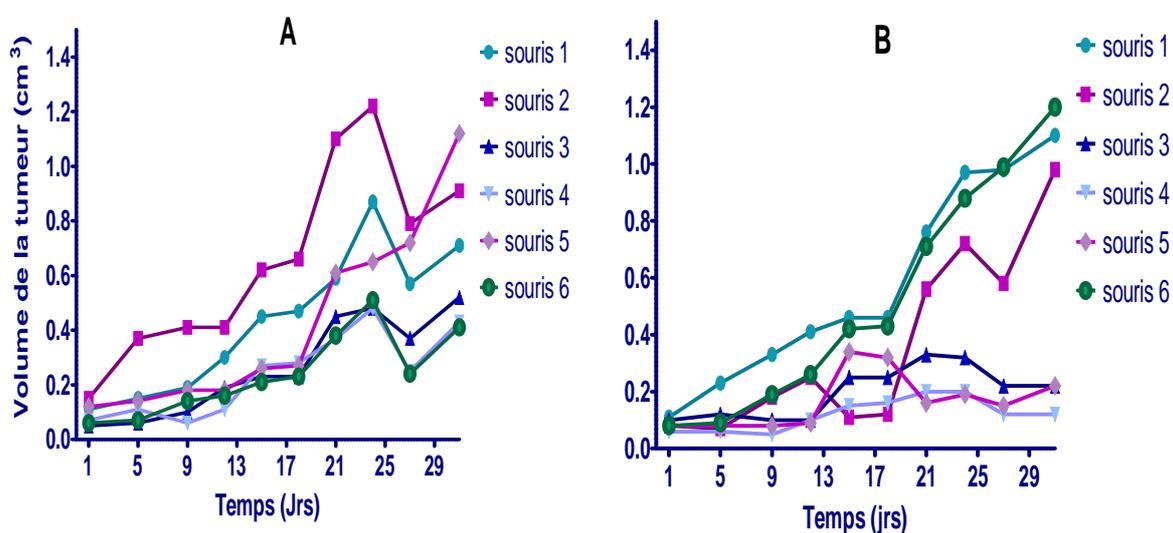


Figure 58 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps après traitement par la fraction L₄ Hexane/Acétate d'éthyle (60/40) A : 100mg/kg ; B : 200mg/kg.

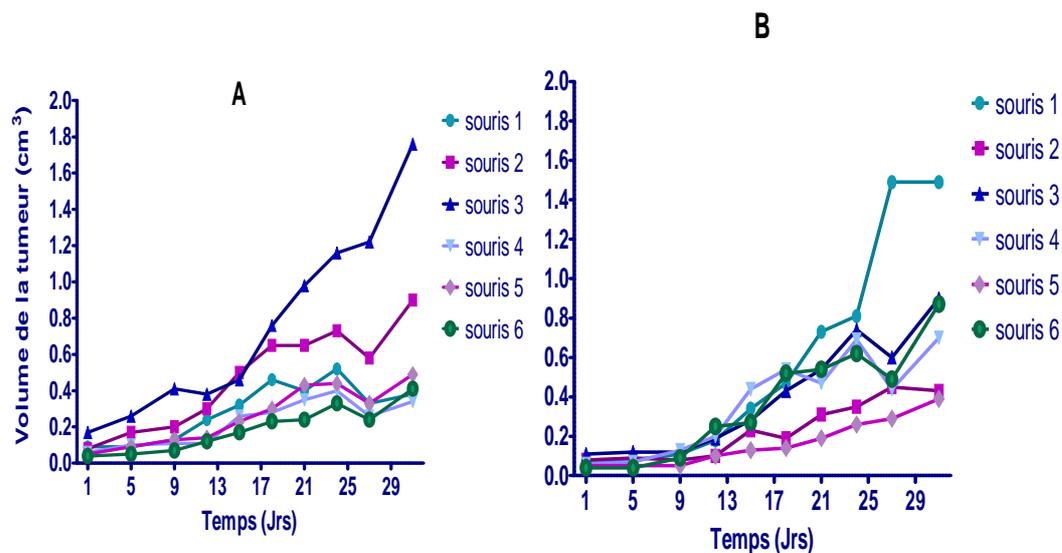


Figure 59 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps après traitement par la fraction L₅ Hexane/Acétate d'éthyle (40/60) . A : 100mg/kg ; B : 200mg/kg

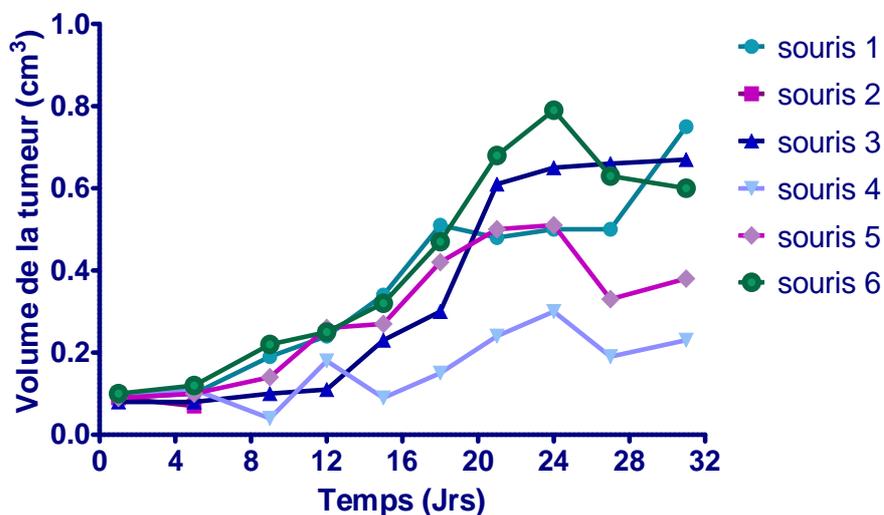


Figure 60 : Evolution du volume de la tumeur en fonction du temps dans le groupe traité à l'extrait aqueux d'écorces (B2) à la dose 200mg/kg de poids corporel

La figure 60 présente l'évolution de la tumeur en fonction du temps dans le groupe traité à l'extrait aqueux d'écorces à la dose 200mg/kg de poids corporel. L'analyse montre que deux

souris sur les six ont démontré une réduction significative ($p \leq 0,05$) de la tumeur comparativement aux autres souris au jour 31 de l'étude.

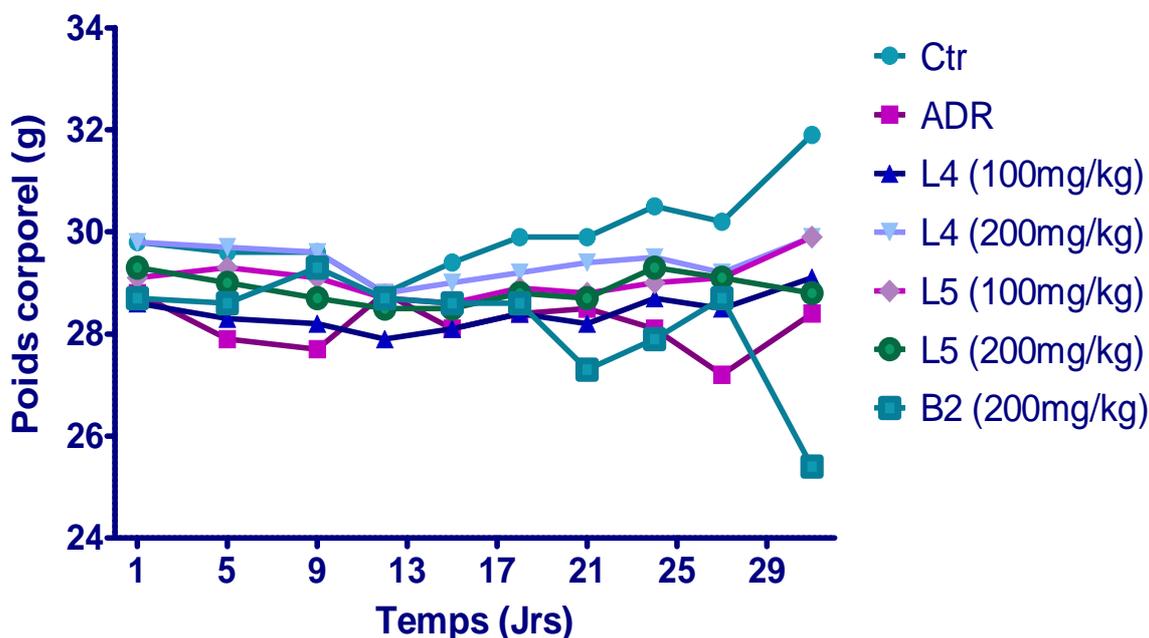


Figure 61 : Evolution du poids corporel en fonction du temps de traitement

La figure 61 ci-dessus présente l'évolution du poids corporel des souris dans chaque groupe. L'analyse montre que l'administration des différents traitements (extraits et Adriamycine) n'a pas modifié le poids corporel des animaux. Cependant, les animaux du groupe traité à l'Adriamycine et à l'extrait aqueux d'écorces ont présenté les plus faibles poids corporel tout au long de l'expérience avec des valeurs de $28,2 \pm 0,82g$ et $28,2 \pm 1,11g$ respectivement.

Le rapport Test/ Contrôle (T/C) est un indicateur de l'efficacité des molécules candidats au développement des médicaments anticancéreux. Ainsi, suivant les normes de L'INC, une valeur de $T/C \leq 42\%$ indique une efficacité du composé testé (Corbett *et al.*, 1999). La figure 62 ci-dessous présente les valeurs du rapport T/C dans chaque groupe en fonction du temps. L'analyse montre qu'aucun traitement n'a présenté une valeur $T/C \leq 42\%$ tout au long de la période de l'étude. Toutefois, parmi les extraits testés, la fraction L₄ à la dose 200mg/kg a présenté la meilleure efficacité au jour 18 de l'étude avec une valeur de T/C de 50% suivi de l'extrait aqueux d'écorces au jour 15 (55%). En outre, il convient de souligner que l'Adriamycine utilisé comme anticancéreux de référence a présenté la plus faible valeur de T/C (46%) au jour 18 de l'étude.

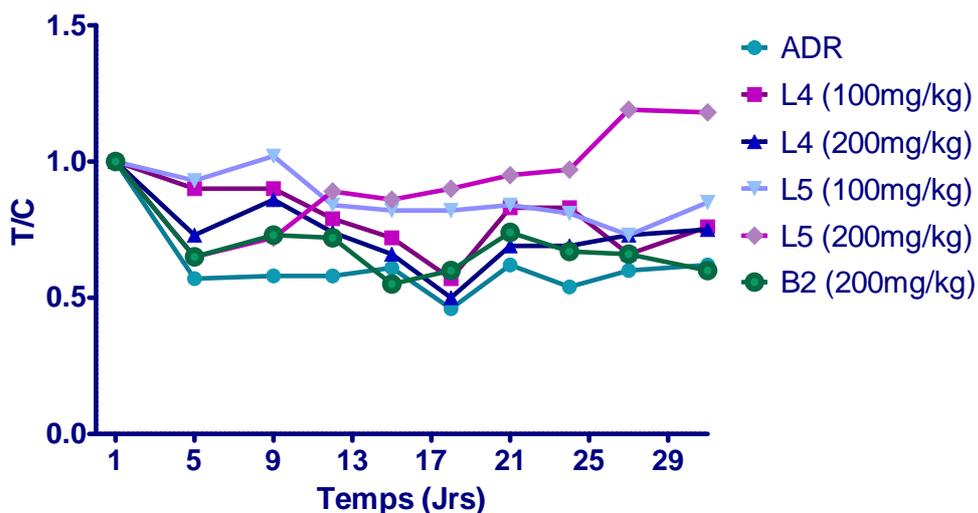


Figure 62 : Rapport Test / Contrôle en fonction du temps de traitement

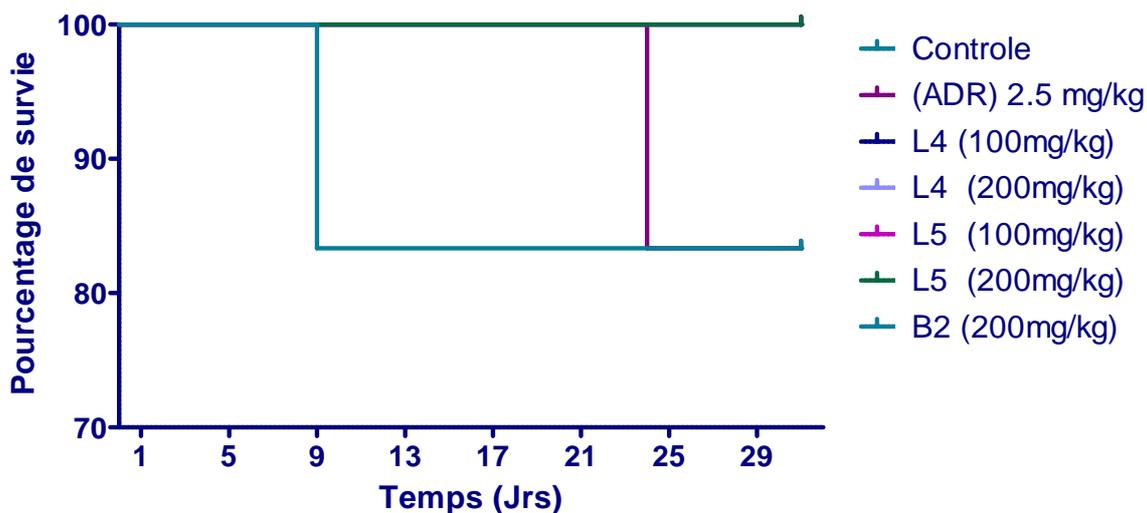


Figure 63 : Courbe de survie de Kaplan Meir en fonction du temps

La courbe du taux de survie (figure 63) a montré que le plus grand taux de décès tout au long de l'expérience a été enregistré dans les groupes traités à l'Adriamycine et à l'extrait aqueux d'écorces à la dose 200mg/kg de poids corporel avec un taux de survie de 83,33%.

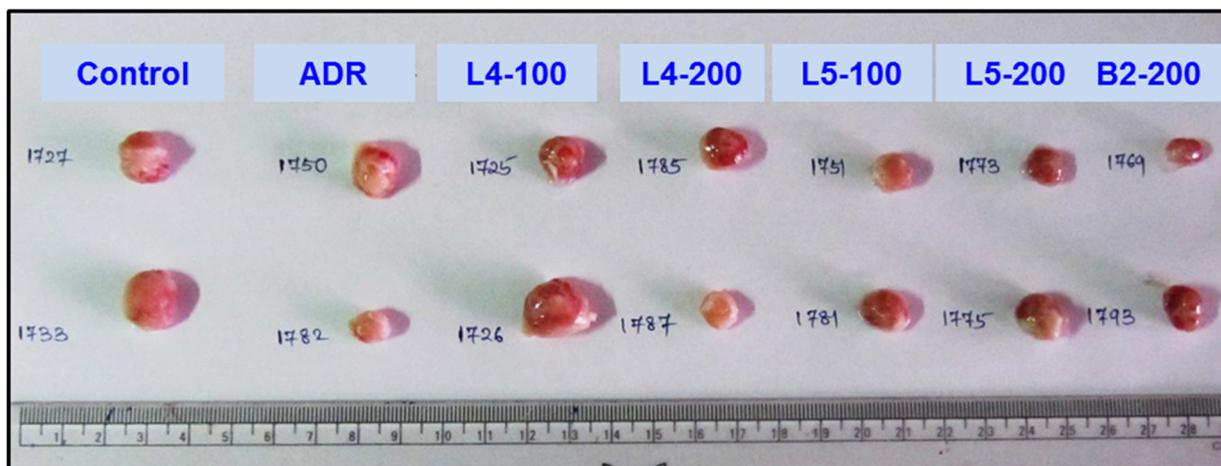


Figure 64 : Photographies des tumeurs au jour 31 de l'étude dans chaque groupe

La figure 64 représente les images des tumeurs de deux souris prises de façon aléatoire dans chaque groupe au jour 31 de l'expérimentation. Il en ressort que le volume de la tumeur est fonction de la souris au sein du même groupe soulignant l'influence des caractéristiques intrinsèques de chaque souris dans la réponse au traitement.

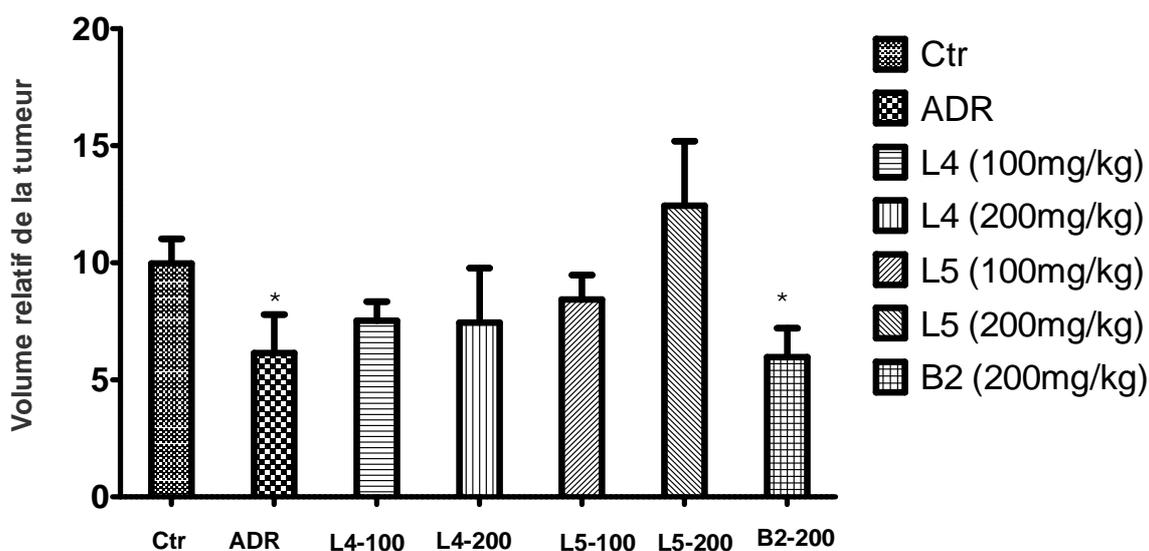


Figure 65 : Volume relatif de la tumeur au Jour 31 de l'étude.

L'analyse de la figure 65 montre que tous les traitements ont empêché la progression tumorale sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigue KG-1 au jour 31 de l'étude comparativement au contrôle à l'exception de la fraction L₅ à la dose 200mg/kg de poids corporel qui a plutôt entraîné une augmentation du volume tumoral. Toutefois, seul le traitement à l'extrait aqueux d'écorces à la dose 200mg/kg a présenté une inhibition significative ($p < 0,05$) de la croissance tumorale comparativement au groupe contrôle avec une régression de la tumeur

de 40,09%. Il convient de noter que l'effet du traitement par l'extrait aqueux d'écorces était comparable à celui de l'Adriamycine qui a inhibé la progression tumorale de la tumeur de 38,43%.

Discussion

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche électronique la plus externe (Goyal *et al.*, 2016, Kazeem *et al.*, 2016). Dans les conditions physiologiques normales, ce sont les déchets du métabolisme cellulaire produits majoritairement suite à la fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils sont donc impliqués sur le plan physiologique dans la transduction des signaux, la défense immunitaire, et la régulation du cycle cellulaire (Verbon *et al.*, 2012). Il apparaît donc que l'organisme est doté de systèmes antioxydants naturels qui le détoxifient de ces espèces chimiques lorsqu'elles sont produites dans les proportions modérées. Cependant, dans certaines conditions, (maladies, agressions par des agents externes), les radicaux libres peuvent être produits en concentrations supra-physiologiques dépassant alors les capacités antioxydantes naturelles de l'organisme et pouvant aboutir à un déséquilibre physiologique ou biochimique en faveur des molécules pro-oxydantes connu sous le nom de stress oxydatif. D'où la nécessité d'un apport exogène en molécules antioxydantes qui peuvent être synthétiques ou naturelles. De nombreux travaux ont démontré les effets antioxydants des extraits de plante. Cette partie du présent travail s'inscrit dans cette logique et visait à étudier le potentiel antioxydant et de la composition phytochimique des extraits bruts de *S. guineense*. Tous les extraits ont démontré un potentiel antioxydant dont l'efficacité varie en fonction de la méthode utilisée. Toutefois, leur capacité à piéger les radicaux DPPH[•] et ABTS⁺ suggère qu'ils sont riches en molécules capables de donner des électrons et /ou des atomes d'hydrogène qui vont inactiver ou stabiliser les radicaux libres après appariement à leurs électrons libres. Cette suggestion est confortée par la forte teneur des extraits en composés phénoliques. En effet, ces derniers ont la capacité de transférer un atome d'hydrogène vers le radical DPPH[•] ce qui entrainerait la formation d'une molécule de DPPH-H responsable de la diminution de la coloration violette caractéristique de la délocalisation électronique du radical DPPH[•] (Oliveira *et al.*, 2016). Par ailleurs, la présence dans la structure de base des composés phénoliques d'un système aromatique stabilisé par résonance leur confère également une grande capacité piègeuse de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (Dai et Mumper, 2010). De plus, les composés identifiés dans les extraits par HPLC (rutine, quercétine, acide gallique), confirme la présence des groupements OH dans leurs structures. Par ailleurs, la variabilité

d'activité entre les extraits serait due au nombre de groupements OH présents dans la structure des composés constitutifs de chaque extrait. La présence de ces groupements hydroxyles serait également responsable de l'activité piégeuse du radical ABTS⁺ et de la capacité chélatrice des ions ferriques des extraits. En effet, plusieurs études ont montré que l'activité chélatrice des flavonoïdes augmente avec le nombre de groupements OH présents dans leurs structures. La position du groupement OH influence également l'activité des flavonoïdes. De même, la présence d'un noyau catéchol sur le cycle B des flavonoïdes, les groupements OH en position 3 et oxo en position 4 du cycle C sont davantage des déterminants structuraux qui favorisent l'activité chélatrice des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002 ; Pietta, 2000). Ces résultats sont différents de ceux de Pieme *et al.* (2014a) qui avaient également étudié la capacité antioxydante des extraits hydroéthanoliques de feuilles et d'écorces de *S. guineense*. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues dans ce travail sont beaucoup plus faibles que celles obtenues par Pieme *et al.* (2014a) aussi bien pour le radical ABTS⁺ que pour le radical DPPH. De même, les teneurs en composés phénoliques obtenues dans cette étude sont significativement plus élevées (236,19 ± 3,09 meq/g d'extrait sec) que celles reportées par Pieme *et al.* (2014) (2,59 ± 0,03 meq/g d'extrait sec). Cette différence d'activité pourrait être due à l'influence des conditions pédoclimatiques. En effet, les échantillons utilisés par Pieme *et al.*, (2014) avaient été récoltés dans la localité de Bafia, alors que ceux utilisés dans cette étude ont été récoltés à Ndjie par Batchenga sur les rives de la Sanaga.

Au vu des résultats de piégeage des radicaux libres et des ions métalliques, les extraits de *S. guineense* peuvent être considérés aussi bien comme des antioxydants primaires que secondaires de par leur capacité à piéger les radicaux libres déjà formés d'une part et à prévenir la formation de ces derniers en chélatant les métaux de transition comme le fer d'autre part. En effet, les métaux de transition peuvent contribuer à la production du radical OH[•] par la réduction du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton.

Le cancer demeure un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale malgré les nombreuses avancées tant sur le plan diagnostique que thérapeutique. En effet, la sévérité des effets secondaires qu'engendre la chimiothérapie, méthode de traitement la plus utilisée conjuguée au phénomène de multi résistance qui entraîne l'arrêt de l'administration de certaines molécules et l'accroissement des taux d'échecs thérapeutiques sont autant de facteurs qui suscitent la recherche permanente de nouvelles molécules dotées de propriétés anticancéreuses. Par ailleurs, le cout élevé de ces traitements particulièrement pour les patients des pays à revenu intermédiaire (populations les plus affectées) explique davantage le recours à des méthodes de traitement alternatives et/ou complémentaires. La phytothérapie apparait de ce fait comme une

option intéressante non seulement pour atténuer les effets secondaires liés à l'utilisation des molécules synthétiques, mais également comme des bibliothèques chimiques qui regorgent de nouvelles molécules chimio-thérapeutiques. En effet, 60% des molécules utilisées en chimiothérapie mises sur le marché au cours des quatre dernières décennies ont été isolées de plantes naturelles ou obtenues par hémi-synthèse à partir d'un composé-parent isolé de plante (Newman et Cragg 2016). L'étude de la cytotoxicité des extraits de plantes vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses constitue la première étape dans le développement des molécules anticancéreuses. Il existe plusieurs méthodes à cet effet ; cependant, la méthode de référence actuellement recommandée par l'INC est la méthode de la sulforhodamine B. Cette partie du travail consistait à évaluer les effets des extraits bruts et fractions de *S. guineense* sur la prolifération des cellules du cancer du col de l'utérus, du sein et leucémiques par la méthode de la sulforhodamine afin d'en déterminer les paramètres antiprolifératifs (GI_{50} et TGI) et cytotoxique (LC_{50}). Bien que l'étude des propriétés anticancéreuses de *S. guineense* n'ait pas encore fait l'objet d'une étude, les résultats prometteurs obtenus avec *S. aromaticum* (Dwivedi *et al.*, 2011), *S. cumini*, Viswanathan, 2008 ; Nazif, 2007) plantes du même genre ont motivé notre travail.

Les résultats des tests antiprolifératifs ont montré que tous les extraits bruts de *S. guineense* possèdent la capacité d'inhiber la croissance des cellules de toutes les lignées étudiées mais à des degrés variables. Cet effet inhibiteur peut s'expliquer par la présence dans ces extraits bruts de composés phénoliques. En effet, de nombreuses études ont déjà mis en évidence le rôle antiprolifératif de cette classe de métabolites secondaires (Zheng *et al.*, 2005 ; Pieme *et al.*, 2013). De plus, les composés phénoliques (quercétine, acide caféique, paracoumarique, syringique et apigénine) identifiés par CLHP dans ces extraits sont déjà connus pour leurs propriétés anticancéreuses. Ainsi, les travaux de Janicke *et al.* (2005) et Bouzaiene *et al.* (2015) ont montré que les acides caféique et para-coumarique avaient la capacité d'inhiber la prolifération des cellules du cancer du côlon Caco-2 et HT-29 respectivement. De même, Shi *et al.* (2015) ont montré que l'apigénine était dotée d'une activité antiproliférative intrinsèque vis-à-vis des cellules du cancer de la vessie T-24 par blocage du cycle cellulaire et induction de l'apoptose. Chandrappa *et al.* (2014) ont également démontré l'activité anticancéreuse de la quercétine isolée de *Carmona retusa* vis-à-vis des cellules HepG2 du cancer du foie. De même, les travaux de Du *et al.* (2009) et Zhang et Zhang (2009) ont montré l'effet inhibiteur de la quercétine vis-à-vis des cellules du cancer du sein et du col de l'utérus respectivement. Toutefois, l'analyse des résultats des tests anti-radicalaires et antioxydants

d'une part et de la teneur en composés phénoliques d'autre part nous permet d'affirmer que l'activité anti-radicalaire et anti-oxydante n'est pas le mécanisme prépondérant par lequel les extraits exercent leur effet antiprolifératif. En effet, bien qu'ayant présenté les meilleures valeurs des différents paramètres antiprolifératifs et cytotoxique, l'extrait aqueux d'écorces n'a ni présenté la meilleure activité anti-radicalaire, ni la meilleure teneur en phénols totaux. Cette observation a déjà été relevée dans d'autres travaux. En effet, Baharum et al. (2014) ont montré qu'il existait une corrélation négative entre la teneur en composés phénoliques et l'effet antiprolifératif de l'extrait méthanolique de feuilles de *Theobroma cacao* sur les cellules du cancer du col utérin et du sein.

En outre, la présence de nombreux autres pics sur le chromatogramme après détermination de la composition phytochimique par CLHP, suggère la présence d'autres composés appartenant probablement à d'autres classes de métabolites secondaires que celle des polyphénols qui seraient responsables des effets antiprolifératif et cytotoxique observés. Par ailleurs, une action synergique de l'apigénine et de l'acide syringique, composés phénoliques identifiés pourrait également justifier la potentialisation de ladite activité. Cette hypothèse est confortée par les résultats des travaux de Yang *et al.* (2017) qui ont montré que l'administration simultanée de l'apigénine et de l'Interféron gamma (IFN γ) entraînait une augmentation de l'effet anticancéreux de l'IFN γ à travers la modulation de l'activité de la kinase cycline dépendante 1 vis-à-vis des cellules du cancer du col de l'utérus HeLa. De même, Liu *et al.* (2017), ont montré un effet synergique de l'apigénine avec la cisplatine potentialisant ainsi l'effet anticancéreux de la cisplatine sur les cellules MCF-7.

La constance de l'efficacité de cet extrait sur les lignées de différentes origines anatomiques suggère la présence dans cet extrait de molécules antiprolifératives à large spectre d'action. Toutefois, il convient de souligner que ce-dernier a présenté une certaine spécificité vis-à-vis des lignées leucémiques myéloïde chronique K562 et hormono-dépendante MCF-7 avec des valeurs de GI₅₀ deux fois plus faibles que celles obtenues avec les autres lignées cellulaires. En nous référant aux caractéristiques intrinsèques de ces lignées cellulaires, nous pensons à la présence dans cet extrait des composés qui agiraient via les récepteurs d'estrogène et/ou de progestérone pour ce qui est de la lignée MCF-7. Par ailleurs concernant la lignée K562, cette spécificité pourrait être liée à un effet inhibiteur de l'activité tyrosine kinase.

L'analyse des résultats des tests antiprolifératifs par type de cancer a montré que pour les cellules du cancer du sein, la lignée MCF7 a été plus sensible que la lignée MDA-MB231 à tous les extraits ; cette observation suggère que outre le mécanisme d'action commun aux deux lignées, les extraits agiraient via les récepteurs de progestérone et/ou d'estrogènes présents à la

surface des cellules MCF7 ce qui accroîtrait leur sensibilité comparativement aux cellules MDA-MB231 qui n'en possèdent pas. De même, concernant les lignées du cancer du col de l'utérus, la lignée SiHa (HPV 16⁺) s'est avérée plus sensible à tous les extraits que la lignée HeLa (HPV18⁺) ; cette forte sensibilité des cellules SiHa souligne davantage l'importance de ces fractions étant donné que le sous type 16 du papillomavirus humain présent dans ces dernières est incriminé dans 50 à 60% de cas de cancers cervicaux (Alshatwi *et al.*, 2013; Cherry *et al.*, 2013; Hirchaud *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). Par ailleurs, cette forte sensibilité serait due au faible nombre de copies d'ADN du papillomavirus humain comparativement au nombre de copies présentes dans les cellules HeLa bien qu'il s'agisse des sous types viraux différents. En effet, Hichaud *et al.* (2013) ont montré que les cellules de la lignée SiHa possèdent environ 1 à 2 copies du génome du sous-type 16 du papillomavirus humain contre 10 à 50 copies du sous-type 18 dans les cellules HeLa.

Le fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles a permis d'obtenir 4 fractions dont deux (fractions L₄ et L₅) ont présenté une activité antiproliférative accrue sur toutes les lignées cellulaires étudiées comparativement à ceux de l'extrait brut de départ. Ce résultat atteste que le fractionnement a permis d'isoler dans ces dernières les composés responsables de l'activité antiproliférative de l'extrait brut de départ. D'autre part, ce résultat suggère que les composés responsables de l'effet antiprolifératif et cytotoxique seraient des composés à faible polarité ou intermédiaire étant donné que les fractions L₄ et L₅ qui ont présenté le meilleur profil ont été extraites par les mélanges Hexane/Acétate d'éthyle 60:40 et 40:60 (v:v) respectivement. Par contre, toutes les quatre fractions obtenues ont présenté chacune une activité accrue par rapport à l'extrait brut de départ sur la lignée leucémique myéloïde chronique (K562) ce qui suggère que les composés présents dans l'extrait brut agiraient de manière antagoniste.

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire ont montré que les fractions L₄ et L₅ ont entraîné respectivement un arrêt du cycle en phase S et G₂/M sur les lignées SiHa et HeLa. Cet arrêt du cycle cellulaire serait l'un des mécanismes responsables de l'inhibition de la croissance de ces cellules tel que démontré par les résultats des tests antiprolifératifs. Par ailleurs, l'induction de l'apoptose par ces fractions révélées également par l'étude du cycle cellulaire expliquerait la mort cellulaire tel que l'ont montré les valeurs de LC₅₀, paramètre de cytotoxicité. Ces deux lignées cellulaires étant porteuses du papillomavirus humain, les fractions L₄ et L₅ entraîneraient une diminution du niveau d'expression des oncoprotéines virales E6 et E7, ce qui stimulerait le niveau d'expression de P53 et pRb, engageant alors les cellules cancéreuses dans le processus apoptotique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Tiang et Zang (2015) qui ont montré que l'extrait éthanolique de *Achillea falcata* inhibait la

croissance des cellules HeLa via un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M et la chute du potentiel membranaire mitochondrial.

Par ailleurs, sur les lignées du cancer du sein MDA-MB231 et MCF7, les fractions L₄ et L₅ ont également présenté le meilleur profil d'activité avec les valeurs des paramètres antiprolifératifs trois fois plus faibles que celles de l'extrait brut. Le mécanisme prépondérant responsable de cette inhibition de la prolifération serait un arrêt du cycle cellulaire en phase S tel que l'ont montré les résultats de l'analyse du cycle cellulaire ; les fractions préviendraient l'entrée en mitose des cellules du cancer du sein via leur accumulation en phase S, et par conséquent empêcheraient leur multiplication. La composition phytochimique déterminée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a révélé la présence du phytol dans les fractions L₄ et L₅. Bien qu'étant en faible concentration comparativement aux autres composés, ce diterpène mono-insaturé pourrait être responsable de l'activité de ces dernières ; en effet, les travaux de Sheedja *et al.* (2016) ont montré que le phytol purifié de *Gracilaria edulis* avait la capacité d'inhiber la croissance des cellules du cancer du sein (MCF7). De même, Pejin *et al.* (2014) ont montré que le phytol commercial inhibe la croissance des cellules HeLa. Pour ce qui est des lignées leucémiques, toutes les quatre fractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique de feuilles ont présenté des valeurs de GI₅₀ ≤ 20 μg/mL vis-à-vis de la lignée de leucémie myéloïde chronique K562, tandis que sur la lignée HL-60 seules les fractions L₄ et L₅ ont présenté des valeurs de GI₅₀ ≤ 20 μg/mL. Ces fractions sont donc des bons candidats pour le développement d'agents chimio-thérapeutiques contre les leucémies myéloïdes chronique et aigues respectivement selon les recommandations de l'INC. L'effet antiprolifératif de ces fractions serait médié par un arrêt du cycle cellulaire respectivement en phase G₂/M et S tel que le montrent les résultats de l'analyse du cycle cellulaire pour les fractions L₄ et L₅. Bien que nous n'ayons pas étudié l'effet des fractions L₄ et L₅ sur le niveau d'expression de la protéine suppresseur de tumeur P53, l'augmentation du niveau d'expression de cette dernière apparaît comme la voie commune responsable des arrêts en phase G₂/M et S. En effet, l'activation de P₅₃ stimulerait la synthèse de P₂₁ prévenant alors l'activité kinase des complexes CDK1/cycline B et cdk2/cycline A responsables des arrêts du cycle cellulaire en phase G₂/M et S.

En outre, l'induction de l'apoptose serait responsable de l'effet cytotoxique. L'étude du profil d'expression des protéines pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl-2 par western blot a montré que les fractions L₄ et L₅ stimulent l'expression de Bax concomitamment à une baisse de la protéine Bcl-2 pour la lignée K562 après 12h de traitement. Bax réprimerait alors l'expression de Bcl-2 contribuant ainsi à la perméabilisation de la membrane mitochondriale

externe phénomène nécessaire à la libération des facteurs apoptogéniques (cytochrome C, AIF) impliqués dans l'exécution de la voie apoptotique caspase-dépendante (Palowski et Kraft, 2000). Par ailleurs, il a été démontré que l'inhibition de la protéine Bcl-2 par Bax peut également entraîner une activation de la voie mitochondriale caspase-indépendante (Palowski et Kraft, 2000). De plus, il a été rapporté que la protéine Bcl2 est inactivée par la phosphorylation lorsque les cellules sont arrêtées en phase G₂ / M du cycle cellulaire (Tashiro *et al.* 1998).

Les composés comme le phytol, l' α -bisabolol, le cédrène et le copaène, présents dans la fraction L₄ pourraient être responsables des effets antiprolifératif et cytotoxique observés. En effet, les travaux de Pejin *et al.* (2014) et Bonifacio *et al.* (2012) ont reporté les effets antiprolifératifs de ces composés. Cependant, les composés majoritaires identifiés dans la fraction L₅ n'ont pas encore été rapportés dans la littérature comme dotés d'un effet anticancéreux. Ce qui suggère que les effets anticancéreux de cette fraction seraient dus aux composés mineurs identifiés déjà reportés dans la littérature pour leur activité anticancéreuse. D'autre part, les composés majoritaires retrouvés dans cette dernière pourraient être dotés d'une activité anticancéreuse intrinsèque non encore élucidée ou alors les composés majoritaires agiraient en synergie avec les composés mineurs, potentialisant ainsi l'efficacité de cette fraction.

La majorité des travaux relatifs à l'étude des propriétés biologiques des plantes se limitent à l'étude *in vitro*, ce qui constitue une entrave à l'application pratique des résultats de nombreux travaux de recherche sur les plantes ou composés d'origine naturelle. Par ailleurs, ce sont les résultats des essais précliniques (sur les modèles animaux) qui constituent la base premiers essais sur les humains dans le processus du développement de nouveaux agents chimio-thérapeutiques. Cette partie du travail s'est donc consacrée à évaluer la capacité des fractions ayant démontré un potentiel antiprolifératif intéressant *in vitro* sur les lignées cellulaires cancéreuses à inhiber la progression tumorale sur un modèle animal.

La détermination de la DMT (plus forte dose d'extrait administrée en dose unique donnée pendant une étude chronique qui n'entraîne pas de perte de poids ≥ 4 grammes et ne réduit pas la longévité par des effets autres que la cancérogénicité) nous a fourni d'une part des informations sur la toxicité de ces fractions et d'autre part a permis de fixer les doses maximales à administrer lors de l'étude de l'efficacité *in vivo*. La dose maximale testée (900mg/kg de poids corporel) suggère que les fractions L4 et L5 ainsi que l'extrait aqueux d'écorces sont bien tolérés par les souris NOD-SCID. Par ailleurs, l'absence de perte de poids ≥ 4 grammes suggère

que l'administration des fractions aux différentes doses testées n'a pas modifié les fonctions biologiques pouvant entraîner une modification de la consommation hydrique ou alimentaire chez les souris de souche NOD-SCID.

Quant à l'étude de l'efficacité des fractions L₄, L₅ et de l'extrait aqueux d'écorces *in vivo* les résultats ne sont pas en accord avec les résultats de l'étude *in vitro*. En effet, la fraction L₅ qui a montré la meilleure capacité cytotoxique et antiproliférative comparativement aux autres extraits a inhibé plus faiblement la progression tumorale sur les xénogreffes. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la lignée cellulaire utilisée pour la transplantation soit différente de celle utilisée pour l'étude *in vitro* bien qu'étant une lignée de leucémie myéloïde aigue comme la lignée HL-60. Par ailleurs, ceci pourrait s'expliquer par la faible hydrosolubilité et absorption ce qui réduirait la biodisponibilité de celle-ci *in vivo*. Cette observation a été relevée par Walle (2011) qui a montré que la faible biodisponibilité du resvératrol était responsable de la réduction de son efficacité lors des études *in vivo* comparativement aux études *in vitro*. En outre, les réactions de biotransformations au niveau du foie pourraient aboutir à la conversion du composé bioactif *in vitro* présent dans la fraction L₅ en un dérivé moins actif ou inactif *in vivo*. Aussi, cette réduction de l'efficacité *in vivo* pourrait s'expliquer par le fait que l'organisme mette en jeu des mécanismes visant à se débarrasser des métabolites contenus dans cette fraction considérée comme un non-soi.

A l'inverse, l'extrait aqueux d'écorces qui a présenté une valeur de GI₅₀ plus élevée (faible activité antiproliférative *in vitro*) comparativement aux fractions L₄ et L₅ a démontré le meilleur effet inhibiteur de la progression tumorale *in vivo*. Les réactions de biotransformations le long du tractus gastro-intestinal auraient entraîné la conversion du ou des métabolites peu actifs *in vitro* en dérivés plus actifs ce qui potentialiserait l'effet *in vivo*. Par ailleurs, la variabilité de la réponse aux traitements au sein d'un même groupe souligne l'influence des caractéristiques intrinsèques de chaque animal et explique davantage les variations interindividuelles dans la réponse au traitement anticancéreux.

CONCLUSION GENERALE

Parvenus au terme de ce travail qui avait pour objectif général d'étudier les propriétés antioxydantes et anticancéreuses *in vitro* et *in vivo* des extraits et fractions de *Syzygium guineense* variété *macrocarpum*, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Les extraits aqueux d'écorces et éthanolique de feuilles ont présenté les meilleures valeurs de GI₅₀ parmi tous les extraits bruts.
- Les fractions hexane/acétate d'éthyle 60 :40 et 40 :60 (v: v) sont de bons candidats pour le développement de nouveaux agents chimio-thérapeutiques contre les leucémies myéloïdes aigues et chroniques ; les mécanismes responsables de l'inhibition de la croissance des cellules des lignées leucémiques myéloïde aigues et chroniques seraient l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G₂/M respectivement et l'induction de l'apoptose via la modulation de l'expression des protéines Bax et Bcl-2.
- La composition phytochimique de la fraction L₄ a révélé en plus du méthyle hydrogène disulfure composé majoritaire, la présence de terpènes, d'acides gras et stérols. La fraction L₅ est composée majoritairement d'hydrocarbure soufrés, oxygénés et azotés.
- L'extrait aqueux d'écorces à la dose 200mg/kg de poids corporel inhibe significativement la progression de la tumeur sur les xénogreffes de leucémie myéloïde aigues KG-1.

PERSPECTIVES

Nous nous proposons pour approfondir ce travail :

- D'étudier les effets anticancéreux de l'extrait aqueux d'écorces sur les CDKs.
- Etudier les effets pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de l'extrait aqueux d'écorces

- Etudier la toxicité subaiguë et chronique de l'extrait aqueux d'écorces et faire des formulations pour les essais cliniques
- D'isoler et caractériser les composés présents dans les fractions à l'hexane/acétate d'éthyle 60 :40 et 40 :60 (v:v) dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles et étudier les effets anticancéreux de ces composés sur les lignées HL-60 et K562 et sur leurs xénogreffes.

REFERENCES

- Abebe D, Debella D and Urga K** (2003). Medicinal Plants of Ethiopia Camerapix Publishers International, Nairobi, Kenya. p 63.
- Abok JI and Manulu C** (2016). TLC Analysis and GC-MS Profiling of Hexane Extract of *Syzygium guineense* Leaf American Chemical Science Journal 16: 1-6 DOI: 10.9734/ACSJ/2016/27372
- Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC and Kaufman RH** (2000). American Journal of Obstetrics and Gynecology 182: 257.
- Adjanooun EJ, Adjakidjè V, Ahyi A, Assi A L, Akoègninou A, d'Almeida J, Apovo F, Boukef K , Chadaré M, Cusset G, Dramane K, Eymé J, Gassita JN, Gbaguidi N, Goudoté E, Guinko S, Houngnon P , Issa Lo, kéita A, Kiniffo HV, Koné-Bamba D, Musampa NA, Saadou M , Sogodandji T, deSouza S, Tchabi A, Zinsou CD, Zohoun T** (1989). Médecine Traditionnelle et Pharmacopée - Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. ACCT 359.
- Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J** (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. Eur J Pharm Sci 29: 1-13.
- Alshatwi AA, Shafi G, Noorul TH, Syed AN, Khoja KK** (2013). Fenugreek Induced Apoptosis in Breast Cancer MCF-7 Cells Mediated Independently by Fas Receptor Change Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 14: 5783 DOI: <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.10.5783>
- Anantchoke N, Lomarat P, PraserttirachaiW, KhammanitR and Mangmool S** (2016). Thai Fruits Exhibit Antioxidant Activity and Induction of Antioxidant Enzymes in HEK-293 Cells Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6083136>.
- Agarwal MK, Iqbal M, Athar M,** (2007). Garlic oil ameliorates ferric nitrilotriacetate (FENNTA)-induced damage and tumor promotion: Implications for cancer prevention, Food and Chemical Toxicology, 45, 1634-1640.
- Apel K, Hirt H,** (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction, Annual Review of Plant Biology, 55, 373-399.

- Ashok B, Ali R**, (1999). The aging paradox: Free radical theory of aging, *Experimental Gerontology*, 34, 293-303.
- Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL** (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*. 224: 274-283.
- Baharum Z, Akim AM, Taufiq-Yap Y H, Hamid A R and Kasran R** (2014). In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of *Theobroma cacao* *Molecules* 19: 18317-18331.
- Barh D, Viswanathan G**. 2008. *Syzygium Cumini* Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines: A Primary Study. 2008, *e cancer medical science* DOI: 10.3332/ecancer.2008.83.
- Barton MB, Jacob S, Shafiq J, et al** (2014). Estimating the demand for radiotherapy from the evidence: A review of changes from 2003 to 2012. *Radiother Oncol* 112:140-144
- Beaber EF, Diana SM, William B, Barlow E, Kathleen E, Susan M, Reed D and Christopher IL** (2014). Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20-49 years of age. *Cancer Res* 74: 4078–4089. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3400
- Bekele T** (1993). Vegetation ecology of remnant Af romontane forests on the Central Plateau of Shewa, Ethiopia. *Acta Phytogeographica Suecica*.79: 1-64.
- Belot A, Grosclaude P, Bossard N, et al.** (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56 : 159-75.
- Beta T, Nam S, Dexter JE and Sapirstein HD** (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry* 82: 390-393.
- Bhadrasain V** (2005). Radiation therapy for the developing countries. *J Cancer Res Ther* 1:7-8.
- Bishayee A, Politis T, Darvesh AS** (2010). Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 36: 43-53.
- Bonifacio M, Rigo A, Guardalben E, Bergamini C, Cavalieri E, Fato R, et al.** (2012). alpha-bisabolol is an effective proapoptotic agent against BCR-ABL(+) cells in synergism with Imatinib and Nilotinib. *PLoS ONE* 7:e46674. doi: 10.1371/journal.pone.0046674
- Bosch FX and De Sanjosé S** (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 23: 213-227.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*. 3: 1151-1157.

Bouzaiene NN, Kilani JS, Kovacic H, Chekir-Ghedira L, Ghedira K, Luis J (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European Journal of Pharmacology* 766: 99-105.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brugisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med* 68:445-448.

Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J (2002). Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur J Cancer* 38: 28-36.

Carocho M and Ferreira CFR Isabel (2013). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer: A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13: 1236-1258

Cavaliere E, Rigo A, Bonifacio M, Carcereride Prati, Guardalben A, Bergamini E, et al. (2011). Pro-apoptotic activity of a-bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. *J Transl Med* 9: 45. doi: 10.1186/1479-5876-9-45

Chabner BA, Roberts TG (2005). Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 65-72.

Chandrappa CP, Govindappa M, Kumar ANV, Channabasava R, Sadananda TS and Sharanappa P (2014). In Vitro Anticancer Activity Of Quercetin Isolated From *Carmona retusa* (Vahl.) Masam on Human Hepatoma Cell Line (Hepg2) *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 85-91

Chari RV (2008). Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res* 41: 98-107.

Chavan Rohit M. Khan N and Sathe NM (2016). A Review: SRB Assay For Screening Anticancer Activity Of Herbal Drugs (In-Vitro). *IAMJ*. 4: 66-70.

Chen YL, Lin SZ, Chang JY, Cheng YL, Tsai NM, Chen SP, Chang WL, Harn HJ (2006). In vitro and in vivo studies of a novel potential anticancer agent of isochaihulactone on human lung cancer A549 cells *biochemical pharmacology* 72: 308-319.

Chereda B and Melo JV (2015). Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 94: 107-121. doi: 10.1007/s00277-015-2325-z

Cherry JJ, Rietz A, Malinkevich A, et al (2013). Structure based identification and characterization of flavonoids that disrupt human papillomavirus-16 E6 function. *PLoS One* 8: 84506.

Chihara D, Ito H, Matsuda T, et al. (2012). Decreasing trend in mortality of chronic myelogenous leukemia patients after introduction of imatinib in Japan and the U.S. *Oncologist* 17: 1547-1550. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(21), 1604-1613. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604>

Chihara D, Tomohiro H, Kotakatanoda M, Kumiko A, Saika T, Keitaromatsuo S. (2012) Decreasing Trend in Mortality of Chronic Myelogenous Leukemia Patients After Introduction of Imatinib in Japan and the U.S. *The Oncologist* 17:1547–1550

Chorawala MR, Oza PM, Shah GB (2012). Mechanisms of Anticancer Drugs Resistance: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 4: 01-09

Chung Y C, Chang C T, Chao WW, Lin CF and Chou ST (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2454-2458.

Cragg, Gordon M., Kingston, David GL., Newman, David J., editors. *Anticancer Agents from Natural Products*. CRC/Taylor & Francis; Boca Raton, FL: 2005. p. 47-70.

Cronquist A. (1988). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York:Columbia University Press, 1981,7.*The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Bronx, NY:New York Botanical Garden. pp. 100-107.

Dai J and Mumper J (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer Properties. *Mol* 15: 7313-7352.

Dangles O (2012). Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*.16: 692-714.

Dangles O and Dufour C (2008). Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In *Recent Advances in Polyphenol Research* Blackwell Publishing Oxford 01: 67-87.

Day AJ, Bao Y, Morgan MRA, Williamson G (2000). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine*. 29:1234-1243.

De Gaulejac SC, Provost N, Vivas N (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:425-431.

- De Sanjosé S** (2006). Human Papillomavirus and cancer. *Epidemiology and prevention*. 4th Monograph of the Spanish Society of Epidemiology 143-147.
- Denny L** (2012). Cervical cancer: Prevention and treatment. *Discovery Medicine* 14: 125-131.
- Deshayes M** (2013). Contribution à la connaissance chimique et évaluation du potentiel biologique de *Ludwigia leptocarpa* (Onagracées) des Antilles françaises, Antilles-Guyane.
- Di Pietro G, Dayan G, Conseil E, Steinfels T, Krell D, Trompier H Baubichon-Cortay and Jault JM** (1999). P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure function relationships. *Brazilian journal of medical and biological research* 32: 925-939.
- Dizdaroglu M, Jaruga P**, (2012). *Mechanisms of free radical-induced damage to DNA*, *Free Radical Research*, 46, 382-419.
- Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacchi R, Tapondjou AL, Boud H, Lontsi D** (2005). Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 101: 283-286.
- Du G, Lin H, Wang M, Zhang S, Wu X, Lu L, Ji L, Yu L** (2009). Quercetin greatly improved therapeutic index of doxorubicin against 4T1 breast cancer by its opposing effects on HIF-1alpha in tumor and normal cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 65: 277-287. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-009-1032-7>
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen HA** (1983). Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci* 80: 3812-3815.
- Dwivedi V, Shrivastava R, Hussain S, Ganguly C, Bharadwaj M** (2011). Comparative Anticancer Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) - an Indian Spice - A gainst Cancer Cell Lines of Various Anatomical Origin. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 12: 1989-1993.
- Enow G E, P Ndom, AS Doh**, (2012). Current cancer incidence and trends in Yaoundé, Cameroon. *Oncol. Gastroenterol. Hepatol. Reports* 1: 58-63.
- Espinosa E, Zamora P, Feliu J, Gonzalez Baron M** (2003). Classification of anticancer drugs: a new System based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev* 29: 515-523.
- Etoundi O, Kuate J, Ngondi D and Oben E** (2013). Effects of extracts of *Hypodaphnis Zenkiri* and *Xylopia Aethiopica* on blood lipids, glycemia and body weight of roton W-1339 and insulino resistant rats. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm* 4: 736-741.
- Fang YZ, Yang S, Wu G**, (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. P. Maxwell, D. Forman, and Bray F**, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 136 (2015) E359-E386
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al.** GLOBOCAN 2018 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2018.
- Fisseha M, Talemso S, Abreham A** (2014). An ethnobotanical study of medicinal plants in amaro woreda Ethiopia. *Ethnobot Res Appl* 12: 341-354
- Fonseca-Moutinho, JA** (2011). Smoking and cervical cancer. *ISRN Obstetrics and Gynecology*,
- Fotakis G and Timbrell JA** (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160: 171-177
- Fournier A, Berrino F, and Clavel-Chapelon F** (2008). Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study *Breast Cancer Res Treat.* 107: 103-111 doi: 10.1007/s10549-007-9523-x
- Fournier A, Berrino F, Riboli E, Avenel V, Clavel-Chapelon F** (2005). Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer.* 114: 448-454.
- Françoise Clavel-Chapelon and E3N Group** (2002). Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women *Cancer Causes Control.* 13: 831–838.
- Gaurisankar S, Tanya D, Shuvomoy B, Chakraborty J.** (2010). Curcumin: from exotic spice to modern anticancer drug. *Al Ameen J Med Sci* 3: 21-37.
- Gennari C, Castoldi D, Sharon, O.** (2007). Natural products with taxol-like anti-tumor activity: Synthetic approaches to eleutherobin and dictyostatin. *Pure Appl. Chem.* 79: 173–180.
- Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA** (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18: 2269-2282.
- Ghildyal P, Grønhaug TE, Rusten A, Skogsrud M, Rolstad B, Diallo D, Michaelsen TE, Inngjerdigen Mt and Paulsen BS** (2010). Chemical composition and immunological activities of polysaccharides isolated from the malian medicinal plant *Syzygium guineense* *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 2: 76-85.

Giuseppe SA, Longo-Sorbello, Guray S, Banerjee D and Joseph RB (2006). Cell and tissue culture: assorted techniques. *Cell Biology* 38: 315-324

GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. <http://globocan.iarc>

Goyal S N, Mahajan UB, Chandrayan G, Kumawat VS, Kamble S, Patil P, Agrawal YO, Patil CR and Ojha S (2016). Protective effect of oleanolic acid on oxidative injury and cellular abnormalities in doxorubicin induced cardiac toxicity in rats. *Am J Transl Res* 8: 60-69.

Gunderson LL and Tepper JE (2012). *Clinical radiation oncology / senior editors Philadelphia, Third Edition*) PA Elsevier Saunders xxiii, 1638 p

Guo QL, Lin SS, You QD, Gu HY, Yu J, Zhao L, Qi Q, Liang F, Tan Z, Wang X. (2007). Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Life Science*. 78:1238-1245.

Gupta S and Gollapudi S (1993). P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *J Clin Immunol* 13: 289-301

Haasbeek CJ, Senan S, Smit EF, Paul MA, Slotman BJ, Lagerwaard FJ (2008). Critical review of non surgical treatment options for stage I non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 13: 309-319.

Halliwell B., (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end of the beginning). *Free Radical Research*, vol. 31, no. 4, pp. 261-272.

Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96: 67-202.

Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572-584.

Hideji I, Xihong W, Kuo-Hsiung L (2005). Homoharringtonine and related compounds. In: **Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti M, Sherman M, Rodríguez AC** (2001). HPV co-factors related to the development of cervical cancer: Results from a population-based study in Costa Rica. *British Journal of Cancer* 84: 1219-1226. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1779>

Hirchaud F, Hermetet F, Ablise M, et al (2013). Isoliquiritigenin induces caspase-dependent apoptosis via downregulation of HPV16 E6 expression in cervical cancer CaSki cells. *Planta Med* 79: 1628-1635.

Holmberg M (1992). Is the primary event in radiation-induced chronic myelogenous leukemia the induction of the t(9;22) translocation? *Leuk Res* 16: 333-336.

Hom L and Sandler AB (2009). Emerging data with antiangiogenic therapies in early and advanced non-small cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 10: 7-16.

Howie HL, Katzenellenbogen RA and Galloway DA (2009) Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384: 324-334. doi:10.1016/j.virol.2008.11.017

Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.

Huguet F et Récher C (2011). Leucémies aiguës de l'adulte *Hematologie*. 17: 203-24

Ismail N, Lope PH and Nallapan M (2005). Xanthorrhizol Azimahtol Induces Apoptosis Via the Up-regulation of Bax and p53 in HeLa Cells. *Anticancer Research* 25: 2221-2228.

Janicke B, Onning G and Oredsson SM (2005). Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *J Agric Food Chem* 53: 6658-6665.

Joseph Monsonego (1996). Papillomavirus et cancer du col de l'utérus *médecine/sciences* 12 : 733-744

Kamga SK, Zingue S, Winter E, Awounfack CF, Bishayee A, Desai NN, Mello LJ, Michel T, Tankeu FN, Tantoh DN, Riwoom SH, Njamen D and Creczynski-Pasa BT (2017). *Ficus umbellata* Vahl. (Moraceae) Stem Bark Extracts Exert Antitumor Activities In Vitro and In Vivo *Int J Mol Sci* 18: 1073; doi:10.3390/ijms18061073

Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Quintas-Cardama A, Shan J, Beth Rios M, Ravandi F, Faderl S, Kadia T, Borthakur G, Huang X, Champlin R, Talpaz M, and Cortes J (2012). Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience *Blood*. 119: 1981–1987. doi: [10.1182/blood-2011-08-358135](https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-358135)

Kantarjian HM, O'Brien S, and Cortes J (2013). Homoharringtonine/Omacetaxine Mepesuccinate: The Long and Winding Road to Food and Drug Administration Approval *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 13: 530-533. doi:10.1016/j.clml.2013.03.017

Kazeem MI, Ashafa AO and Nafiu MO (2016). Biological Activities of three Nigerian Spices-*Laurus nobilis* Linn, *Murraya koenigii* (L) Spreng and *Thymus vulgaris* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 14: 2255-2261.

Kelley EE, Khoo NKH, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase, *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 493-498.

Kerharo J and Adams G (1974). *Pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxique*. Edit. Vigot et frères, Paris, 1011 P.

Key TJ, Verkasalo PK, Banks E (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2:133-140.

Khazaei S, Hamid RA, Ramachandran V, Mohd NE, Kumar PA, Danazadeh F, and Ismaili P (2017). Cytotoxicity and Proapoptotic Effects of *Allium atroviolaceum* Flower Extract by Modulating Cell Cycle Arrest and Caspase-Dependent and p53-Independent Pathway in Breast Cancer Cell Lines Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. <https://doi.org/10.1155/2017/1468957>

Kim J, Kim BK, Lee CH, Seo SS, Park SY and Roh, JW (2012). Human papillomavirus genotypes and cofactors causing cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women. *International Journal of Gynecological Cancer* 22: 1570–1576.

Kim MS, Bak Y, Park YS, et al (2013). Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol* 29: 259-272.

Knight J, (1999)..*Free radicals, antioxidants, aging, & disease.*, Washington DC (USA), AACC Press, 125, 984-984.

Kocak MS, Sarikurkcu C, Cengiz MS, Kocak MC, and Tepe B (2016). *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products* 85: 204-212.

Kohn HI and Liversedge N (1944). On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther* 82: 292-300,

Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO et al. (2006). BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 108: 319-327.

Korycka-Dahl M, Richardson T (1978). *Activated oxygen species and oxidation of food constituents*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 10, 209-241.

Kuete V, Fankam AG, Wiench B and Efferth T (2013). Cytotoxicity and Modes of Action of the Methanol Extracts of Six Cameroonian Medicinal Plants against Multidrug-Resistant Tumor Cells Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine <http://dx.doi.org/10.1155/2013/285903>

Kumaran A and Karunakaran RJ (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology* 40: 344-352.

Laszczyk MN (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med* 75: 1549-1560.

Lawrence TS, William BA and McGinn C (2003). The Mechanism of Action of Radiosensitization of Conventional Chemotherapeutic Agents. *Seminars in Radiation Oncology* 13: 13-21

Lea CH (1931). The effect of light on the oxidation of fats. *Proc Roy Soc London* 108: 175-189.

Lebart MC. La régulation du cycle cellulaire. *Bmédia et vie*. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm>, consulté le 23 janvier 2017.

Ma Y, Collins S, Young LS, Murray PG and Woodman CB (2011). Smoking initiation is followed by the early acquisition of epigenetic change in cervical epithelium: A longitudinal study. *British Journal of Cancer* 104: 1500–1504. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.113>

Mann J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer* 2 : 143-148.

McCutchan HJ, Schwappach JR, Enquist EG, Walden DL, Terada LS, Reiss OK, Leff JA, Repine JE (1990). *Xanthine oxidase-derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle*, *American Journal of Physiology*, 258, H1415-1419.

Merlin JL (2008). *La Lettre du Cancérologue* 17: 334-349.

Merviel P, Jouvance O, Naepels P, Fauvet R, Cabrydgoubet R, Gagneur O, Gondry J (2011). Existe-t-il encore des facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein? *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 39 : 486-490.

Mickley LA, Spengler BA, Knutsen TA, Biedler JL, Fojo T (1999) Gene rearrangement: A novel mechanism for MDR-1 gene activation. *J Clin Invest* 99: 1947-1957.

Molyneux P (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity. *J Sci Technol* 26: 211-219.

Monroy-García A, Gómez-Lim MA, Weiss-Steider B, Paz-de la Rosa G, Hernández-Montes J, Pérez-Saldaña K, Tapia-Guerrero YS, Toledo-Guzmán ME, Santiago-Osorio E, Sanchez-Peña HI, Mora-García ML (2011). A novel HPV 16 L1-based chimeric virus-like particle containing E6 and E7 seroreactive epitopes permits highly specific detection of antibodies in patients with CIN 1 and HPV-16 infection. *Virology Journal* 8:59 <http://www.virologyj.com/content/8/1/59>

Nagao A, Seki M, Kobayashi H (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63: 1787-1790.

Navneet D, Bharat AB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara, AB, Abbruzzese JL, Chaan S, Badmaev V, Kurzrock R (2008). Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.*14: 4491- 4499.

Nazif NM (2007). The anthocyanin components and cytotoxic activity of *Syzygium cumini* (L.) fruits growing in Egypt *Natl Prod Sci* 13: 135-139.

Newman DJ and Cragg GM (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79: 629-661.

Nguyen TL, Rusten A, Skogsrud MB, Malterud KE, Diallo D, Paulsen BS, Wangensteen H (2016). Flavonoids ,gallotannins and ellagitannins in *Syzygium guineense* and the traditional use among Malian healers *Journal of Ethnopharmacology* 192: 450-458.

Nkondjock Aet Ghadirian P (2005). Facteurs de risque du cancer du sein, *Médecine/Sciences* 21: 175-180.

Oba K (2009). Efficacy of adjuvant chemotherapy using tegafur-based regimen for curatively resected gastrIC cancer: update of a meta-analysis. *Int J Clin Oncol.* 14: 85-89.

Oh S, Song YH, Yim J, Kim TK (2000). Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. [Oncogene](#). 19:1485-1490.

Oliveira GK, Tormin TF, Sousa RM, de Oliveira A, de Morais SA, Richter ME and Munoz RA (2016). Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food chemistry* 192: 691-697.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorption capacity assay using fluorescein as a fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49 : 4619-4626.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL, (2001).. Development and validation of an improved oxygen radical absorption capacity assay using fluorescein as a fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626

Ozcelik O, Lee JH, Min DB (2003). Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science* 68: 487-490.

Pan TL, Yu-Chiang H, Pei-Wen W, Shui-Ten C, Teng-Kuei H, Nardnisa S, Chao-Sheng C, Ping-Chiang L (2010). Functional proteomic and structural insights into molecular targets related to the growth inhibitory effect of tanshinone IIA on HeLa cells. *Proteomics.* 10: 914-929.

Papas A, (1999) .Determinants of antioxidant status in humans, *Contemporary Food Science*, CRC Press, Boca Raton, London, 672.

- Pawlowski J and Kraft AS** (2000). Bax-induced apoptotic cell death. PNAS 97: 529-531.
- Pejin B, Kojic V, and Bogdanovic G** (2014). An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. Natural Product Research 28: 2053–2056.
- Perez EA** (2009). Impact, mechanisms and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 114: 195–201.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L** (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30, 11-26.
- Pieme CA, Kumar SG, Dongmo MS, Moukette MB, Boyoum FF, Ngogang YJ and Kumar AS** (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 14: 516.
- Pieme CA, Kumar SG, Ngamegni B Ngogang J, Shashi B, Tetsuya M, Kumar AS** (2013). Ethyl acetate fraction of *Garcinia epunctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: A bioassay-guided approach. Environmental toxicology and pharmacology 36: 865-874.
- Pieme CA, Ngoupayo J, Nkoulou C, Moukette B, Nono B, Ama V, Minkande J, Ngogang J** (2014a) *Syzygium guineense* Extracts Show Antioxidant Activities and Beneficial Activities on Oxidative Stress Induced by Ferric Chloride in the Liver Homogenate. Antioxidants. 3: 618-635.
- Pietta PG** (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Production. 63: 1035-1042
- Pintusorn H, Kalaya A, Sermkiat T and Arunporn I** (2014). Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non-small-cell lung cancer A549 cells BMC Complementary and Alternative Medicine 14:413 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/413>
- Pisha E, Chai H, Lee, IS, Chagwedera, TE, Farnsworth, NR, Cordell, GA, Beecher WW, Fong, HS, Douglas KA, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Heiken TE Gupta TK, Pezzuto JM** (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. Nat Med 1: 1046-1051.
- Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, Muñoz N** (2003). Smoking and cervical cancer: Pooled analysis of the IARC multi-centric case– control study. Cancer causes and control 14:805-814.

Prieto P, Pineda M and Aguilar M (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* 269: 337-341.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG and Gabai VL (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283: 1-16.

Pryor WA, Cornicelli JA, Devall LJ, Tait B, Trivedi BK, Witiak DT, Wu M (1993) A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J Org Chem* 58: 3521-3532.

Quent VMC, Loessner D, Friis T, Reichert JC, Hutmacher DW (2010). Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med* 14: 1003-1013.

Rampersad SN (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays *Sensors* 12: 12347-12360.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.

Rodriguez J and Lazebnik Y (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes and development* 13: 3179-3184.

Rogers G, Hoyle M, Thompson Coon J, et al. (2012). Dasatinib and nilotinib for imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukaemia: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 16: 401-410.

Rolo-Naranjo A, Rebolledo-Rios R, Melchor-Rodriguez K, and Codorniu-Hernández E (2009). Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid–protein interactions. *Applied Mathematics and Computation* 215: 156-167.

Rosell R, Taron M, Ariza A, Barnadas A, Mate JL, Reguart N, et al. (2004). Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer. *Semin Oncol* 31: 20-27.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. [JAMA](https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321). 288: 321-333. doi:10.1001/jama.288.3.321.

Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M and Bezrukov SM (2004). Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13575-13583.

- Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, Gram IT** (2014). Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer* 135: 453–466. <https://doi.org/10.1002/ijc.28666>
- Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, et al.** (1990). Comparison of in vitro anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumour cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82: 1113-1138.
- Rumpold H, Webersinke G** (2011). Molecular pathogenesis of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia is it all BCRABL? *Curr Cancer Drug Targets* 11: 3-19.
- Sanogo ZZ, Doumbia D, Mounkoro N, Diallo AK, Sidibe S, Diallo DA, Sangare D, Soumare S** (2004). Cancer du sein et grossesse: Cas extreme. *Mali medical* 4: 51-53.
- Schafer ZT and Kornbluth S** (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Developmental cell* 10: 549-561.
- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL** (2001). Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 286: 3106-3114.
- Schmitz I, Kirchhoff S and Krammer PH** (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The international journal of biochemistry and cell biology* 32: 1123-1136.
- Shi MD, Lee YC and Shih YW** (2015). Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis *Cancer Cell International* 15:33. DOI 10.1186/s12935-015-0186-0
- Sies H,** (1997). *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*, *Experimental physiology*, 82, 291-295.
- Sies H.** (2013). *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*, *Redox Biology*, 4, 180-183.
- Silva J, Cerqueira F, and Medeiros R** (2014). Chlamydia trachomatis infection: Implications for HPV status and cervical cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 289: 715–723. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3122-3>
- Singh U, Neetu A, Kumari R A, Singh N, Pushplata S Qureshi S** (2013). The Efficacy and Safety of Neoadjuvant Chemotherapy in Treatment of Locally Advanced Carcinoma Cervix. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 63: 273–278 DOI 10.1007/s13224-012-0342-6.

Singleton V and Draper D (1964). The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wine. *Am J Enol Vitic.* 15: 34-40.

Sitas F, Parkin DM, Chirenje M, Stein L, Abratt R, Wabinga H (2008). Part II: Cancer in Indigenous Africans-causes and control. *Lancet Oncol.* 9: 786-795.

SkaBa E, Sitarek P, Róhalski M, Krajewska U, Szemraj J, Wysokińska H, and Uliwiński T (2016). Antioxidant and DNA Repair Stimulating Effect of Extracts from Transformed and Normal Roots of *Rhaponticum carthamoides* against Induced Oxidative Stress and DNA Damage in CHO Cells Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5753139>.

Skorski T (2002). Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2: 351-360.

Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Peeling RW (2004). Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *International Journal of Cancer* 111: 431-439. <https://doi.org/10.1002/ijc.20257>

Srinivas RV, Middlemas D, Flynn P, Fridland A (1998). Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3157-3162.

Stoddart MJ (2011). Cell viability assays: Introduction, mammalian cell viability. *Meth Mol Biol* 740: 1-6.

Storz P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* 10: 1881-1896.

Stratton MR and Rahman N (2008) The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet.* 40: 17-22. DOI:[10.1038/ng.2007.53](https://doi.org/10.1038/ng.2007.53)

Tashiro E, Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M (1998). Caspase-3 activation is not responsible for vinblastine-induced Bcl-2 phosphorylation and G2/M arrest in human small cell lung carcinoma Ms-1 cells. *Jpn J Cancer Res* 89: 940-946.

Tatsadjieu LN, Essia Ngang JJ, Ngassoum MB and FX Etoa (2003). Antibacterial and antifungal activity of *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. *Fitoterapia* 74 : 469-472.

Teijido O, Dejean L. (2010) Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS Lett.* 584: 3305-3310

Teketay D, Tesfaye G, Fetene M (2002). Regeneration of fourteen tree species in Harena forest, southeastern Ethiopia. *Flora.* 197:461-474.

Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK (2006) Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.* 8: 443-449.

Thomas Walle (2011). Bioavailability of resveratrol. *Ann NY Acad Sci.* 1215: 9-15

Tian Q and Zang Y (2015). Antiproliferative and apoptotic effects of the ethanolic herbal extract of *Achillea falcata* in human cervical cancer cells are mediated via cell cycle arrest and mitochondrial membrane potential loss *JBUON* 20: 1487-1496.

Towbin H, Staehelint T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography) *Proc Natl Acad Sci Vol* 76: 4350-4354.

Tsakala TM, Penge O and John K (1996). Screening of in vitro antibacterial activity from *Syzygium guineense* (Willd) hydrosoluble dry extract. *Ann. Pharm. Fr.* 54: 276-279.

Tubaro F, Micossi E, Ursini F (1996). The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 : 173-179.

Twelves C, Jove M, Gombos A, Awada A (2016). Cytotoxic chemotherapy: Still the mainstay of clinical practice for allsubtypes metastatic breast cancer *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 100: 74-87.

Uto, T, Sakamoto A, Tung NH, Fujiki T, Kishihara K, Oiso S, Kariyazono H, Morinaga O, Shoyama Y (2013). Anti-proliferative activities and apoptosis induction by triterpenes derived from *Eriobotrya japonica* in human leukemia cell lines. *Int J Mol Sci* 14: 4106-4120.

Valko MD, Leibfritz J, Moncol MT, Cronin MM, and Telser J (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *The international journal of biochemistry and cell biology* 39: 44-84.

Verbon E, Post J and Boonstra J (2012). The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 511:1-6.

Vichai V and Kirtikara K (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1: 1112-1126.

Visconti R and Grieco D (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinions in Drug Discovery Development* 12: 240-245.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos M, et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19.

Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, and Sim GA (1966). Plant Antitumor Agents: The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata* *J Am Chem Soc* 88: 3888-3890.

Wardak S (2016). Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia* 68: 73.

Woo Y, Lee H, Jeong YS, Young SG, Gyeong JO, Kim JS, and Oh J (2017). Antioxidant Potential of Selected Korean Edible Plant Extracts. *Hindawi BioMed Research International* <https://doi.org/10.1155/2017/7695605>.

World Health Organization: International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>

Yan X, Qi M, Li P, Zhan Y and Shao H (2017). Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell Biosci* 7: 50 DOI 10.1186/s13578-017-0179-x

Yan YY, Bai JP, Xie Y, Yu JZ, Ma CG (2013). The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Oncol Lett* 5: 242-248.

Zhang W and Zhang F (2009). Effects of quercetin on proliferation, apoptosis, adhesion and migration, and invasion of HeLa cells. *Eur J Gynaecol Oncol* 30: 60-64.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.

Zhou DC, Zittoun R, Marie JP (1995). Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy. *Bull Cancer* 82: 987-995.

Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W and Zhu X (2016). Medicine Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer A Meta-Analysis

Zuo Y, Chen H and Deng Y (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 57: 307-316.



ANNEXES

Annexe 1 : Procédures de préparation des réactifs tests antioxydant et anti-radicalaires

1. Dosage des polyphénols totaux

▪ Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10^e

Folin-ciocalteu	2 mL	
Eau distillée QSP		20 mL

▪ Solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 7,5%

Na ₂ CO ₃		3,75 g
Eau distillée QSP		50 mL

2. Dosage des flavonoïdes totaux

▪ Solution de nitrite de sodium (NaNO₂) 5 %

NaNO ₂		1 g
Eau distillée QSP		20 mL

▪ Solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) 10 %

AlCl ₃		2 g
Eau distillée QSP		20 mL

▪ Solution hydroxyde de sodium (NaOH) 1 mM

NaOH		2 mg
Eau distillée QSP		50 mL

3. Dosage des flavonols

▪ Solution éthanolique d'AlCl₃ 2%

AlCl ₃		0,4 g
Eau distillée QSP		20 mL

▪ Solution d'acétate de sodium (CH₃COONa) 50 g/L

CH ₃ COONa	5 g	
Eau distillée QSP		100 mL

4. Dosage de la capacité antioxydante totale par la méthode de « FRAP »

▪ Tampon acétate 300 mM ; pH 3,6

Acide acétique		4,13 mL
Acétate de sodium		0,66 g

Dissoudre 0,66g d'acétate de sodium dans 200 ml d'eau, puis ajuster le pH à 3,6 par titration avec 4,13 mL d'acide acétique, et compléter le volume à 250 mL.

▪ Solution de TPTZ 10 mM

HCl 400mM (0,86 mL HCl 12M + Eau distillé QSP 25 mL)		25 mL
TPTZ		0,078 g

- **Solution FeCl₃ 10 mM**

FeCl ₃	0,34 g
Eau distillée QSP	25 mL

- **Réactif de FRAP**

Mélanger les solutions de tampon acétate (300 Mm ; Ph 3,6), de TPTZ (10 mM) et de FeCl₃ (10 mM) dans les proportions 10 : 1 : 1.

5. Capacité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate

- **H₂SO₄ 0,6 M**

H ₂ SO ₄ 6,94 M	1,73 mL
Eau distillée QSP	20 mL

- **NaH₂PO₄ 28 mM**

NaH ₂ PO ₄	77,28 mg
Eau distillée QSP	20 mL

- **Molybdate d'ammonium 4 mM**

Molybdate d'ammonium	0,25 g
Eau distillée QSP	50 mL

- **Réactif phosphomolybdate**

Mélanger aux proportions 1 : 1 : 1 du H₂SO₄ 0,6 M, du NaH₂PO₄ 28 mM ; et du molybdate d'ammonium 4 mM.

- **Solution d'acide trichloracétique (TCA) (10%)**

TCA	25 g
Eau distillée QSP	250 mL

- **Solution de FeCl₃ (0,1 %)**

FeCl ₃	0,25 g
Eau distillée QSP	250 mL

6-Capacité antiradicalaire pour le radical DPPH

Solution méthanolique de DPPH (0,1 mM)

DPPH	0,01 g
Méthanol QSP	300 mL

7-Capacité antiradicalaire pour le radical ABTS

Persulfate de potassium 2,45 mM

Persulfate de potassium	28 mg
Eau distillée QSP	50 mL

- **ABTS 7 mM**

ABTS

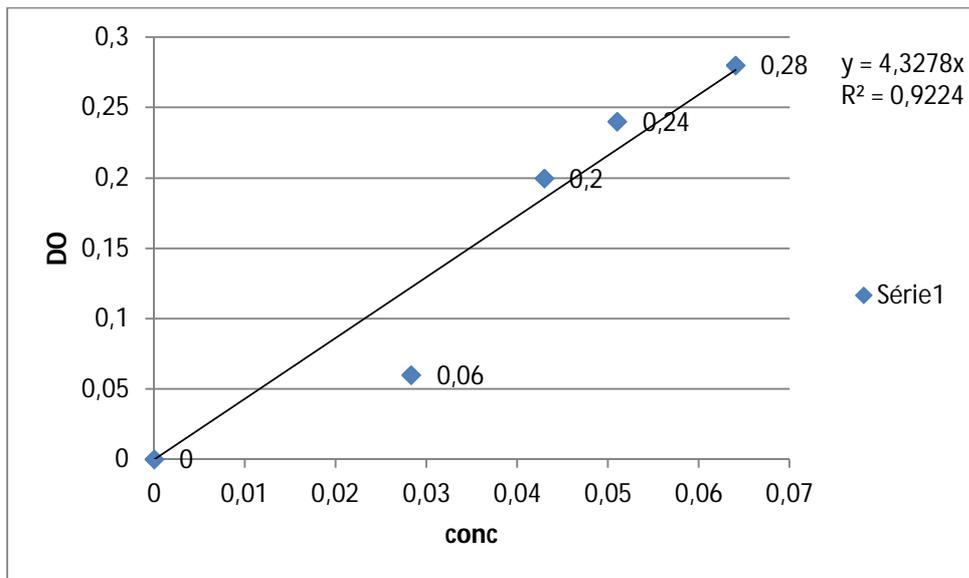
192 mg

Eau distillée QSP 50 mL

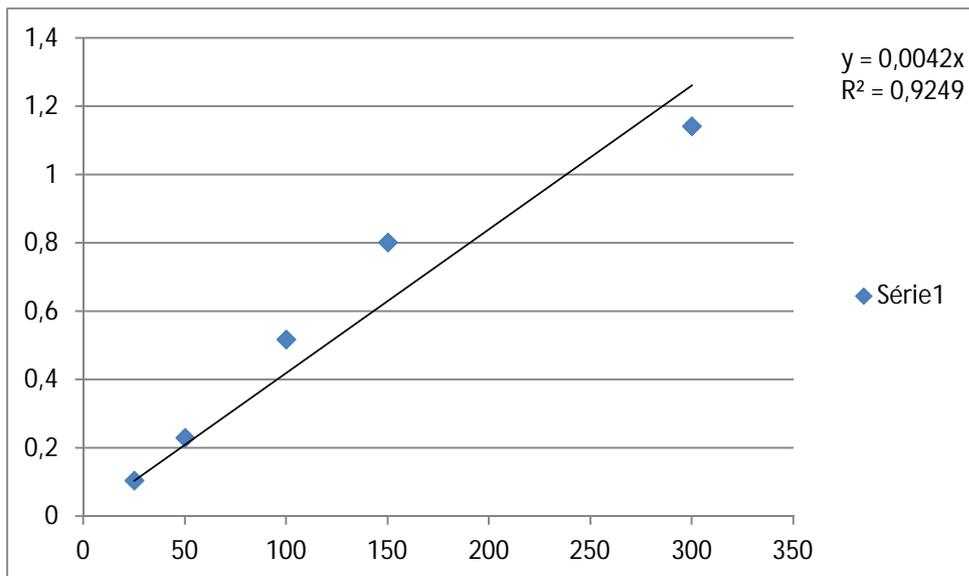
▪ **Réactif d'ABTS**

Mélanger les solutions de Persulfate de potassium (2,45 mM) et ABTS (7 mM) dans les proportions 1 : 1. Garder la solution à l'obscurité pendant 12 heures. Diluer le mélange avec de l'éthanol en mesurant l'absorbance jusqu'à obtenir une DO de $0,70 \pm 0,05$ à 734 nm.

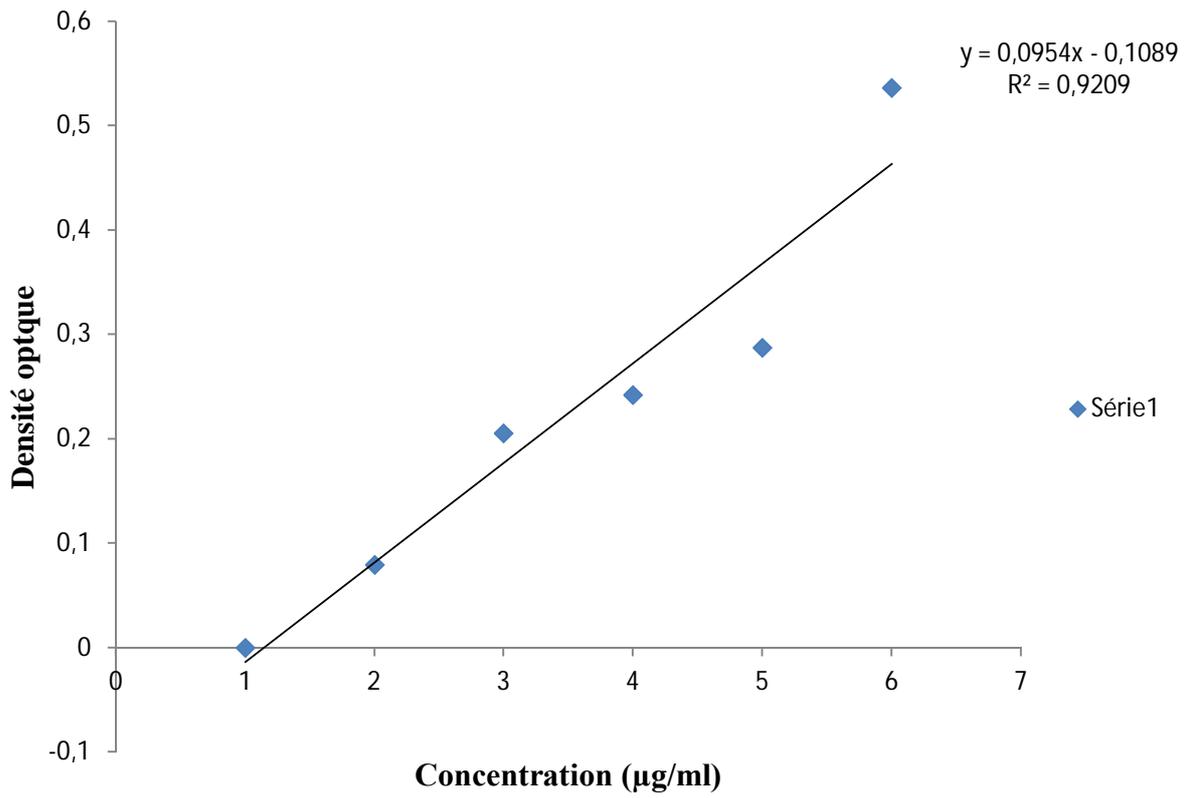
Annexe 2: Courbes d'étalonnages



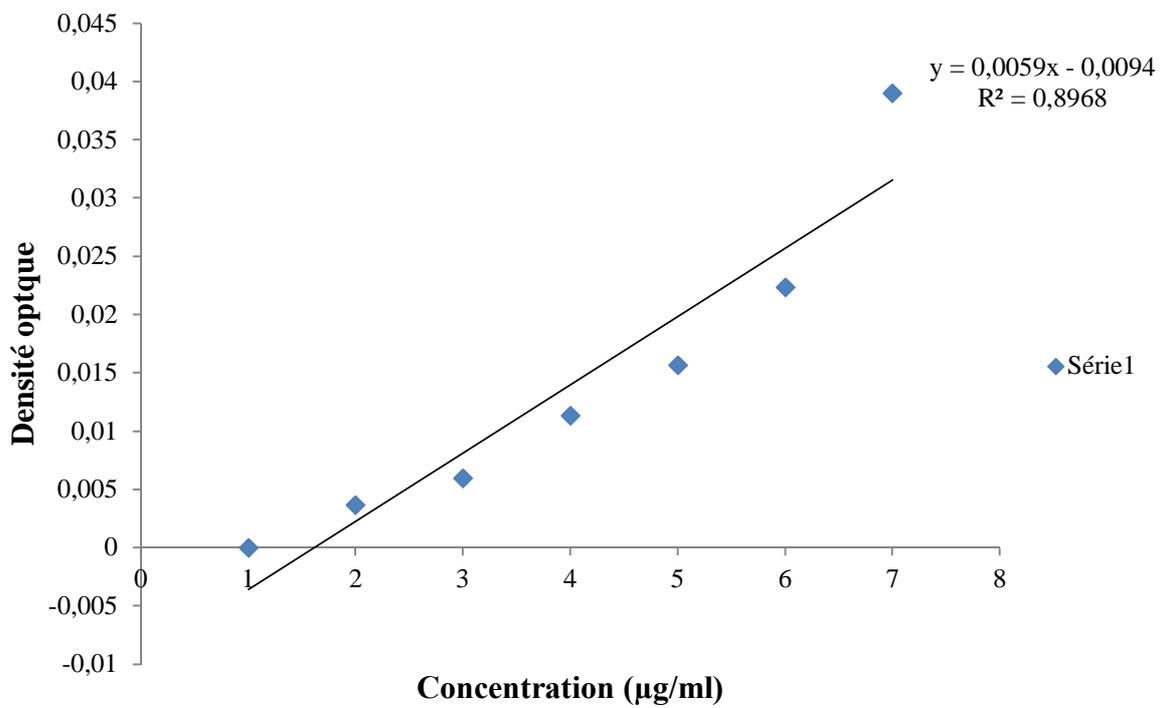
Courbe d'étalonnage des flavonoides

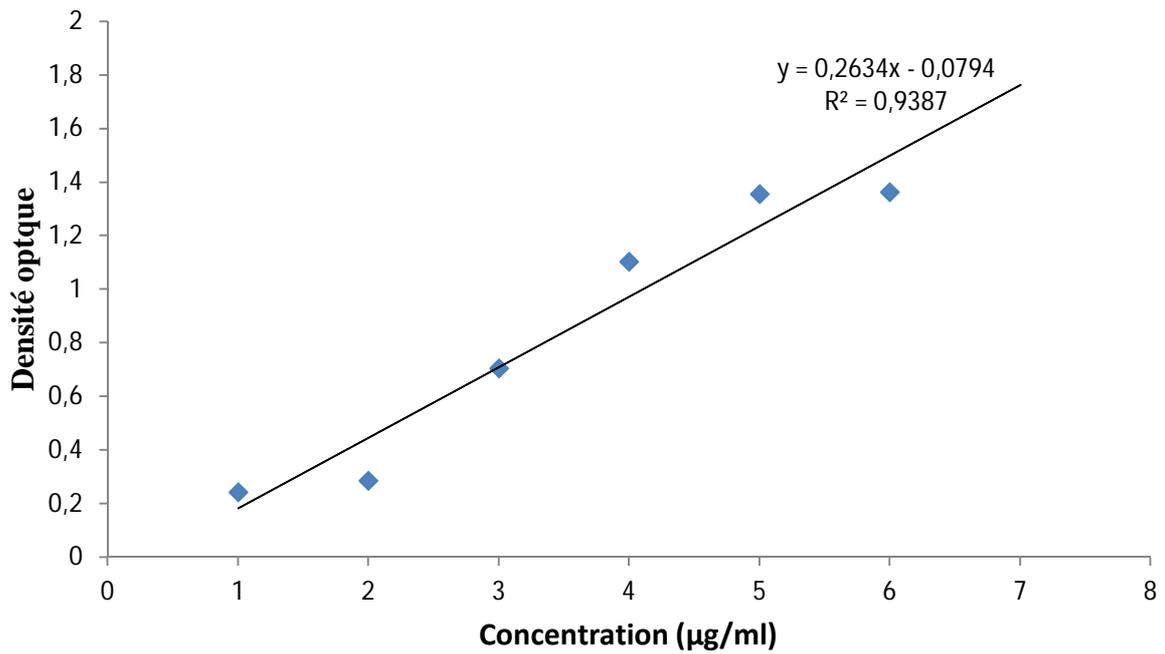
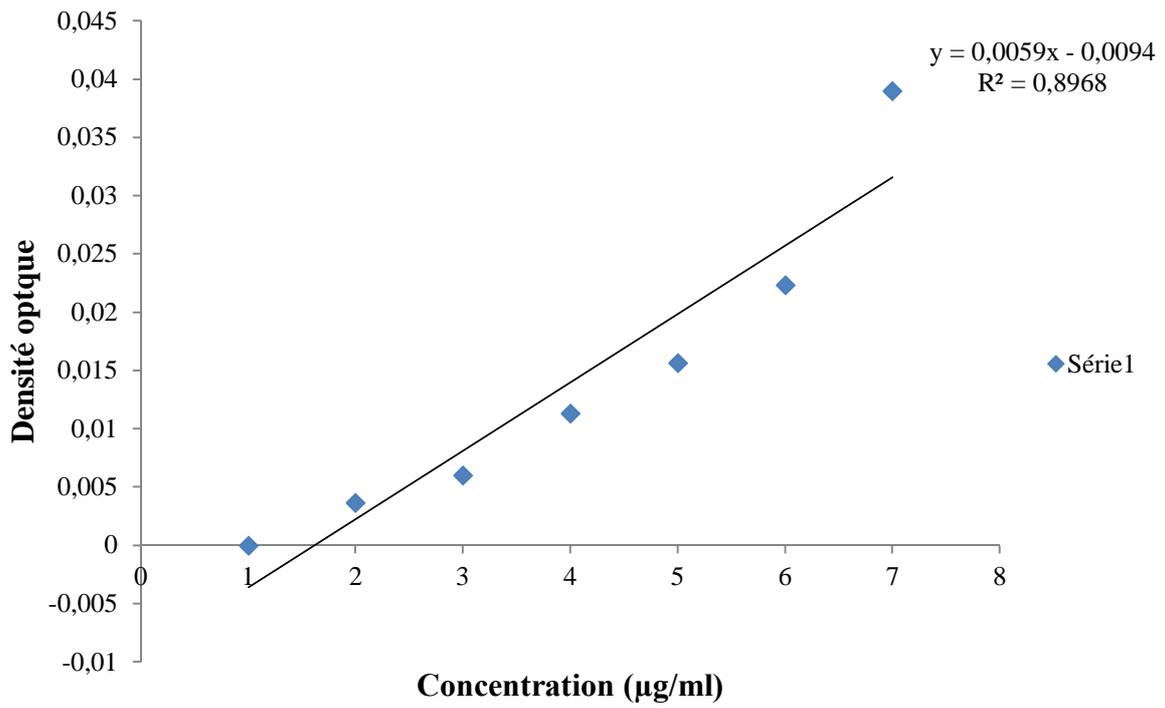


Courbe d'étalonnage des phénols totaux

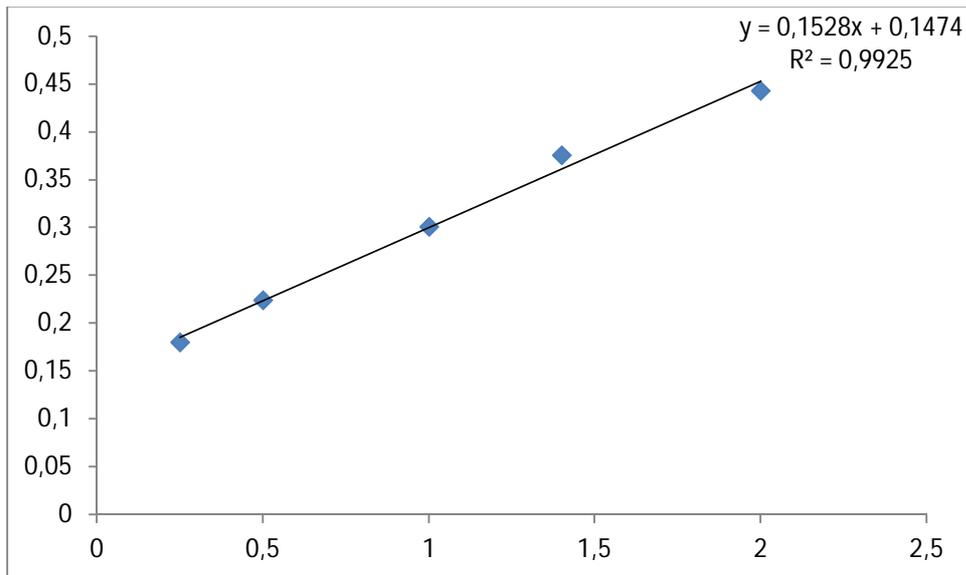


Courbe d'étalonnage des flavonols

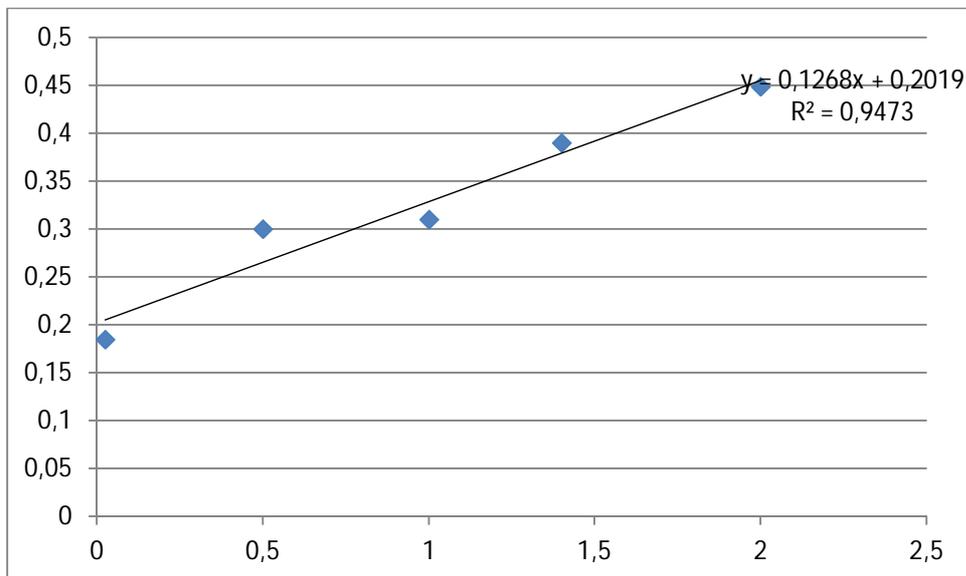




Courbe d'étalonnage Phosphomolybdate



Courbe d'étalonnage des protéines totales dans les lysats cellulaires de la lignée HL-60



Courbe d'étalonnage des protéines totales dans les lysats cellulaires de la lignée K562

Annexe 3: Préparation des réactifs pour les tests anti-prolifératifs et le western blot

1-Réactif de Sulforodamine SRB

- **Solution de Methanol 100% / 1% (vol. /vol.) acide acétique**

Pour un volume total de 500 mL, ajouter 5 mL de 1% d'acide acétique à 495 mL de méthanol 100%. Conserver à -20°C.

- **Solution de 1% (vol. /vol.) d'acide acétique**

Pour un volume total de 1 L of 1% d'acide acétique, ajouter 10 mL d'acide acétique glacial 99,7% (vol./ vol.) à 990 mL d'eau ultra pure. Conserver à température ambiante.

- **Solution de Sulforhodamine B (SRB) 0.05% (wt. /vol.) dans l'acide acétique 1%**

Ajouter 0.25g de SRB dans 500 mL l'acide acétique 1%. Dissoudre la SRB par agitation conserver à 4°C.

- **Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.2**

Pour un volume total de 500 mL, diluer 50 mL de PBS 10x dans 450 mL d'eau ultra pure ajuster le pH à 7,2 et conserver à 4°C.

2-Milieu de culture RPMI-1640 complet

Milieu essentiel: 85mL

PSGM: 4mL

L-Glutamine: 1mL

10% FBS: 10mL

Aliquoter 2mL de milieu pour le test de stérilité

- **Phosphate Buffered Saline: (PBS)**

Solution A: 0,2M NaH₂PO₄, 2H₂O

Dissoudre 5,616g of NaH₂PO₄, 2H₂O in 800ml d'eau distillée

Solution B: 0,2M Na₂HPO₄, 2H₂O

Dissoudre 32,03g 0,2M Na₂HPO₄, 2H₂O dans 900mL d'eau distillée

Mélanger 160mL de solution A et 840mL de solution B

Ajuster le pH à 7,5

Ajouter 170g de NaCl

Compléter le volume à 2000mL puis conserver à 4°C

- **10% Triton X**

Dissoudre 1mL de Triton 100 X dans 9mL d'eau distillée MilliQ

Vortexer vigoureusement, conserver à 37°C

i) Tampon de lyse SDS	
Eau distillée	:500µL
Dithiothreitol (1M)	:350µL
Phenylmethanesulfonyl fluoride (50mM)	:50µL
Fluorure de Sodium (0.5M)	:10µL
Sodium Orthovanidate (0.5M)	:10µL
Apoptinine (2mg/ml)	:10µL
Leupeptine (2mg/ml)	:10µL
Pepstatine (2mg/ml)	:10µL
Conserver à 4°C	

- **30% Acrylamide**

Dissoudre 29g acrylamide and 1g bisacrylamide dans 100mL d'eau distillée

Store at 4°C

- **Tampon Tris 1.5 M pH 8,8**

Tris HCl: 91g

Dissoudre dans 300mL d'eau distillée (milliQ)

Ajuster le pH à 8,8 (1N HCl)

Compléter le volume à 500mL, filtrer avec le papier filtre de diamètre 0,45µm et conserver à 4°C

- **10% SDS**

Dissoudre 10g de SDS dans 100mL d'eau distillée et conserver à température ambiante

i) 2X SDS Buffer (Loading dye)

Réactif	Volume
1M Tris-HCl pH 6,8	1,6mL
10% SDS	4mL
Glycérol	2mL
B-mercaptoethanol	1mL
Bromophénol	4mL
MilliQ water	1,4mL
Store at 4°C	

- **10% APS**

Dissoudre 20mg Ammonium Persulfate (APS) dans 200 μ L d'eau distillée (le persulfate d'ammonium doit être préparé au moment de l'emploi)

- **Gel de Polyacrylamide 15%**

Gel de separation (15%)		Gel de concentration (6%)	
Eau distillée	3,2ml	Eau distillée	2,6ml
30% Acrylamide	2,67ml	30% Acrylamide	1ml
1,5M Tris pH 8,8	2ml	0,5M Tris pH 6,8	1,25ml
10% SDS	80 μ L	10% SDS	50 μ L
10% APS	80 μ L	10% APS	50 μ L
TEMED	8 μ L	TEMED	5 μ L

ii) **Tampon d'électrodes**

Dissoudre les composantes suivantes dans 1L d'eau distillée

Tris (0,025M): 3,0275g

Glycine: 14,413g

SDS: 1g

Conserver à température ambiante

- **Tampon de Transfert**

Dissoudre les composantes suivantes dans 800ml d'eau distillée

Tris: 3mg

Glycine: 14.4g

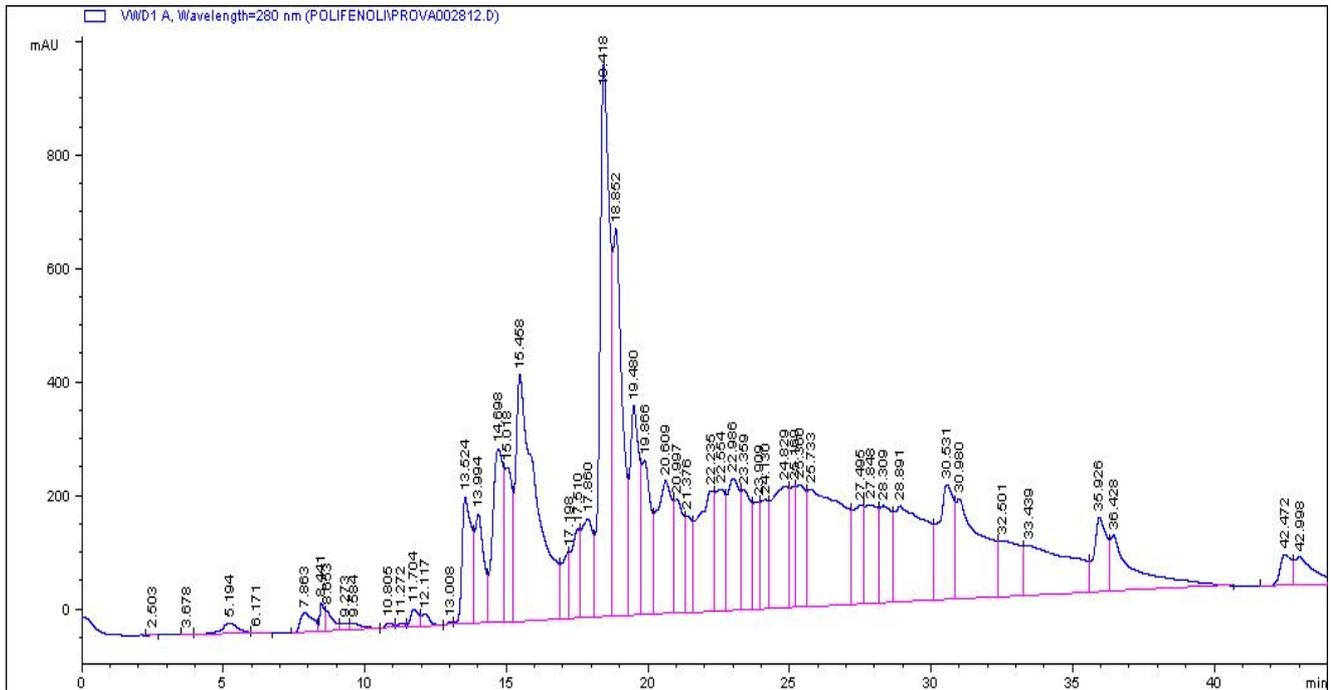
Ajouter 200mL de méthanol puis garder à 4°C

- **Colorant Trypan bleu**

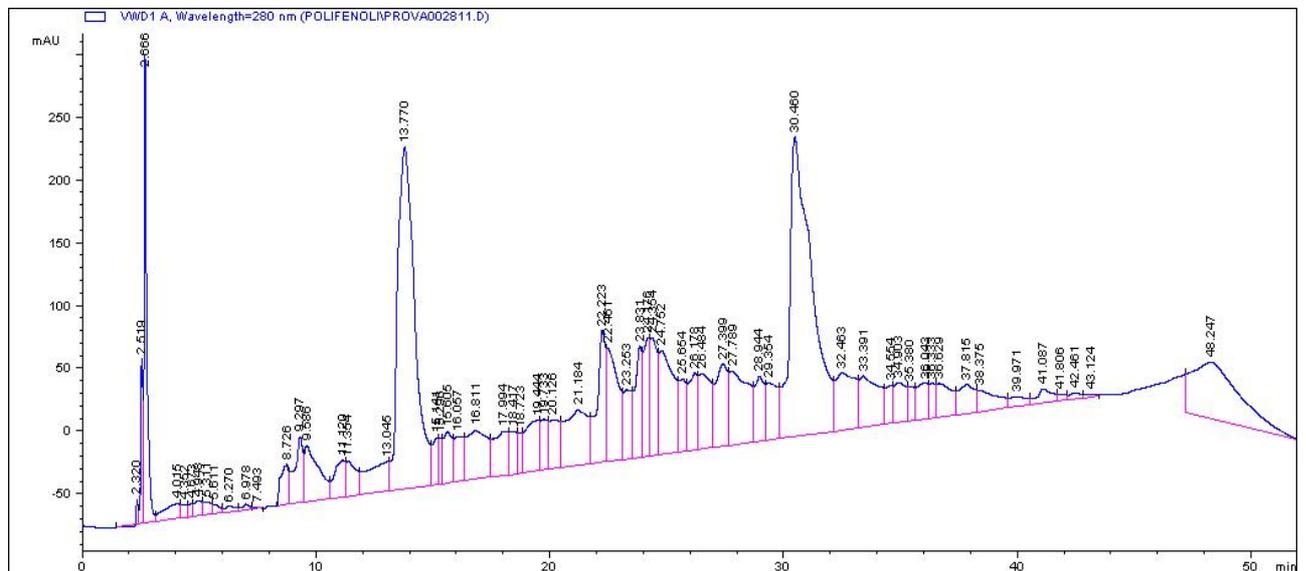
Dissoudre 0,4g de poudre de Trypan bleu dans 100mL de PBS y ajouter 1mg de thiomersal

Mélanger puis filtrer la solution avec du papier Whatmann N°1 et conserver à 4°C.

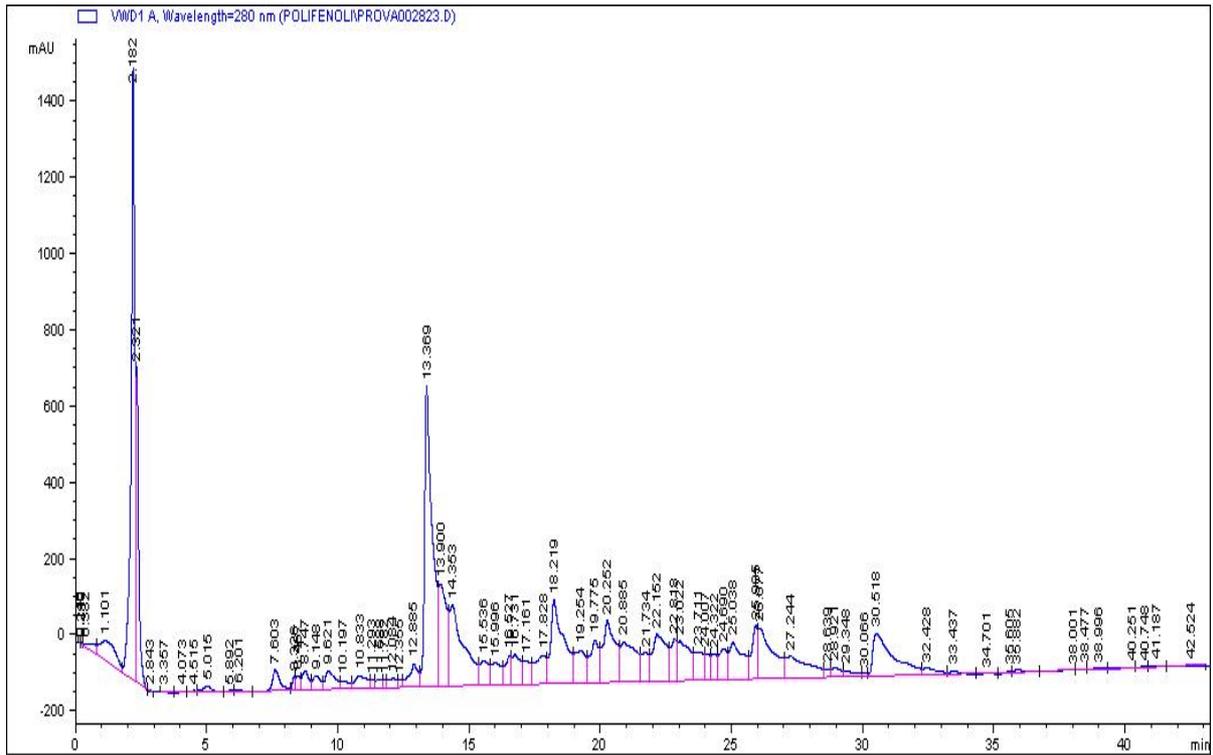
Annexe 4 : Chromatogramme de la composition phyto-chimique par HPLC des extraits bruts



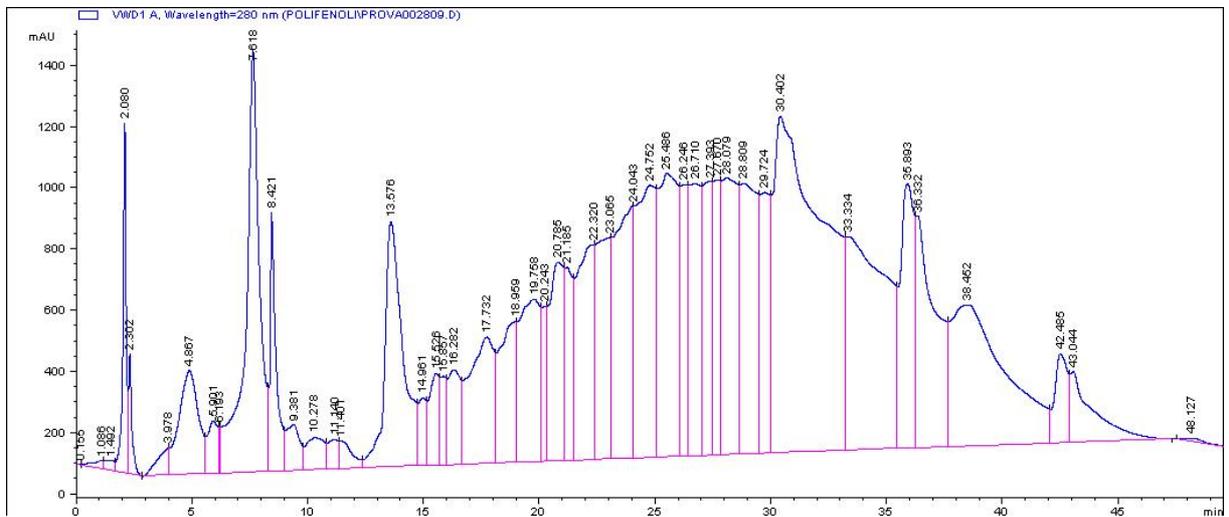
Chromatogramme de l'extrait aqueux de feuilles de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*



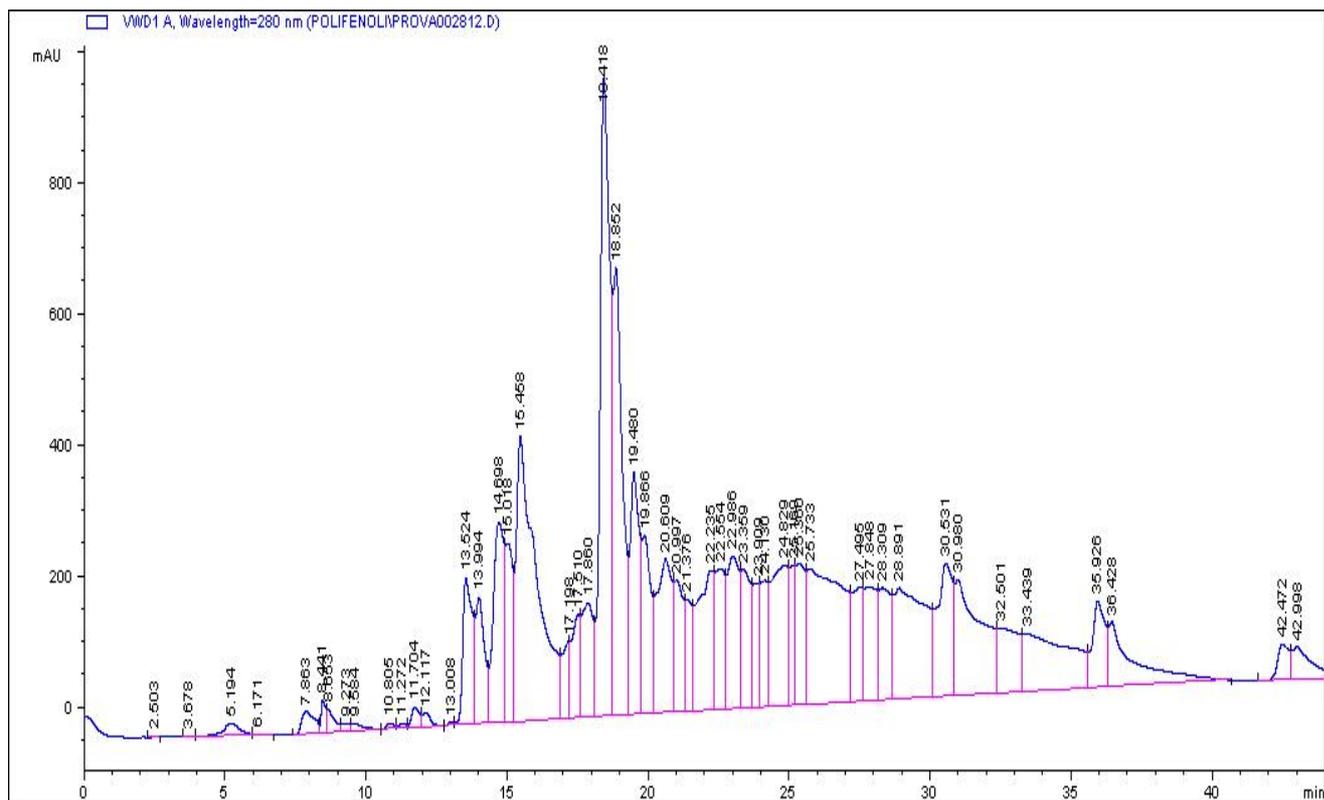
Chromatogramme de l'extrait éthanolique de feuilles de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*



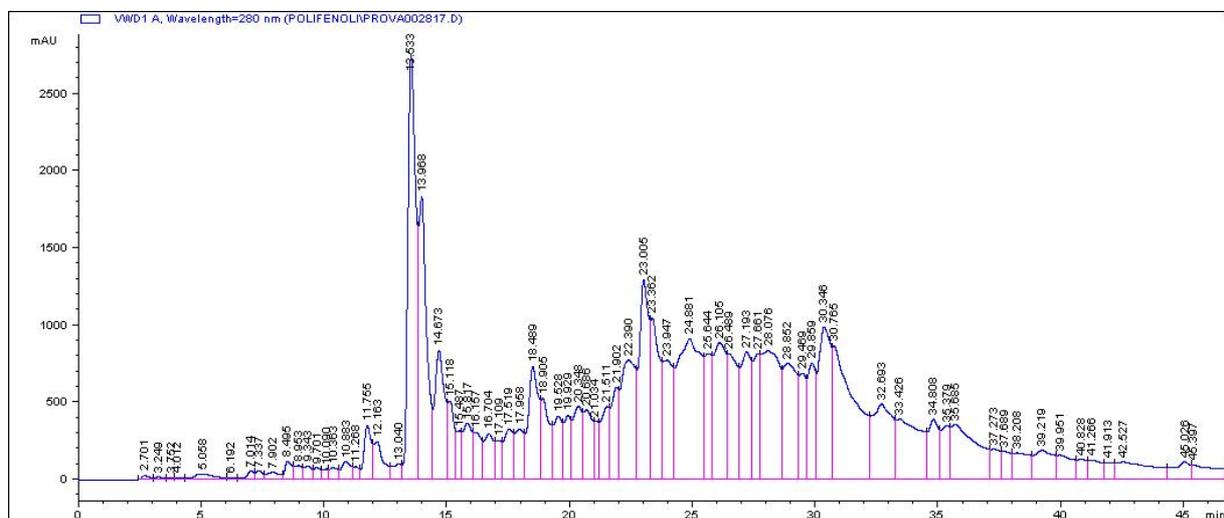
Chromatogramme de l'extrait hydro- éthanolique de feuilles de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*



Chromatogramme de l'extrait aqueux d'écorces de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*

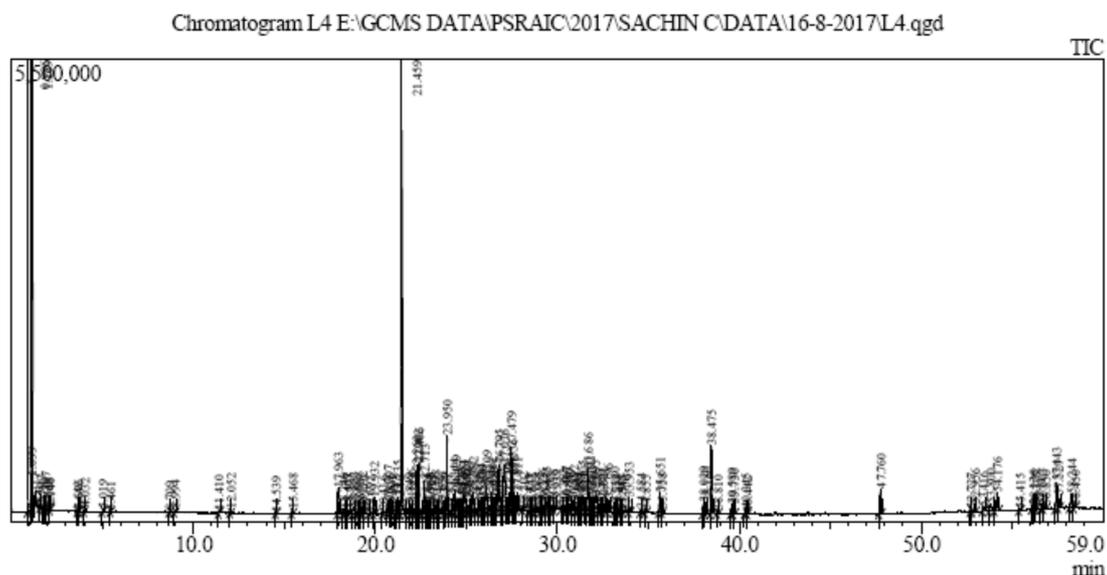


Chromatogramme de l'extrait éthanolique d'écorces de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*

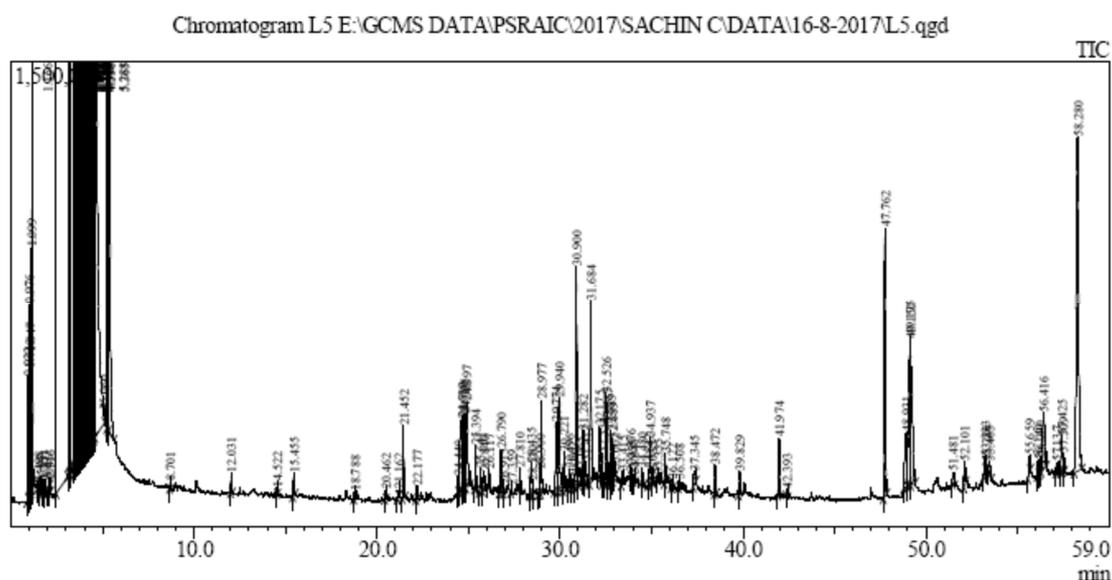


Chromatogramme de l'extrait hydro-éthanolique d'écorces de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*

Annexe 5 : Chromatogramme de la composition phyto-chimique par Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) des fractions dérivées de l'extrait éthanolique de feuilles



Chromatogramme de la fraction L₄ hex/AE 60 :40 (v : v) dérivée de l'extrait éthanolique de feuilles de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*



Chromatogramme de la fraction L₅ hex/AE 40:60 (v:v) dérivée de l'extrait éthanolique de feuilles de *Syzygium guineense* var *macrocarpum*



ARTICLES PUBLIES

RESEARCH ARTICLE

Open Access



In vitro organo-protective effect of bark extracts from *Syzygium guineense* var *macrocarpum* against ferric-nitritotriacetate-induced stress in wistar rats homogenates

Francine Nzufu Tankeu¹, Constant Anatole Pieme^{1*}, Cabral Prosper Biapa Nya², Romain Jacques Njimou³, Bruno Moukette Moukette¹, Angelo Chianese³ and Jeanne Yonkeu Ngogang¹

Abstract

Background: Overconsumption of oxygen in mammalian cells often lead to the production of reactive oxygen species (ROS) resulting from different mechanisms. Escape of scavenging enzymes/components or nutritional failure are the most important origins. Plant-derived molecules may protect biological molecules either by quenching free radicals, delaying or preventing the ROS formation or by restoring antioxidant enzymes activities. The present study assessed the antioxidant, phenolic profile and protective effect of barks extracts of *Syzygium guineense* var *macrocarpum* against ferric nitritotriacetate-induced stress in the liver, heart kidney and brain tissues of wistar rat homogenates.

Methods: Three extracts (aqueous, ethanol and aqueous-ethanol) from the barks of *S. guineense* var *macrocarpum* were used in this study. The spectrophotometric standardized methods were used to determine the free radical scavenging and antioxidant potential of the extracts. The protective properties of these plant extracts were also investigated as well as the quantification of secondary metabolites content (total phenolic, flavonoids and flavonols content). The HPLC method helped for characterizing phenolic compounds present in these extracts.

Results and Discussion: All the extracts exhibited a free radical scavenging potential in a concentration dependent manner which varied from 15.18 ± 0.80 to 97.15 ± 0.71 % depending to the type of extract and the method used. The ethanol extract had the higher phenolic content (432.85 mg QE/g extract), including total flavonoids (961.66 mg QE/g extract) and flavonols content (25.12 mg QE/g extract) and higher total antioxidant capacity. Among the phenolic compounds present in the extracts, the HPLC profile revealed the presence of syringic acid and apigenin in all the extracts. The extracts demonstrated their protective effect mostly in liver and brain homogenates by delaying or preventing lipid peroxidation, restoring enzymatic activities and enhancing glutathione levels.

Conclusion: The overall results demonstrated that the extracts exhibited significant antioxidant and protective effects in liver and brain liver homogenates.

Keywords: *Syzygium guineense* var *macrocarpum*, SOD, Peroxidase, Malondialdehyde homogenates, Glutathione

Abbreviations: ABTS, 2,2 -Azinobis(3-ethylbenzthiazoline)- 6-sulfonic acid; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical; EDTA, Ethylene diamine tetra-acetic acid; FeCl₃, Ferric chloride;
(Continued on next page)

* Correspondence: apieme@yahoo.fr

¹Department of Biochemistry and Physiological Sciences; Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, Laboratory of Biochemistry, University of Yaoundé I, PO Box 1364, Yaounde, Cameroon

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



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

FRAP, Ferric reducing antioxidant power assay; H₂O₂, Hydrogen peroxide; HCl, Hydrochloric acid; HPLC, High performance liquid chromatography; MDA, Malondialdehyde; NTA, Nitritotriacetate; PBS, Phosphate buffer saline; PCA, Principal component analysis; ROS, Reactive oxygen species; SGF H₂O/EtOH, *Syzygium guineense* var *macrocarpum* aqueous-ethanolic extract (barks); SGF EtOH, *Syzygium guineense* var *macrocarpum* ethanolic extract (barks); SGF H₂O, *Syzygium guineense* var *macrocarpum* aqueous extract (barks); SOD, Superoxide dismutase; TBA, Thiobarbituric acid; TCA, Trichloroacetic acid; UV rays, Ultraviolet rays; Vit C, Vitamin C

Background

Free radicals are produced from various physiological mechanisms owing to their significant biological roles in a myriad of signaling pathways at a reasonable dose [1, 2]. They are involved in defense mechanisms against pathogenic microorganisms and/or cancer cells and detoxification of harmful molecules [3]. Besides, reactive oxygen species (ROS) play vital roles in cells including stimulation of the signal transduction pathways, cell cycle regulation enzyme activation, and protein modification [4, 5]. In normal cells, free radicals are continuously produced in lower concentrations and can be neutralized by endogenous antioxidant species. Indeed, human body is endowed with protective mechanisms against deleterious effects of free radicals including both enzymatic and non enzymatic antioxidants [6]. However, when the naturally-occurring equilibrium between anti- and pro-oxidant agents is lost, higher ROS levels bypass the antioxidant function leading to a biochemical/physiological state described as oxidative stress [7, 8]. Oxidative stress refers to a state of imbalance between the production of free radicals and reactive metabolites and removal of the latter by antioxidants [9]. Several factors are known to be responsible of this state. Among them, tobacco, alcohol, UV rays, medications, toxic metals, herbicides, nutritional failure or genetic defects responsible of non/poor expression of a gene encoding a protein or an antioxidant enzyme protein involved in the synthesis of an antioxidant could be listed [10]. Besides those exogenous factors, there are also endogenous sources mainly intracellular metabolism involving the mitochondrial respiratory chain, the defective autophagy of mitochondria and defective metabolism of redox metals [4, 11]. Oxidative stress can cause tremendous harmful effects including alteration of the protein structures and hence loss of vital functions. Evidence has indicated that oxidative stress is a potentiating factor of the onset of a broad range of diseases [12–14]. Among these, hemolytic anemia and β -hemoglobinopathies (sickle cell anemia and thalassemia), cancer, atherosclerosis and, Alzheimer's disease are believed to be aggravated by ROS [15–17]. These deleterious effects are counteracted by natural antioxidants [18, 19].

Numerous research results demonstrated that natural antioxidant molecules are anticarcinogenic anti-angiogenic and potent inhibitors of sickle cell

haemoglobin polymerization [18, 20–22]. Phenolics-enriched plant extracts exhibited strong antioxidant and beneficial effect against chemically-induced stress in vitro [23–25] and in vivo [26, 27]. This justifies the upsurge of interest that naturally-occurring antioxidants from spices, vegetables, and herbs has been gaining [16, 23, 25, 28].

Syzygium guineense (Wild) DC. is a leafy forest tree of the Myrtaceae family, found in many parts of Africa both wild and domesticated which comprises three varieties. It is used in African traditional medicine to treat epilepsy, stomach-ache, diarrhoea, malaria, coughs, broken bones, wounds, asthma, sore throat, intercostal pain and as a tonic. The powdered bark is used as an antispasmodic and purgative [29]. The antibacterial properties of the aqueous extract of *S. guineense* have been demonstrated on different strains of bacteria responsible for diarrhea [30]. Ethanol extracts of the stem bark of *S. guineense* showed molluscicidal activities and cardioprotective properties, mainly due to the reduction of blood pressure [31]. Antibacterial activity of triterpenes isolated from *S. guineense* has been demonstrated [32]. Other biological properties such as anti-inflammatory, analgesic and immunological activities of different part of *S. guineense* have been reported [33]. The chemical composition of essential oil from *S. guineense* was also investigated [34]. A recent study demonstrated that leaves, stem bark and roots of *S. guineense* have antioxidant properties and are rich in polyphenols [23]. Almost all these biological properties are about the *guineense* variety. Up-to-date, no study investigating either the in vitro antioxidant activity or the protective effects of extracts of the *macrocarpum* variety has been carried out. Hence, this study attempted to investigate the in vitro free radical scavenging potential, antioxidant activity and the protective effect of *S. guineense* var *macrocarpum* barks extracts against ferric nitiloacetate-induced stress in the liver, heart and kidney and brain tissues of Wistar rats homogenates as well as their polyphenolic profile.

Methods

Plant material

Barks of *Syzygium guineense* var. *macrocarpum* were harvested in the surrounding islands of the Sanaga River

curve. A concentration range from 0 to 0.3 mg/mL of quercetin was prepared and allowed to determine the total polyphenol content expressed in mg equivalents of quercetin/g of extract (mg QE/g extract).

Determination of total flavonoid content

Total flavonoid content was determined using a well described method [40]. Briefly, 100 μ L of extract were added to 300 μ L of distilled water and 30 μ L of NaNO₂ (5 %). After 5 min of incubation at 25 °C, 30 μ L of AlCl₃ (10 %) were added. After further 5 min, the reaction mixture was treated with 200 μ L of 1 mM NaOH and the reaction mixture diluted to 1000 μ L with distilled water. Quercetin served to draw the standard calibration curve in the range of 0–0.3 mg/mL and the absorbance was measured at 510 nm. The results were expressed as mg quercetin equivalents/g of dried extract (mg QE/g extract).

Determination of total flavonol content

Total flavonols content in the plant extracts was determined according to the previously described technique [41] with slight modifications. In different test tubes, each extract (2000 μ L) and standard solutions (2000 μ L) were placed and then 2 % aluminum chloride (2000 μ L), 50 g/L sodium acetate (3000 μ L) were added and mixed well. The mixture was incubated at 20 °C for 2.5 h and absorbance was read at 440 nm. Total flavonols content was calculated as mg quercetin equivalent/g of extract using the equation based on the calibration curve and expressed as mg quercetin/g of dried extract (mgQE/g extract).

Determination of the polyphenolic content by HPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV detection is frequently used to separate and characterize phenolic compounds present in extracts. The polyphenolic profile was determined according to a previously described method [28]. The analysis was performed on an Agilent Technologies 1200 HPLC system fitted with a SUPELCOSIL LC-18 column (length 250 mm, diameter 4.6 mm, packaging size 5 mm). Samples were dissolved in pure water to reach the concentration (300 mg/10 mL) and centrifuged at 4706 rpm for 10 min. The obtained supernatant was filtered through a cellulose acetate membrane filter (0.20 μ m or 0.45 μ m, Schleicher & Schuell). 25 μ L of filtrate were injected into the HPLC system and eluted as described below.

The column temperature was set at 20 °C. The mobile phase consisted of a mixture of an aqueous solution of acetic acid at 0.5 % by volume ("A") and acetic nitrile ("B"). Elution was performed by following this protocol: At start and for the first 2 min of the run, 100 % of A. From 2 to 60 min after the run start, a linear composition ramp was used, targeting 40 % of A and 60 % of B.

The flow rate was set to 1 mL/min. Polyphenols were detected by a UV detector (280 nm). Beforehand, the retention times of the identified polyphenolic compounds of interest available were measured by using of single standard solutions at a concentration of 100000 mg/mL. The quantification of identified compound was based on the area under peak determined at 280 nm and expressed relative to each corresponding phenolic standard.

Evaluation of organ protective effects of plant extracts

Preparation of different tissue homogenates

Normal albino wistar rats (10) were sacrificed and the organs (liver, kidney, brain and heart) were isolated and weighed. Each homogenate was prepared by mixing 10 % (w/v) of each ground organ and phosphate buffer (pH 7, 0.1 M) followed by a centrifugation at 3000 rpm for 30 min. The study was approved by the Faculty of Medicine and Biomedical Sciences Ethical committee authorizing the use of animals.

Preparation of ferric-nitrosyltriacetate solution

The oxidizing solution was prepared according to [42] Briefly, 1.62 g and 7.64 g of FeCl₃ and NTA were dissolved in 100000 μ L of HCl 0,1 N to reach the concentrations of 200 mM and 400 mM respectively. The obtained solution was then mixed to a H₂O₂ 200 mM 1:1 (v/v) The oxidant solution was prepared immediately before utilization.

Total protein content

The total protein content of the mixture of liver was measured according to the protein kit supplier methods (Human Kit-Hu102536, Boehringer, Ingelheim, Germany). This result was used to express the activities of the different enzymes per g of organs.

In vitro lipid peroxidation assay

The capacity of the spice extract to inhibit the lipid peroxidation was evaluated according to a previously implemented method [43]. In brief, 580 μ L of phosphate buffer (0,1 M; pH 7,4), 200 μ L of spice extract and 200 μ L of each homogenate were successively introduced in different test tubes. Lipid peroxidation was then initiated by adding 20 μ L of oxidizing solution (0.1 M HCl, FeCl₃ 200 mM, 400 mM NTA, 200 mM H₂O₂) in the mixture. The whole was thereafter placed in a water bath at 37 °C for 1 h. At the end of the incubation, 100 μ L of this mixture was pipeted and placed in new tests tubes to which 1000 μ L of MDA reagent (TCA (10 %) and 1 ml of TBA (0.67 %) were added to terminate the reaction. All the tubes were then heated again at 100 °C for 20 min and transferred to an ice bath to be cooled and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The

optical density was measured at 535 nm and the concentration of MDA was calculated using the formula:

$$OD = \epsilon Cl \text{ and expressed in nM, where } \epsilon \text{ molar extinction coefficient} \\ = 1.56 \times 10^5 / \text{M/cm and } l = \text{length of the tank.}$$

Superoxide dismutase (SOD) activity assay

An indirect method of inhibiting autooxidation of epinephrine to its adrenochrome was used to assay SOD activity in plant-treated homogenates [44]. An aliquot consisting in (580 μ L PBS, 200 μ L of each extract or standard, 200 μ L of liver, kidney, kidney, heart homogenate) and 20 μ L of inducing solution was introduced in different test tubes and the obtained mixture was then incubated at 37 °C for 1 h to obtain the test solutions. The latter (test solutions) will be used to investigate the other enzymatic parameters as well as non enzymatic ones. To 20 μ L of each test solution (Fe^{3+} -NTA induced homogenates treated with plant extract or standard), 150 μ L were added to 500 μ L of carbonate buffer (pH 10.2; 0, 3 M; pKa 10.3), 250 μ L of an EDTA solution (0.6 mM); The obtained mixture was then homogenized and 150 μ L of an epinephrine solution (4.5 mM) were added to initiate the reaction. Four other tubes were run in the same conditions to serve as normal, negative and positive controls. The extract was replaced respectively by distilled water, oxidant, Vit C and quercetin.

The optical density was read after 30 min and 120 min at 480 nm. The following equation allowed the calculation of the SOD activity:

$$SOD(\text{unit}/\text{mg protein}) = SOD(\text{units}/\text{mL}/\text{min})/\text{protein}(\text{mg}/\text{mL}) \times df$$

Where df = dilution factor

The SOD activity was thereafter expressed as Unit/min/mg of protein (UI/mg Prot.)

Catalase activity

The catalase activity of plant extracts on different homogenates was assessed according to a formerly described method [45] with some amendments. The above tests solutions (100 μ L) were dispensed in test tubes containing 900 μ L phosphate buffer (0.01 M, pH 7). After homogenization the reaction was started by the addition of 400 μ L of a hydrogen peroxide solution (200 mM), and after 60 s, 2000 μ L of an acetic acid-dichromate solution were added to stop the reaction. The mixture was boiled for 10 min and the absorbance was measured at 530 nm.

Glutathione peroxidase activity

In different test tubes, 580 μ L of PBS (0.1 M; pH 7.4), 200 μ L of each plant extract or vit C and quercetin used as standards, 200 μ L of each homogenate (liver, heart,

kidney and brain) and 20 μ L oxidizing solution (HCl 0.1 M, FeCl_3 200 mM, NTA 400 mM, H_2O_2 200 mM) were introduced. The normal control, negative and positive controls were run simultaneously in the same conditions except that, the oxidizing solution was replaced respectively by distilled water for the normal control, the plant extract by the distilled water for the negative control and vit C and quercetin for the positive controls. The mixtures were thereafter incubated at 37 °C for 1 h. Then, 100 μ L of each of these mixtures were dispensed in new test tubes containing 900 μ L of PBS (0,01 M; pH 7). An aliquot of PBS 0,01 M, pH 6; pH 7 (320 μ L), hydrogen peroxide 0.05 % (160 μ L), and pyrogallol solution 0.05 % (320 μ L) were added to distilled water (210 μ L). 100 μ L from the above mixture was added thereafter. The reaction was mixed and incubated for at least 10 min and the increase in absorbance at 420 nm was measured after 20 and 140 s using a spectrophotometer.

Reduced glutathione assay

The previously described method of Ellman [46], was used to determine glutathione antioxidant capacity of plant extracts. An aliquot of PBS (580 μ L), 200 μ L of extract and 200 μ L of each homogenate (liver, kidney, brain and heart) and 20 μ L of inducing solution was introduced in different test tubes. The obtained mixture was then incubated at 37 °C for 1 h. The above test solutions (20 μ L) and 3000 μ L of Ellman reagent (phosphate buffer 0,1 M; pH 6,5; 2,2-dithio-5,5'-dibenzoic acid) were introduced in new test tubes. Glutathione concentrations were expressed in micromoles/L and calculated using the following formula:

$$OD = \epsilon Cl \text{ where } \epsilon_{\text{glutathione}} = 13600 \text{ and } l \\ = \text{optical path.}$$

Statistical analysis

The results were presented as mean \pm SD of triplicate assays. Analyses of data was conducted using one-way ANOVA (Analysis of variance) followed by Kruskal wallis test and Dunnett's multiple test (SPSS program version 18.0 for Windows, IBM Corporation, New York, NY, USA). The Log probit was used to determinate the IC_{50} . XLstat version 7 (Addinsoft, New York, NY, USA) was used to achieve the Spearman rho Correlation Analysis as well as the principal component analysis (PCA). The differences were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

A wide range of methods have been described for the free radical trapping potential and antioxidant properties of plant-derived components. DPPH is one of the most

(Centre region- Cameroon) in November 2014 and identified at the National Herbarium of Cameroon under the reference number 49885 HNC.

Preparation of plant extracts

The harvested samples were cleaned, dried at room temperature and crushed. The powdered samples obtained were soaked separately in water, 95% ethanol, and the mixture water: ethanol (30:70;v/v) at pH = 3 for 48 h respectively. The mixtures were then filtered using Buchner funnel and Whatman N° 1 filter paper, concentrated under rotary evaporator. The aqueous and water:ethanol extracts were lyophilized while the ethanol extract was dried in an oven at 50 °C to obtain the crude extracts.

The resulting crude extracts were labelled as follows: SGFH₂O: *Syzygium guineense* var *macrocarpum* aqueous extract (barks); SGFEtOH: *Syzygium guineense* var *macrocarpum* ethanolic extract (barks); SGF H₂O/EtOH: *Syzygium guineense* var *macrocarpum* aqueous-ethanolic extract (barks). The crude extracts were stored at 4 °C until use. Before assaying each parameter, a stock solution of 1 mg/mL was prepared from which serial dilutions (0.025, 0.075, 0.150, 0.200 and 0.300 mg/mL) were prepared for the determination of the free radical scavenging activity. The phenolic metabolites content and antioxidant potential of different bark extracts were determined at 1 mg/mL.

Determination of free radical scavenging and antioxidant properties

Determination of free radical scavenging activity

Scavenging activity of DPPH radical This assay measures the free radical scavenging potential of each crude extract. The method described by [35] was used. Briefly, 1000 µL of a 0.1 mM DPPH ethanolic solution was added to 3000 µL of each diluted extract or Vitamin C used as standard. After 30 min of incubation in the darkness at room temperature the absorbance was measured at 517 nm against a blank.

Scavenging effect of the ABTS⁺ radical

The radical scavenging capacity was measured by using ABTS⁺ solution radical cation. The assay was performed according to the method described by [36] with slight modifications. A stock solution of ABTS⁺ consisted of a 7.4 mM ABTS solution and 2.45 mM potassium persulfate solution in the ratio of 1:1. The mixture was allowed to react for 12 h at room temperature in the dark. A working solution was prepared by diluting 8 times the previous stock solution (20000 µL stock solution in 100000 µL volumetric flask, diluting it to the mark with ethanol) to get the absorbance of 0.7 ± 0.05 at 734 nm. After addition of 75 µL of extracts or vitamin C used as

standard to 2000 µL of ABTS⁺ working solution, absorbance was measured at 734 nm after exactly 6 min.

The % inhibition for DPPH and ABTS assay was calculated according to the formula

$$\text{Scavenging effect (\%)} = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

Where A₀ is the absorbance of the blank; A_s is the absorbance of the sample

Determination of antioxidant properties

Total antioxidant activity by Ferric Reducing Antioxidant Power assay (FRAP)

The FRAP assay was conducted following a previously described method [37] with slight modifications. The fresh FRAP reagent contained: acetate buffer (300 mM pH 3.6), 2,4, 6- Tri (2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ) (10 mM) and FeCl₃ · 6H₂O (50 mM) in a 5:1:1 proportion respectively. FRAP reagent (2000 µL) was mixed to 75 µL of each tested extract and stored for 12 min. The activity of Vitamin C was used to plot the standard curve. The absorbance was read at 593 nm and results expressed as equivalent vitamin C/g of dried extract (mg eq Vit C/g DE).

Phosphomolybdenum antioxidant assay

The total antioxidant activity of extracts was evaluated by green phosphomolybdenum complex according to the method described by [38]. Phosphomolybdenum reagent was prepared by mixing 0.6 M sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate in 1:1:1 proportions. Phosphomolybdenum reagent (1000 µL) was introduced in test tubes. After addition of 10 µL of each extract sample, the mixture was homogenized and the tubes incubated in a dry thermal bath at 95 °C for 90 min. Thereafter, tubes were cooled down and the absorbance of the mixture measured at 695 nm against a blank. The vitamin C was used as the standard and a calibration curve in the range of 0 – 0.3 mg/mL was prepared and BHT was used for the comparison. The reducing capacity of samples was expressed as mg of vitamin C equivalents/g of dried extract (mg vitC eq/g extract).

Determination of total phenol content

Total phenol content of the spice extract was determined using Folin-ciocalteu method [39]. This method is based on the reduction of phosphotungstate-phosphomolybdate reagent in alkaline medium. In different test tubes, 200 µL of 1 mg/ml of sample were introduced. Then, 800 µL of 10 fold diluted Folin reagent and 2000 µL of sodium carbonate solution (7.5 %) were added. After stirring, the mixture was kept away from light for 2 h and the absorbance was measured at 765 nm. The phenolic content was determined from a quercetin standard

used assays to assess the antioxidant potential of tremendous naturally food derived and plant extracts. Results of DPPH free radical scavenging potential of different plant extracts are summarized in Table 1A. The DPPH free radical scavenging potential increases with the plant extract concentration. Inhibitory potential expressed as percentages ranged from (59.52 ± 0.56 to 93.57 ± 1.68 %) for the aqueous extract which presented a significant and lowest inhibitory potential compared to the ethanol extract (94.40 ± 0.13 %). However, Vitamin C had the most potent inhibitory potential (98.31 ± 0.27 %). These results suggest that these extracts are rich in hydrogen atom and or electron donating-substances as phenolic derived compounds, glycosylated derived compounds and anthocyanins capable of pairing with the unstable DPPH^o radical [47].

Besides the scavenging of free radicals, group I antioxidants also quench protons to suppress their reactivity. ABTS⁺ cation scavenging potential of plant extracts was also investigated (Table 1B). Conversely to the results obtained with DPPH^o, the aqueous extract was more efficient to inhibit ABTS radical among the extracts and Vit C with a scavenging percentage of 97.15 ± 0.71 % demonstrated the highest inhibitory effects. The difference in activity found here between the different tested extracts can be due to the difference in number of hydroxyl groups present in molecules extracted by each solvent. Indeed, previous studies showed that the higher the number of free hydroxyl groups present in polyphenols, the higher their scavenging potential [48]. Moreover, the position of the hydroxyl group also influences the activity of the molecule [49, 50]. The 50 % inhibitory concentrations (IC₅₀) for the DPPH and ABTS⁺ radicals are displayed respectively in (Table 1A and B). From

these results the ethanolic extract exhibited the lowest IC₅₀ values (1.944 µg/mL and 3.871 µg/µL) both for the DPPH^o and ABTS⁺ free radical scavenging efficiency.

The chelation of transition metals such as iron is a crucial in the prevention of radical generation which damage target biomolecules. Indeed, iron acts as catalyst in the Harber-Weiss reaction to generate the highly reactive hydroxyl radical. FRAP assay was used to investigate the capacity of plant extracts to act as preventive antioxidants. Results are displayed on Table 2. All the tested samples demonstrated a preventive antioxidant potential with different capacity depending of the tested extracts. However, the aqueous extract showed the significant best ferric reducing power compared to the other samples. In addition to the ferric reducing antioxidant power, the phosphomolybdenum antioxidant capacity of plant extracts investigated to better elucidate the antioxidant mechanism demonstrated that the best antioxidant capacity was exhibited by the aqueous ethanol extract. Moreover, the antioxidant capacity of this extract was twice higher than that of Butylated HydroxyToluene (BHT) used as the standard antioxidant.

Concerning the total phenol content, the ethanolic extract presented the highest content compared to the others. The same trend was observed with flavonoids and flavonols content (Table 2). These results highlighted the close relationship between the richness of plant extracts in polyphenols and their antioxidant capacity even though the antioxidant capacity depends on the mechanism involved. This suggestion is supported by the correlation coefficients values between total phenol content and FRAP assay (0.988), FRAP and flavonoids (1.00) and flavonol content (1.00) (Tables 3 and 4). The nature of the polyphenol and its concentration significantly affect the

Table 1 Radical scavenging potential of different barks extracts of *Syzygium guineense* var *macrocarpum*

	Sample Concentration (µg/mL)	SGF H ₂ O	SGF EtOH	SGF H ₂ O/EtOH	VIT C
A	25	59.52 ± 0.56 ^c	66.27 ± 0.95 ^b	55.21 ± 1.28 ^{bc}	74.43 ± 1.79 ^a
	75	69.74 ± 0.16 ^c	78.83 ± 0.95 ^d	67.95 ± 1.36 ^c	85.83 ± 0.66 ^a
	150	79.30 ± 0.68 ^c	82.45 ± 1.25 ^c	79.84 ± 0.37 ^c	88.45 ± 0.62 ^d
	200	84.45 ± 0.61 ^a	86.24 ± 4.73 ^a	82.74 ± 0.14 ^a	93.18 ± 2.58 ^b
	300	93.57 ± 1.68 ^b	94.40 ± 0.13 ^b	88.82 ± 1.78 ^c	98.31 ± 0.27 ^d
	IC ₅₀ (µg/mL)	2.585	2.321	2.692	2.01
B	25	19.95 ± 1.61 ^d	15.18 ± 0.80 ^a	23.19 ± 0.66 ^d	24.00 ± 1.22 ^a
	75	36.47 ± 1.11 ^c	39.10 ± 0.93 ^c	26.54 ± 1.80 ^e	64.91 ± 3.46 ^b
	150	78.34 ± 0.71 ^b	53.01 ± 0.36 ^c	34.56 ± 1.94 ^e	90.81 ± 2.40 ^{cd}
	200	91.35 ± 0.15 ^c	67.56 ± 1.29 ^d	38.26 ± 0.66 ^e	91.81 ± 1.57 ^{de}
	300	97.15 ± 0.71 ^b	81.37 ± 0.94 ^c	52.63 ± 0.71 ^d	93.68 ± 1.16 ^e
	IC ₅₀ (µg/mL)	2.299	2.922	5.119	1.632

Values are expressed as mean ± SD. In the same column the values designated different letters are significantly different at $p < 0.05$

A: DPPH radical scavenging potential of different plant extracts, B: ABTS radical scavenging potential of different plant extracts

SGFH₂O/EtOH syzygium guineense var macrocarpum (barks) aqueous-ethanol, SGFETOH syzygium guineense var macrocarpum (barks) ethanolic, SGFH₂O syzygium guineense var macrocarpum (barks) aqueous, Vit C vitamin C

Table 2 Phenolic metabolites content and antioxidant potential of different barks extracts of *Syzygium guineense* var *marcarpum*

		SGFH ₂ O	SGFEtOH	SGFH ₂ O/EtOH	
Polyphenol content	Total phenol content (mg QE/g Ext.)	432.38 ± 11.41 ^a	352.85 ± 3.83 ^c	236.19 ± 3.09 ^d	
	Flavonoids (mg QE/g Ext.)	961.66 ± 7.63 ^a	716.66 ± 23.62 ^{ab}	316.66 ± 12.58 ^b	
	Flavonols (mgQE/g Ext.)	25.12 ± 5.12 ^a	18.15 ± 0.97 ^b	4.02 ± 1.04 ^c	
Antioxidant potential	Phosphomolybdenum	113.88 ± 13.36 ^a	278.88 ± 32.50 ^b	226.66 ± 38.35 ^c	BHT
	FRAP	209.13 ± 3.17 ^a	278.88 ± 5.75 ^d	141.72 ± 1.57 ^a	122.22 ± 2.5 ^a
	(Total Antioxidant Capacity)				

Values are expressed as mean ± SD. In the same column, the values designated different letters are significantly different at $p < 0.05$. SGFH₂O/EtOH syzygium guineense macrocarpum (barks) aqueous-ethanol, SGFEtOH syzygium guineense macrocarpum (barks) ethanol, SGFH₂O syzygium guineense macrocarpum (barks) aqueous, mg QE/g Ext. milligram quercetin equivalent/gram of extract

antioxidant activity of the extract. Our results from HPLC profile (Fig. 1 and Table 5) demonstrated a variety of polyphenol is different concentration which include phenolic acids (*p*-coumaric acid; syringic acid), flavonoids (catechin and caffeic acid) and other phenolic compounds.

Organoprotective effects of the extracts

Oxidation of biomolecules is currently considered as the main molecular mechanism involved in the toxicity process that lead to cell death. The iron complex of the chelating agent nitrilotriacetic acid was used to induce lipid peroxidation. Our results show that Fe³⁺-NTA led to a significant increase of lipid peroxidation associated with SOD, catalase, and glutathione peroxidase activity depletion in all tissues assayed compared to the negative control. These results are in accordance with those of [51] which showed Fe³⁺-NTA to be nephrotoxic, hepatotoxic. Indeed, Fe³⁺-NTA may act through the generation of free radicals with simultaneous decrease in antioxidant defenses.

Lipid peroxidation is commonly quantified in research studies by measuring the accumulation of the by-products that result from this process. One of these by-products is

malondialdehyde (MDA). The results of the protective effects of plant extracts against lipid peroxidation (Fig. 2) show that this property varied according to the plant extract and tissue homogenate. All the extracts lowered significantly ($p < 0.05$) the level of MDA when compared to the negative control. However, the aqueous-ethanolic extract exhibited the best protective activity by lowering 93, 13 and 6 fold respectively the MDA content in the liver, kidney and brain homogenates comparatively to the negative control. Conversely, in the heart homogenates the ethanol counterpart was the most active inhibitory effects of lipid peroxidation. These results highlight the beneficial effect of these plant extracts since lipid peroxidation is a major problem for food industry as well as for human health and it is associated to many diseases. Moreover, the inhibition of lipid peroxidation is confirmed by the restoration and potentialization of SOD, catalase, and peroxidase activities in plant-treated homogenates.

SODs are the first line of defense against oxidative stress among the highly sophisticated antioxidant system evolved by mammalian cells to cope with deleterious effects of ROS. The ability of the extracts to restore the SOD activity after oxidative stress induced are summarized in the Fig. 3. The ability of plant extracts to protect SODs is homogenate-dependent. In the liver, all the fractions exhibited a protective capacity (although not significant comparatively to the negative control). In the heart homogenate conversely, the ethanol extract was the most efficient among the tested extract whereas, the aqueous and aqueous-ethanolic counterparts restored more efficiently the enzyme activity in the brain and kidney homogenates respectively. The ability of the samples to protect the cells may be linked to their antioxidant content. Antioxidant molecules may act either as electron donors or hydrogen atom donors as pointed out by the DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals scavenging potential or by modulating the antioxidant enzymes activities. Besides the aforementioned mechanisms, metal transition chelation is not to be excluded to this process. Indeed, numerous studies [52, 53] have shown that flavonoids present in the investigated samples in a significant higher amounts are efficient iron chelators. Furthermore, they can also act as hydrogen donors and superoxide anion quenchers.

Table 3 Correlation study between variables; (1) Correlation between scavenging potential and polyphenol metabolites; (2) correlation between enzymatic antioxidant and lipid peroxidation parameter from rat organs

Variables	DPPH	ABTS	Molyb	Frap	Flavo	Pheto	Flavonol
DPPH	1						
ABTS	0.381	1					
Molyb	0.000	-0.810	1				
Frap	0.195	0.781	0.390	1			
Flavo	0.195	0.781	0.390	1.000	1		
Pheto	0.193	0.795	0.410	0.988	0.988	1	
Flavonol	0.195	0.781	0.390	1.000	1.000	0.988	1

Bivariate Spearman rho correlation. Bold values are: significant coefficient, $p = 0.05$ (bilateral test)

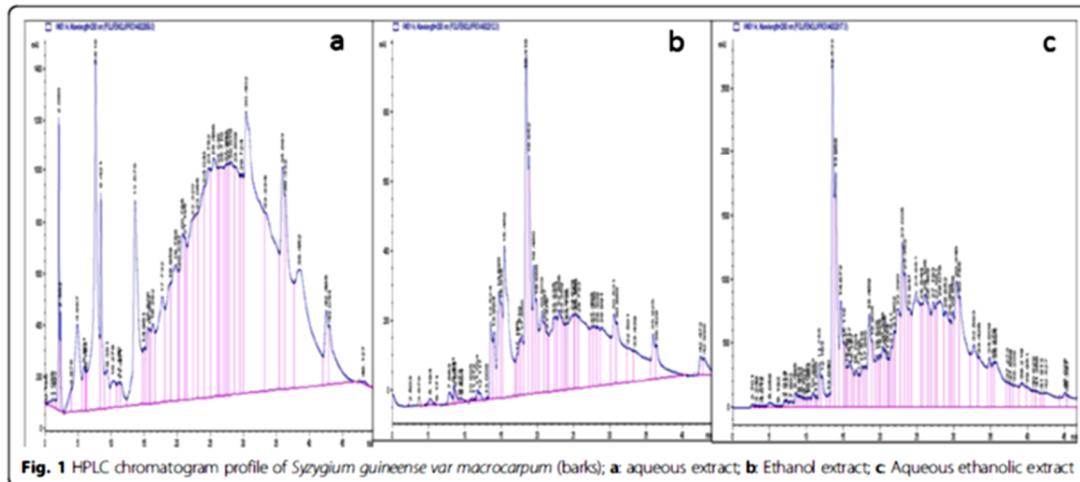
Molyb phosphomolybdenum test; Flavonols flavonol assay; Pheto polyphenol assay; Flavonoids flavonoid assay; ABTS ABTS radical scavenging test; DPPH DPPH radical scavenging test; Per peroxidase; SOD superoxide dismutase; CAT catalase; MDA malondialdehyde; GLU Glutathione; L liver; H heart; K kidney; B brain

Table 4 Correlation study between variables. Correlation between enzymatic antioxidant and lipid peroxidation parameters from rat organs

Variables	Per L	Per H	Per K	Per B	SOD L	SOD H	SOD K	SOD B	CAT L	CAT H	CAT K	CAT B	MDA L	MDAH	MDAK	MDAB	GLU L	GLU H	GLU K	GLU B	
Per L	1																				
Per H	0.321	1																			
Per K	0.321	0.071	1																		
Per B	0.107	0.107	0.643	1																	
SOD L	0.250	0.036	0.786	0.643	1																
SOD H	0.429	0.179	0.750	0.464	0.964	1															
SOD K	0.107	0.286	0.500	0.536	0.893	-0.821	1														
SOD B	0.893	0.107	0.429	0.107	0.429	0.607	-0.321	1													
CAT L	0.679	0.214	0.357	0.071	0.214	0.393	0.000	0.821	1												
CAT H	0.179	0.429	0.643	0.821	0.464	-0.250	0.429	0.179	0.286	1											
CAT K	0.607	0.286	0.250	0.214	0.143	-0.107	0.357	0.286	0.321	-0.214	1										
CAT B	0.286	0.250	0.679	0.857	0.500	-0.286	0.393	0.286	0.321	0.964	-0.143	1									
MDA L	0.396	0.360	0.342	0.450	0.000	-0.180	-0.288	-0.505	0.577	-0.324	-0.090	-0.270	1								
MDA H	0.342	0.234	0.126	0.036	0.487	-0.631	0.450	-0.595	0.649	-0.450	0.324	-0.414	0.191	1							
MDA K	0.393	0.571	0.179	0.429	0.107	-0.250	-0.071	-0.286	0.000	-0.286	-0.036	-0.214	0.631	-0.018	1						
MDA B	0.429	0.214	0.036	0.750	0.321	0.143	-0.429	-0.393	0.250	-0.429	-0.143	-0.464	0.811	-0.126	0.750	1					
GLU L	0.179	0.214	0.786	0.750	0.571	-0.393	0.429	0.143	0.250	0.929	-0.107	0.964	0.054	-0.378	0.000	-0.250	1				
GLU H	0.571	0.357	0.214	0.536	0.286	-0.143	0.143	0.643	0.536	0.357	0.214	0.571	0.288	-0.180	0.036	-0.500	0.500	1			
GLU K	0.571	0.214	0.000	0.464	0.036	0.143	0.000	0.786	0.786	0.429	0.036	0.571	0.505	-0.523	0.000	-0.464	0.464	0.893	1		
GLU B	0.500	0.143	0.357	0.536	0.107	0.071	-0.071	0.643	0.571	0.643	-0.107	0.786	0.144	-0.631	0.071	-0.250	0.750	0.821	0.857	1	

Bivariate Spearman rho correlation. Bold values are significant coefficient, $p = 0.05$ (bilateral test)

Per peroxidase, SOD superoxide dismutase, CAT catalase, MDA malonedialdehyde, GLU Glutathione, L liver, H heart, K kidney, B brain



The ability of the plant extracts to potentiate the activity of catalase was also investigated since SODs are assisted by catalase in the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen. Results demonstrated that the exposure of liver, heart, brain and kidney homogenates to Fe³⁺-NTA reduces significantly the catalase activity in the negative control (homogenate treated only by the oxidant) while the treatment with all the sample extracts reversed significantly the depletion of the catalase activity (Fig. 4) in all the homogenates except the kidney where only the aqueous-ethanolic extract was significantly efficient. The aqueous extract exhibited the best protective effect of catalase both in the liver and brain

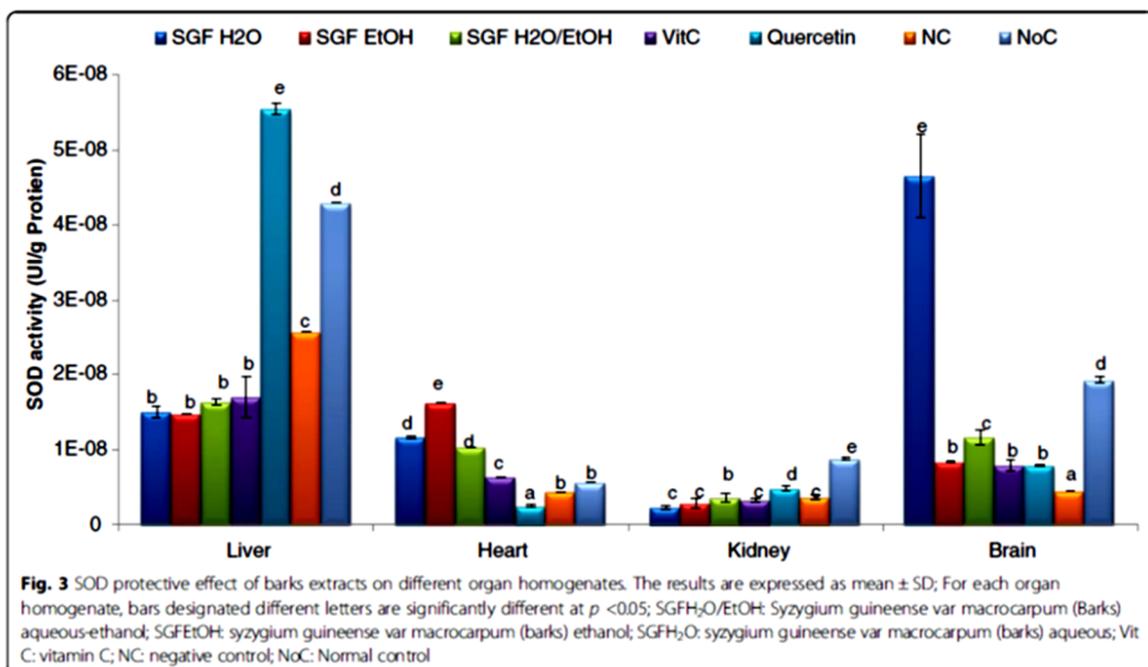
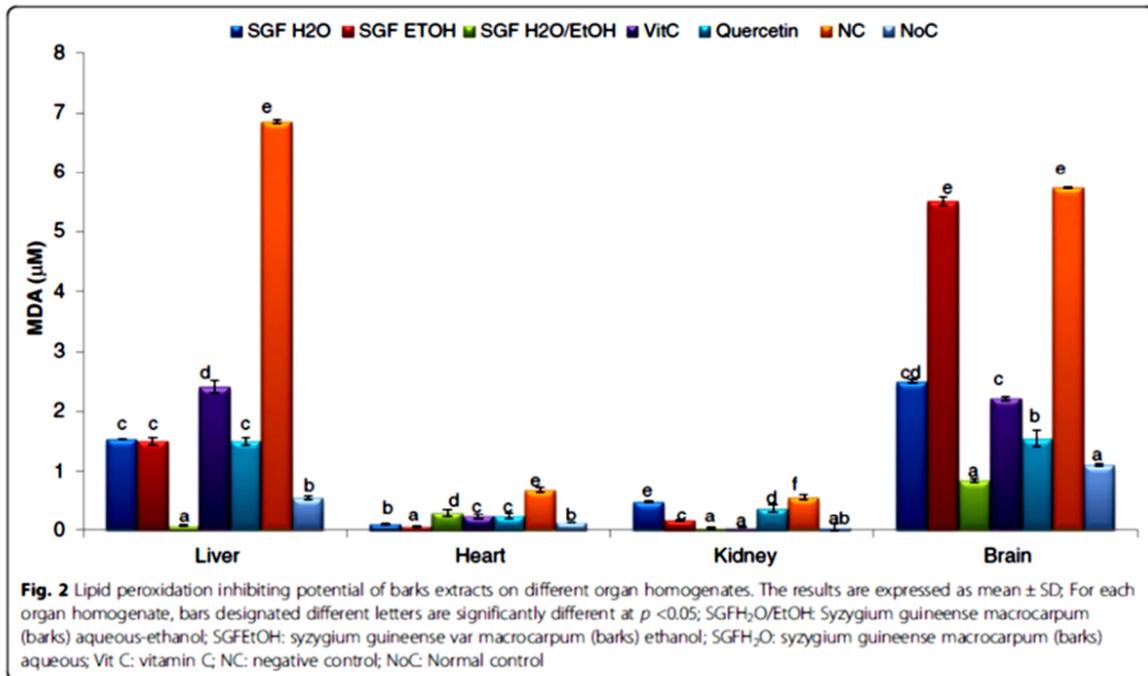
homogenates whereas the aqueous-ethanolic and ethanol counterparts potentiate more the catalase activity in the kidney and heart homogenates respectively.

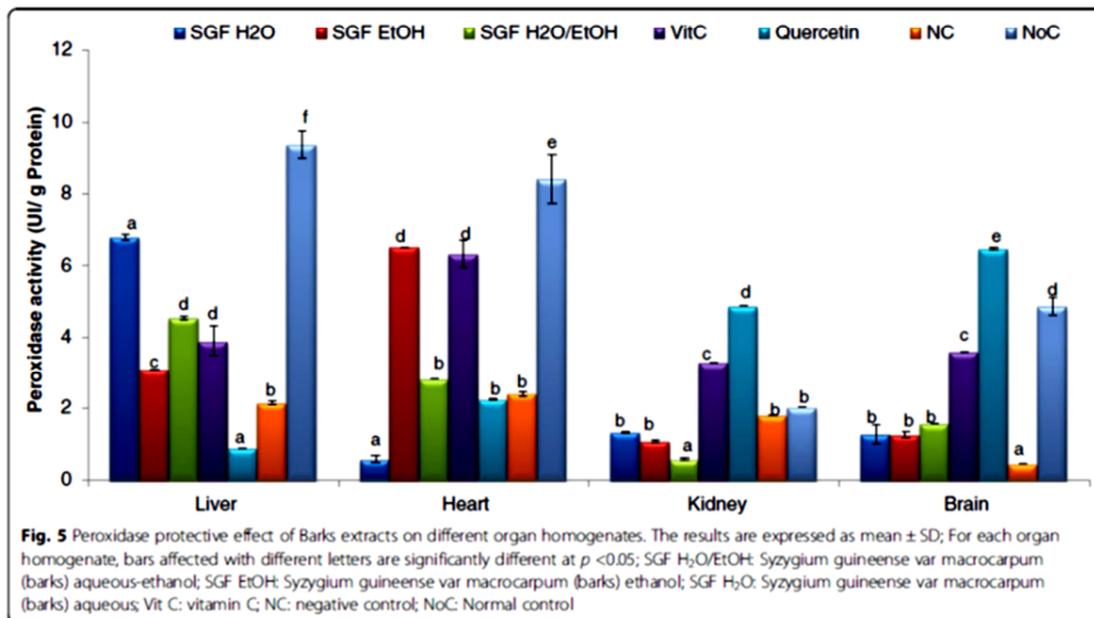
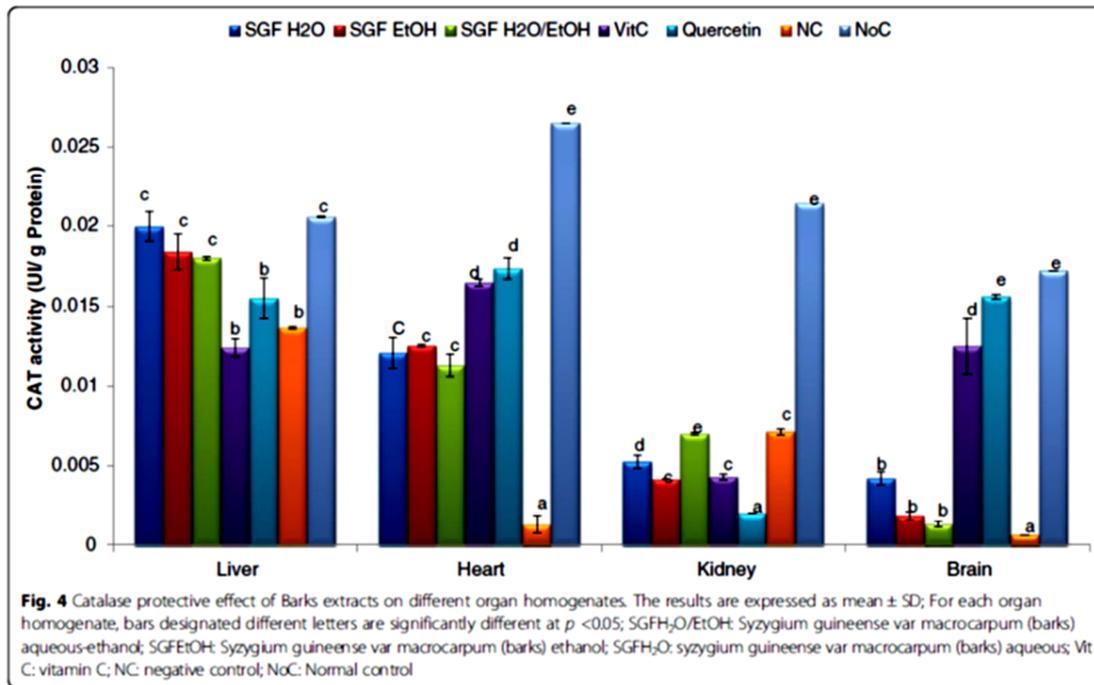
Removal of hydroperoxide which generates free radical is another way of preventing oxidation. Hydroperoxides can be reduced by enzymes such as glutathione peroxidase which cleared off the organism by eliminating organic hydroperoxide as well as hydrogen peroxide and peroxinitrites. The Fig. 5 displays the peroxidase protective potential of plant extracts against Fe³⁺ NTA-induced oxidative stress. From these results, aqueous extract was the most active sample both in the liver and kidney homogenates while the aqueous-ethanolic and

Table 5 Representation of the amounts of phenolic compounds in different bark extracts

Phenol standard characteristics	Standard retention time (min)	SGFH ₂ O		SGF _{Et} OH		SGFH ₂ O/EtOH	
		A (mUA)	Conc (mg/g DW)	A (mUA)	Conc (mg/g DW)	A (mUA)	Conc (mg/g DW)
3,4-OH benzoic acid	19.10 ± 00						
Apigenin	33.49 ± 00	822207.6	186.91	26395.9	6.00	11129.0	2.53
Caffeic acid	25.67 ± 00						
Catechin	23.48 ± 00			26496.4	1925.87		
Eugenol	29.43 ± 00						
Gallic acid	14.38 ± 00						
O-coumaric acid	25.11 ± 00						
OH-tyrosol	21.91 ± 00			12969.4	1198.09		
P-coumaric acid	30.52 ± 00					21333.2	417.71
Quercetin	42.19 ± 00						
Rutin	29.45 ± 00			12728.4	1071.65		
Syringic acid	25.55 ± 00	53931.2	1337.02	16325.6	404.73	16427.9	407.26
Tyrosol	21.77 ± 00						
Vanillic acid	25.27 ± 00						

A area of the peak, Conc concentration of the standard in milligrams/grams of dried extract, SGFH₂O/EtOH syzygium guineense var macrocarpum (Barks) aqueous-ethanol, SGF_{Et}OH Syzygium guineense var macrocarpum (barks) ethanol, SGFH₂O Syzygium guineense var macrocarpum (barks) aqueous





ethanol extracts augmented more efficiently the activity of peroxidase in the heart and brain homogenates respectively. These results further confirmed the ability of these plant extract to protect biomolecules from oxidative damage since hydroperoxides decomposed rapidly to give many secondary products such as lipid free radicals which subsequently contribute to increase the oxidation of other molecules such as proteins, nucleic acids and other lipids leading to cancer, neurodegenerative pathologies and ageing [54].

Reduced glutathione (GSH) is often considered as the body's master antioxidant since it is used as a cofactor by multiple peroxidases, transhydrogenases, and glutathione S-transferases enzymes. Figure 6 exhibits the reduced glutathione levels in different organ homogenates. The aqueous extract showed the most beneficial effect ($p < 0.05$) compared to the other samples by repleting GSH levels in all the homogenates. Furthermore, this beneficial effect is higher than that of vitamin C and quercetin used as positive controls except in the liver homogenate. This result further confirms the ability of these plant extracts to protect vital organs from deleterious effects of ROS since GSH is largely known to minimize the lipid peroxidation of cellular membranes and other such targets that are known to occur with oxidative stress [55].

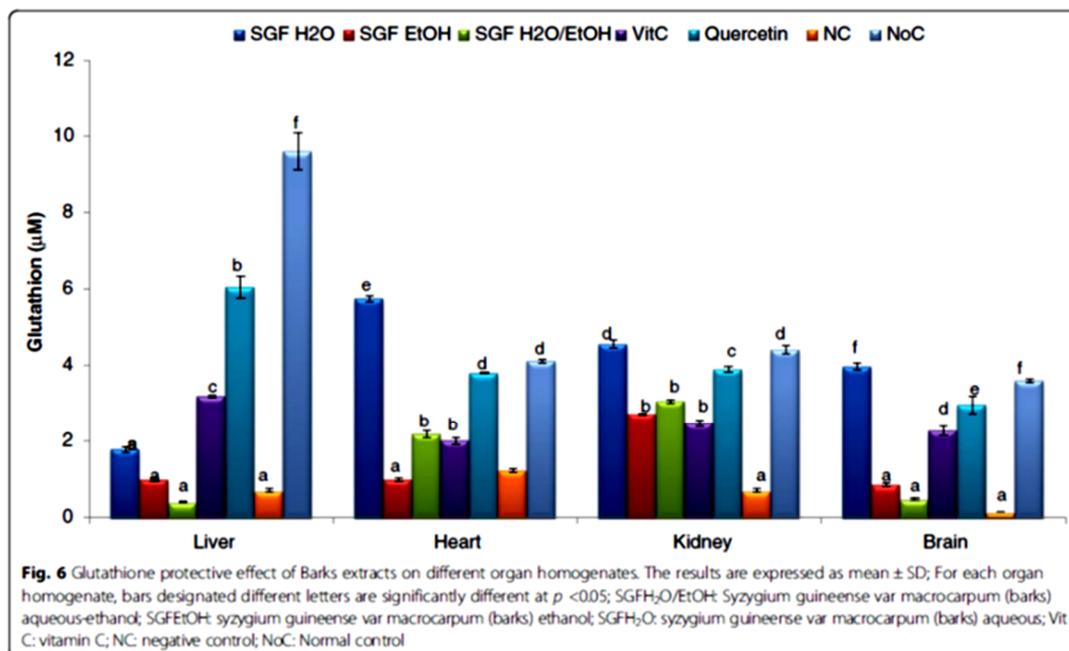
The Spearman correlation (Table 5A) studied was assessed to determine the degree of association between free radical scavenging efficacy and polyphenolic metabolites content in the one hand and between enzymatic antioxidant, lipid

peroxidation markers of different homogenates (Table 5B). In general, results showed a positive and significant correlation between ABTS and FRAP (0.781; 0.05) on one hand, and ABTS and total phenol content (0.795; 0.05), flavonols (0.781; 0.05) and flavonoid (0.781; 0.05) on the other hand (Table 5A). Few significant and positive correlation were found between some markers of protective effects of the plant extracts investigated mainly SOD and peroxidase (Table 5B).

The plurality of methods used addition to the complexity of oxidative stress and variability of results from each method, have led us to perform a principal component analysis (PCA) to better determine the best extracts purely from a statistical point of view.

From this analysis and the obtained results indicated that flavonols, total phenol content, flavonoids, and FRAP, are strongly correlated to the F_1 axis with contribution percentages of 18.917, for flavonols, flavonoids and FRAP, and 18.914 for the total phenol content whereas phosphomolybdenum, and DPPH are closely loaded to F_2 axis with 37.858 and 58.711 % contribution respectively (Fig. 7).

From the biplot (Fig. 7a') the overall antioxidant effectiveness of plant extracts taking into account all the performed assays is as follows $SGF_{EtOH}/H_2O > SGF_{H_2O} > SGF_{EtOH}$. Therefore the aqueous ethanolic extract of *S. guineense* var *macrocarpum* could be considered as the best extract regarding the antioxidant and protective effects.



2. Verbon EA, Post J, Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2012;511:1-6.
3. Rizzo A, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negrone M, Corsetto P, Berra B, Saeed N, Khan M, Shabbir M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Tonlis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:221-32.
4. Jacob-Ferreira A, Schulz R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. *Arch Biochem Biophys*. 2013;540:82-93.
5. Lo Conte M, Carroll K. The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *J Biol Chem*. 2013;288:26480-8.
6. Erica N, Plaloux V. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. *IJBMB Life*. 2012;64:72-80.
7. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leoneart M. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev*. 2013;12:376-90.
8. Areti A, Ganesh V, Naidu V, Kuma A. Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox Biol*. 2014;2:289-95.
9. Duraková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2011; 59:459-69.
10. Favier A. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. Laboratoire Lésions des acides nucléiques, Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble. 2003; 11-12: 108-115.
11. Munkacsy E, Rea S. The paradox of mitochondrial dysfunction and extended longevity. *Exp Gerontol*. 2014;56:221-33.
12. Yi-Fang C, Jie S, Xian-Hong W, Ru-Hai L. Antioxidant and proliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem*. 2002;50:6910-6.
13. Aruoma O. methodological consideration for characterizing potential antioxidant actions of bioactive compounds in plant foods. *Mutat Res*. 2003;5239-20.
14. Pabhalakar N, Kumar G, Nandurji J, Semenza G. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Anti Redox Signal*. 2007;9:1397-403.
15. Biapa N, Oben J, Ngogang J. Scavenging radical kinetic and Antianaemic Screening Properties of some Medicinal Plants used in Cameroon. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2011;4:29-35.
16. García-Neboit M, Reolo L, Hernández-Ledesma B. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:155-61.
17. Behera R, Goelb S, Dasa S, Bouzahzah B, Domannib N, Mahapatrab A, Sahoo A, Van-Valkhuberna P, Hosmanec N, Evans T, Dasa B. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Targeting with Nanotechnology. *BBJNTCT*. 2014;2:18-26.
18. Nanfack P, Biapa N, Pieme C, Moor V, Moukette B, Ngogang J. The in vitro anticikling and antioxidant effects of aqueous extracts *Zanthoxylum hertzii* on sickle cell disorder. *BMC Compl Alternat Med*. 2013;13:162.
19. Biapa P, Matei H, Bălici S, Oben J, Ngogang J. Protective effects of stem bark of *Harungana madagascariensis* on the red blood cell membrane. *BMC Compl Alternat Med*. 2013;13:1-9.
20. Imaga N, Shaite E, Ogbiede S, Akindele S. In vitro biochemical investigations of the effects of Carica papaya and Fagara zanthoxyloides on antioxidant status and sickle erythrocytes. *Afr J Biochem Res*. 2011;5:226-36.
21. Nwaogulike R, Braide W. The anticikling effects of some micronutrients and antioxidant vitamins in sickle cell disease management. *J Med Med Sci*. 2012;3:334-40.
22. Pieme C, Kumar S, Ambassa P, Suresh K, Ngameni B, Ngogang J, Bhushan S, Saxena K. Induction of mitochondrial dependent apoptosis and cell cycle arrest in human promyelocytic leukemia HL-60 cells by an extract from *Dorstenia psilurus* a spice from Cameroon. *BMC Compl Alternat Med*. 2013;13:1-9.
23. Pieme C, Ngoupayo J, Nkolou C, Moukette B, Nono B, Ama V, Minkande J, Ngogang J. *Syzygium guineense* Extracts Show Antioxidant Activities and Beneficial Activities on Oxidative Stress Induced by Ferric Chloride in the Liver Homogenate. *Antioxidants*. 2014;3:618-35.
24. Oloyede OI, Durojaiye O, Adewale OB. Prevention of Fe²⁺ induced lipid peroxidation by aqueous extract of *Garcinia kola* leaf in some rat tissues. *IPP*. 2013;1:128-32.
25. Ashraf A, Sarfraz RA, Mahmood A, Din M. Chemical composition and in vitro antioxidant and antitumor activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. leaves. *Ind Crops Prod*. 2015;74(25):241-8.
26. kotamballi N, Chidambaram G, Guddadarangawahally K, Jayaprakasha, Ravendra P. Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using in Vivo Models. *J Agric Food Chem*. 2002;50:4791-5.
27. Badmus A, Adedosu T, Adeleke G, Akinboro H, Odeyemi I, Ayoola I, Hiss C. In Vitro and In Vivo Biochemical Evaluations of the Methanolic Leaf Extract of *Garcinia kola*. *Hindawi Publishing Corporation International Scholarly Research Notices*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/391692>.
28. Moukette B, Pieme C, Biapa P, Njimou J, Moor V, Stoller M, Bravi M, Ngogang J. Phenolic content of *Hypodaphnis zenkeri* and its antioxidant effects against Fenton reactions' mediated oxidative injuries on Liver Homogenate. *Antioxidants*. 2014;3:866-89.
29. Malele R, Moshi M, Mwangi J, Achola K, Munenge R. Pharmacological properties of extracts from the stem bark of *Syzygium guineense* on the ileum and heart of laboratory rodents. *Afr J Health Sci*. 1997;4:43-5.
30. Ashebir M, Ashenafi M. Assessment of the antibacterial activity of some traditional medicinal plants on some food-borne pathogens. *Ethiopian J Health Dev*. 1999;13:211-6.
31. Oketch-Rabah HA, Dossaji SF. Molluscicides of plant origin: Molluscicidal activity of some Kenyan medicinal plants. *South Afr J Sci*. 1998;94:299-301.
32. Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacchi R, Tapondjou AL, Boud H, Lontsi D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol*. 2005;101:283-6.
33. Ior LD, Otimeryin SO, Umar M. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extract of the leaf of *Syzygium guineense* in rats and mice. *IOSR J Pharm*. 2012;2:33-6.
34. Noudogbessi JP, Yédomonhan P, Sohounloué DC, Chalchat JC, Fiquérédo G. Chemical composition of essential oil of *Syzygium guineense* (Willd.) DC. var. *guineense* (Myrtaceae) from Benin. *Rec Nat Prod*. 2008;2:33-8.
35. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol*. 2004; 26: 211-219.
36. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*. 1999;26:1231-7.
37. Benzie F, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996; 239:70-6.
38. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitative of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999;269:337-41.
39. Singleton V, Draper D. The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wine. *Am J Enol Vitic*. 1964;15:34-40.
40. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999;64:555-9.
41. Kumaran A, Karunakaran R. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India. *LWT*. 2007;40:344-52.
42. Awai M, Narasaki M, Yaniano Y, Seno S. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol*. 1979;95:663-73.
43. Iqbal M, Sharma MD, Zadeh HR, Hasan N, Abdulla M, Athar M. Glutathione metabolizing enzymes and oxidative stress in ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) mediated in hepatic injury. *Redox Rep*. 1996;2:385-91.
44. Misra H, Fridovich I. Estimation of superoxide dismutase. *J Biochem*. 1972; 247:3170-8.
45. Sinha A. Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem*. 1972;47:389-94.
46. Ellmann GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82:70-7.
47. Popovici C, Saykova I, Tytkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. 2009;4:25-39.
48. Dai J, Mumper J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer Properties. *Molecules*. 2010;15:7313-52.
49. Igor P. Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxyloides Lam. (Rutaceae). Thèse Pharmacie, Université de Bamako, Faculté de Médecine et d'Ondonto-Stomatologie. 2002. p. 133.
50. Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41:753-8.
51. Sundaram S, Kannianan GV, Kannappan P. Enzymatic and non enzymatic antioxidant activity of *Tabernaemontana divaricata* R. Br. against DEN and Fe-NTA induced renal damage in wistar albino rats. *J Appl Pharm Sci*. 2015; 5:333-7.
52. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes cultures. *Biochem Pharmacol*. 1993;45:13-9.

53. Van-Acker S, Bast A, Van der Vijgh W. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In: Rice-Evans C, Packer L, editors. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 1998. p. 221–51.
54. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. 2007;62:628–38.
55. Joerg B, Schulz L, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 2000;267:4904–11.

Francine Tankeu Nzufo¹ / Constant Anatole Pieme¹ / Jacques Romain Njimou² / Prosper Cabral Biapa Nya³ / Bruno Moukette Moukette¹ / Bravi Marco² / Chianese Angelo² / Ngogang Jeanne Yonkeu¹

Organo-protective and antioxidant properties of leaf extracts of *Syzygium guineense* var *macrocarpum* against ferric nitriloacetate-induced stress of Wistar rats

¹ Laboratory of Biochemistry, Department of Biochemistry and Physiological Sciences, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I, Yaounde, Cameroon, E-mail: apieme@yahoo.fr

² Department of Chemical Materials Environmental Engineering, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

³ Laboratory of Medicinal Plant Biochemistry, Food Science and Nutrition, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon

Abstract:

Background: The present study focused on the antioxidant, phenolic profile and free radical scavenging-mediated protective effect of leaves extracts of *Syzygium guineense* var. *macrocarpum* against ferric nitriloacetate-induced stress in the liver, heart, kidney and brain tissues of Wistar rats homogenates.

Methods: Spectrophotometric standardized methods were used to determine the free radical scavenging potential, antioxidant and protective properties of plant extracts on rat homogenates.

Results: All the extracts showed a concentration-dependent free radical quenching potential, and the ability to protect all the tested organs by inhibiting the lipid peroxidation and potentiating or restoring the activity of enzymatic and non enzymatic markers. The polyphenolic profile revealed the presence of at least one simple phenolic acid (gallic, caffeic, para-coumaric acid) although the majority (6 out of 14) of the compounds used as standard are present in the aqueous and aqueous-ethanol extracts.

Conclusions: Ethanolic extract of leaves of *S. guineense* var *macrocarpum* (SGETOH) exhibited the highest phenol content and appeared as the best extract taking into consideration the antioxidant and organo-protective activities tested.

Keywords: antioxidant, free radical, lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD), *Syzygium guineense*

DOI: 10.1515/jcim-2015-0086

Received: October 4, 2016; **Accepted:** August 20, 2016

Introduction

Oxidative stress is a biochemical/physiological state where oxidants reach fluxes that overwhelm endogenous antioxidant capacity leading to oxidation of varieties of biomacromolecules such as enzymes, lipids, proteins and DNA. Indeed, mammalian cells are subjected to a ubiquitous and continuous production of reactive oxygen species (ROS) as the main aerobic metabolism byproduct [1]. Besides, other sources of ROS have been found among which are the P₄₅₀ complex, xanthine oxidase and the nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) oxidase complexes [2]. However, the human body has evolved a highly sophisticated and complex antioxidant protection system against harmful effects of free radicals. This antioxidant system includes superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione, glutathione peroxidase, catalase which function is to modify the highly ROS to form less reactive intermediate which do not longer pose a threat to the cell [3]. Nonetheless, this natural defense mechanism can be bypassed by high levels of ROS leading to several severe health disorders such as liver, kidney, brain and cardiovascular dysfunction. Moreover, it is well established that oxidative insults to DNA can lead to mutations in crucial genes, which is involved in the initiation process of carcinogenesis. Oxidation and inflammation are also well recognized to be closely linked to the process of promotion [4-6]. Likewise, oxidative stress has been associated chronic degenerative diseases [7].

Constant Anatole Pieme is the corresponding author.
©2016 by De Gruyter.

A broad range of research data has evidenced the preventive as well as the curing effects of secondary metabolites in terms of cardiovascular, neurodegenerative diseases and cancer [7–10]. Among these, polyphenols were found to modulate the activity of a wide range of enzymes [11]. Hence, an enriched-antioxidant diet may help fighting against diseases that have their etiology and pathophysiology in oxidative stress [12].

Syzygium guineense (Wild) DC. is a leafy forest tree of the Myrtaceae family, found in many parts of Africa both wild and domesticated which comprises three varieties. It is used in African traditional medicine to treat epilepsy, stomach-ache, diarrhea, malaria, coughs, broken bones, wounds, asthma, sore throat, intercostal pain and as a tonic. The powdered bark is used as an antispasmodic, purgative [13]. The antibacterial properties of the aqueous extract of *S. guineense* have been demonstrated on different strains of bacteria responsible for diarrhea [14]. Ethanol extracts of the stem bark of *S. guineense* showed molluscicidal activities and cardioprotective properties, mainly due to the reduction of blood pressure [15]. Antibacterial activity of triterpenes isolated from *S. guineense* has been demonstrated [16]. Other biological properties such as anti-inflammatory, analgesic and immunological activities of different part of *S. guineense* have been reported [17]. The chemical composition of essential oil from *S. guineense* was also investigated [18]. A recent study demonstrated that leaves, stem bark and roots of *S. guineense* have antioxidant properties and are rich in polyphenols [11]. Almost all these biological properties are about the *guineense* variety. Up-to-date, no study investigating neither the *in vitro* antioxidant activity nor the protective effects of extracts of the *macrocarpum* variety has been carried out. Thus, this study attempted to investigate the *in vitro* free radical scavenging potential, antioxidant activity and the protective effect of *S. guineense* var. *macrocarpum* extracts against ferric nitrosoacetate-induced stress in the liver, heart and kidney and brain tissues of Wistar rats homogenates as well as their polyphenolic profile.

Materials and methods

Plant material

Leaves of *S. guineense* var. *macrocarpum* were harvested in the surrounding islands of the *Sanaga* River (Centre region – Cameroon) in November 2014 and identified at the National Herbarium of Cameroon under the reference number 49885 HNC.

Preparation of plant extracts

The harvested samples were cleaned, dried at room temperature and crushed. The powders obtained were soaked in water, 95° ethanol, and the mixture water – ethanol in the ratio 70:30 (v: v) at pH = 3 for 48 h for the aqueous, ethanolic, and aqueous-ethanol extracts respectively. The mixtures were then filtered using Buchner funnel and Whatman No 1 filter paper and lyophilized to afford crude extracts except the ethanolic extract that was dried in the oven at 50 °C. The resulting crude extracts were codified as follows: SGH₂O: *Syzygium guineense* var *macrocarpum* aqueous extract (leaves); SGETOH: *Syzygium guineense* var *macrocarpum* ethanolic extract (leaves); SGH₂O/ETOH: *Syzygium guineense* var *macrocarpum* aqueous-ethanol extract (leaves). The crude extracts were stored at 4 °C until experimentation. Before assaying each parameter, a stock solution of 1 mg/mL was prepared from which escalating concentrations (25, 75, 150, 200 and 300 µg/mL) were prepared for the determination of the free radical scavenging activity.

Determination of free radical scavenging and antioxidant properties

Determination of free radical scavenging activity

Scavenging activity of DPPH radical

This assay measures the free radical scavenging potential of the investigated extracts. The method described by [19] was used. Briefly, 1 mL of a 0.1 mM DPPH ethanolic solution was added to 3 mL of each diluted extract or vitamin C used as standard. After 30 min of incubation in the darkness at room temperature the absorbance was measured at 517 nm against a blank.

Scavenging effect of the ABTS⁺ radical

The radical scavenging capacity was measured by using ABTS⁺ solution radical cation. The assay was performed according to the method described by [20] with slight modifications. A stock solution of ABTS⁺ included a 7.4 mM ABTS solution and 2.45 mM potassium persulfate solution in the ratio of 1:1. The mixture was allowed to react for 12 h at room temperature in the dark. A working solution was prepared by diluting 8 times the previous stock solution (20 mL stock solution in 100 mL volumetric flask, diluting it to the mark with ethanol) to get the absorbance of 0.7 ± 0.05 at 734 nm. After addition of 75 μ L of extracts or vitamin C used as standard to 2 mL of ABTS⁺ working solution, absorbance was measured at 734 nm after exactly 6 min.

The % inhibition for DPPH and ABTS assay was calculated according to the formula

$$\text{Scavenging effect (\%)} = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

where A_0 is the absorbance of the blank; A_s is the absorbance of the sample

Determination of antioxidant properties**Total antioxidant activity by ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)**

The FRAP assay was conducted following a previously described method [21] with slight modifications. The fresh FRAP reagent contained: acetate buffer (300 mM pH 3.6), 2,4, 6-Tri (2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ) (10 mM) and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) in a 10:1:1 proportion respectively. 2 mL of FRAP reagent was mixed to 75 μ L of each tested extract and stored for 12 min. Vitamin C (Vit C) served to draw the standard curve. The absorbance was read at 593 nm and results expressed as mg of vitamin C equivalents/g of dried extract (mg eq Vit C/g DE).

Phosphomolybdenum antioxidant assay

The total antioxidant activity of extracts was evaluated by green phosphomolybdenum complex according to a described method [22]. Phosphomolybdenum reagent was prepared by mixing 0.6M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate in 1:1:1 proportions. 1 mL of phosphomolybdenum reagent was introduced in test tubes. After addition of 10 μ L of each extract sample, the mixture was homogenized and the tubes incubated in a dry thermal bath at 95 °C for 90 min. Thereafter, tubes were cooled down and the absorbance of the mixture measured at 695 nm against a blank. The vitamin C was used as the standard and a calibration curve in the range of 0–300 μ g/mL was prepared and BHT was used for the comparison. The reducing capacity of samples was expressed as mg of vitamin C equivalents/g of dried extract (mg eq Vit C/g DE).

Determination of total phenol content

Total phenol content of the spice extract was determined using Folin–Ciocalteu method [23]. This method is based on the reduction of phosphotungstate-phosphomolybdate reagent in alkaline medium. In different test tubes, 200 μ L of 1 mg/mL of sample were introduced. Then, 800 μ L of 10 fold diluted Folin reagent and 2 mL of sodium carbonate solution (7.5%) were added. After stirring, the mixture was kept away from light for 2 h and the absorbance was measured at 765 nm. The phenolic content was determined from a quercetin standard curve. A concentration range from 0 to 300 μ g/mL of quercetin was prepared and allowed to determine the total polyphenol content expressed in mgQE /g of dry extract.

Determination of total flavonoid content

Total flavonoid content was determined using a well described method [24]. Briefly, 100 μ L of extract was added to 300 μ L of distilled water and 30 μ L of NaNO_2 (5%). After 5 min of incubation at 25 °C, 30 μ L of AlCl_3 (10%) were added. After further 5 min, the reaction mixture was treated with 0.2 mL of 1 mM NaOH and the reaction mixture diluted to 1 mL with distilled water. Quercetin served to draw the standard calibration curve in the range of 0–300 μ g/mL and the absorbance was measured at 510 nm. The results were expressed as mg quercetin (QE)/g of dried extract.

Determination of total flavonol content

Total flavonols content in the plant extracts was accomplished according to the previously elucidated technique [25] with slight modifications. In different test tubes, each extract (2 mL) and standard solutions (2 mL) were placed and then 2% aluminum chloride (2 mL), 50 g/L sodium acetate (3 mL) were added and mixed well. The mixture was incubated at 20 °C for 2.5 h and absorbance was read at 440 nm. Total flavonols content was calculated as quercetin (mg/g) using the equation based on the calibration curve and expressed as mg quercetin (QE)/g of dried extract (QE/g dried ext).

Determination of the polyphenolic content by HPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV detection is frequently used to separate and characterize phenolic compounds present in extracts. The polyphenolic profile was determined according to a previously described method [26]. The analysis was performed on an Agilent Technologies 1200 HPLC system fitted with a SUPELCOSIL LC-18 column (length 250 mm, diameter 4.6 mm, packaging size 5 mm). Samples were dissolved in pure water according to the ratio (0.3 g/10 mL) and centrifuged at 4,706 rpm for 10 min. The supernatant was obtained after filtration through a cellulose acetate membrane filter (0.20 µm or 0.45 µm, Schleicher & Schuell). A 25 µL of filtrate was injected into the HPLC system and eluted as described below. The column temperature was set equal to 20 °C. The mobile phase consisted of a mixture of an aqueous solution of acetic acid at 0.5% by volume ("A") and acetic nitrile ("B"). Elution was performed by following this protocol:

- At start and for the first 2 min of the run, 100% of A.
- From 2 min to 60 min after the run start, a linear composition ramp was used, targeting 40% of A and 60% of B. The flow rate was set equal to 1 mL/min. Polyphenols were detected by a UV detector (280 nm). Before-hand, the retention times of the identified polyphenolic compounds of interest available were measured by using of single standard solutions at a concentration of 100 mg/L. The quantification of identified compound was based on the area under peak determined at 280 nm and expressed relative to each corresponding phenolic standard.

Evaluation of organ protective effects of plant extracts

Preparation of different tissue homogenates

Ten normal albino Wistar rats were sacrificed and the organs (liver, kidney, brain and heart) were isolated and weighed. Each homogenate was prepared by mixing 10% (w/v) of each ground organ and phosphate buffer (pH 7, 0.1 M) followed by a centrifugation at 3,000 rpm for 30 min.

Preparation of ferric-nitriloacetate solution

The oxidizing solution was prepared according to Ref. [27]. Briefly, 1.62 g and 7.64 g of FeCl₃ and nitriloacetate (NTA) were dissolved in 100 mL of HCl 0.1N to reach the concentrations of 200 mM and 400 mM respectively. The obtained solution was then mixed to a H₂O₂ 200 mM 1:1 (v:v). The oxidant solution was prepared immediately before utilization.

Total protein content The total protein content of the mixture of liver was measured according to the protein kit supplier methods (Human Kit-Hu102536, Boehringer, Ingelheim, Germany). This result was used to express the activities of the different enzymes per gram of organs. For the following experiment, negative, positive and normal controls were used.

In vitro lipid peroxidation assay The capacity of the extract to inhibit the lipid peroxidation was evaluated according to a previously implemented method [28]. In brief, 580 µL of phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4), 200 µL of spice extract and 200 µL of each homogenate were successively introduced in different test tubes. Lipid peroxidation was then initiated by adding 20 µL of oxidizing solution (0.1 M HCl, FeCl₃ 200 mm, 400 mm NTA, 200 mM H₂O₂) in the mixture. The mixture was thereafter placed in a water bath at 37 °C for 1 h. At the end of the incubation, 100 µL of this mixture was pipetted and placed in new tests tubes to which 1 mL of MDA reagent (TCA (10%) and 1 mL of TBA (0.67%)) were added to terminate the reaction. All the tubes were then heated again at 100 °C for 20 min and transferred to an ice bath to be cooled and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The optical density was measured at 535 nm and the concentration of MDA was calculated using the formula:

OD = Cl and expressed in nM: where molar extinction coefficient = 1.56×10^5 /M/cm.

Superoxide dismutase (SOD) activity assay An indirect method of inhibiting autooxidation of epinephrine to its adrenochrome was used to assay SOD activity in spice-treated homogenates [29]. An aliquot consisting of 0.58 mL PBS, 200 μ L of each extract or standard, 200 μ L of liver, kidney, kidney, heart homogenate and 20 μ L of inducing solution was introduced in different test tubes and the obtained mixture was then incubated at 37 °C for 1 h to afford the test solutions. The latter (test solutions) will be used to investigate the other enzymatic parameters as well as non-enzymatic ones. To 20 μ L of each test solution (Fe^{3+} -NTA induced homogenates treated with plant extract or standard), 150 μ L was added to 500 μ L of carbonate buffer (pH 10.2; 0, 3M), 250 μ L of an EDTA solution (0.6 mM). The obtained mixture was then homogenized and 150 μ L of an epinephrine solution (4.5 mM) were added to initiate the reaction. The extract was replaced respectively by distilled water, oxidant, vitamin C and Quercetin. The optical density was read after 30 s and 120 s at 480 nm. The following equation allowed the calculation of the SOD activity:

$$\text{SOD (unit/mg protein)} = \text{SOD (units/mL/min)} / \text{protein (mg/mL)} \times \text{df}$$

where df=dilution factor.

The SOD activity was thereafter expressed as Unit/ min/ mg of protein (UI/mg Prot.)

Catalase activity The catalase activity of plant extracts on different homogenates was assessed according to a formerly described method [30] with some amendments. A 100 μ L of the above tests solutions was dispensed in test tubes containing 900 μ L phosphate buffer (0.01 M, pH 7). After homogenization the reaction was started by the addition of 400 μ L of a hydrogen peroxide solution (200 mM), and after 60 s, 2,000 μ L of an acetic acid-dichromate solution were added to stop the reaction. The mixture was boiled for 10 min and the absorbance was measured at 530 nm.

Glutathione peroxidase activity In different test tubes, 580 μ L of PBS (0.1 M; pH 7.4) 200 μ L of each plant extract or vitamin C and Quercetin used as standards, 200 μ L of each homogenate (liver, heart, kidney and brain) and 20 μ L oxidizing solution (HCl 0.1 M, FeCl_3 200 Mm, NTA 400 Mm, H_2O_2 200 mM) were introduced. The normal, negative and positive controls were run simultaneously in the same conditions. The mixtures were thereafter incubated at 37 °C for 1 h. Then, 100 μ L of each of these mixtures were dispensed in new test tubes containing 900 μ L of PBS (0.01 M; pH 7). An aliquot (320 μ L), of phosphate buffer saline (PBS) hydrogen peroxide 0.05 % (160 μ L), and pyrogallol solution 0.05 % (320 μ L) were added to distilled water (210 μ L). 100 μ L from the above mixture was added thereafter. The reaction was mixed and incubated for at least 10 min and the increase in absorbance at 420 nm was measured after 20 and 140 s using a spectrophotometer.

Reduced glutathione assay The previously described method of Ellman [31], was used to determine glutathione antioxidant capacity of plant extracts. An aliquot of (0.58 mL) PBS, 200 μ L of extract and 200 μ L of each homogenate (liver, kidney, brain and heart) and 20 μ L of inducing solution was introduced in different test tubes. The obtained mixture was then incubated at 37 °C for 1 h. 20 μ L of the above test solutions and 3 mL of Ellman reagent (phosphate buffer 0.1 M; pH 6,5; 2,2-dithio-5,5-dibenzoic acid) were introduced in new test tubes. Glutathione concentrations were expressed in μ mol/L and calculated using the following formula:

$$\text{OD} = \text{CI where glutathione} = 13,600.$$

Ethical consideration

The study was approved by the Faculty of Medicine and Biomedical Sciences Ethical Committee authorizing the use of animals (UYI/FMSB/ECI2014/081126).

Statistical analysis

The results were presented as mean \pm SD of triplicate assays. Analyses of data was conducted using one-way ANOVA (Analysis of variance) followed by Kruskal-Wallis test and Dunnett's multiple test (SPSS program version 18.0 for Windows, IBM Corporation, New York, NY, USA). The Log probit was used to determinate the IC_{50} using the software XLstat version 7 (Addinsoft, New York, NY, USA) were used to achieve the Pearson correlation analysis (PCA). The differences were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

A wide range of methods have been described for the free radical trapping potential and antioxidant properties of plant-derived components. DPPH and ABTS are stable reference free radicals which are commercially avail-

able, stable, easy to handle and have a strong visible absorption spectrophotometer with high molar extinction coefficient and hence easily followed by simple UV/visible spectrophotometer [20, 32, 33]. Results of DPPH and ABTS free radical scavenging potential of different plant extracts are summarized in Table 1. All the extracts exhibited a DPPH[•] free radical quenching potential in a concentration dependent manner. Inhibitory potential expressed as percentages ranged from (29.61 ± 0.48 %) for the aqueous extract which presented the lowest inhibitory potential (p<0.05) to (91.69 ± 0.44 %) for the ethanol extract. However, vitamin C (98.31 ± 0.27 %) had the most potent inhibitory potential. Regarding the ABTS scavenging activity, similar results to those of DPPH scavenging potential were observed but with low value of inhibitory potential. Moreover, the ethanolic extract scavenged more efficiently the ABTS⁺ radical than vitamin C used as standard (Table 1).

Table 1: Radical scavenging potential of different leaf extracts of *Syzygium guineense var macrocarpum*.

	Sample concentration, µg/mL	SGH ₂ O	SGETOH	SGH ₂ O/ETOH	VIT C
A	25	29.61±0.48 ^a	55.56±0.51 ^{bc}	52.34±1.39 ^b	74.43±1.79 ^c
	75	51.10±1.24 ^a	60.44±1.36 ^b	61.08±0.59 ^b	85.83±0.66 ^c
	150	59.38±0.90 ^a	71.74±0.76 ^b	73.08±1.38 ^b	88.45±0.62 ^d
	200	75.67±3.46 ^a	80.14±5.21 ^a	81.48±1.66 ^a	93.18±2.58 ^b
	300	83.58±0.49 ^a	91.69±0.42 ^b	89.74±0.30 ^c	98.31±0.27 ^d
	IC ₅₀	1,932	2,676	3,097	1,825
B	25	16.62±0.12 ^a	29.23±2.07 ^b	12.63±0.27 ^c	24.00±1.22 ^a
	75	19.24±0.88 ^a	53.63±1.50 ^b	17.32±1.64 ^a	64.91±3.46 ^b
	150	23.15±0.84 ^a	75.09±0.09 ^b	23.88±1.24 ^a	90.81±2.40 ^{cde}
	200	27.58±0.43 ^a	88.25±1.48 ^b	27.60±0.95 ^a	91.81±1.57 ^{de}
	300	34.42±0.92 ^a	96.11±1.92 ^b	37.21±1.35 ^a	93.68±1.16 ^c
	IC ₅₀	2,955	3,316	8,926	3,136

Values are expressed as mean±SD. In the same column the values affected with different letters are significantly different at p<0.05. A: DPPH radical scavenging potential of different plant extracts, B: ABTS radical scavenging potential of different plant extracts. SGH₂O/ETOH, *Syzygium guineense var macrocarpum* (leaves) aqueous-ethanol; SGETOH, *Syzygium guineense var macrocarpum* (leaves) ethanolic; SGH₂O, *Syzygium guineense var macrocarpum* (leaves) aqueous.

The ability of these plant extracts to scavenge DPPH[•] radical suggest that they are rich in substances capable to donate hydrogen atom usually from hydroxyl group of phenolic derived compounds. The hydrogen atom is then transferred to the DPPH[•] radical resulting in the formation of a much stable molecule of DPPH which is responsible of the decrease of the purple/blue coloration at 517 nm [34]. Besides, DPPH[•] quenching potential could be attributed to electron donating substances as glycosylated derived compounds and anthocyanins which can pair with the unstable DPPH[•] radical [35].

Antioxidants also exert their activity by quenching a proton. ABTS⁺ cation radical was produced through the oxidation of ABTS by sodium persulfate. In presence of hydrogen-donor substances, ABTS⁺ is reduced and generate a blue/green chromophore which absorbed at a maximum of 745 nm. The difference in activity found between DPPH and ABTS according to the type of extract can be due to the difference in number of hydroxyl groups present in molecules extracted by each solvent. Indeed, previous studies showed that the higher is the number of free hydroxyl groups present in polyphenols, the higher is their scavenging potential [36]. Moreover, the position of the hydroxyl group also influences the activity of the molecule [37, 38]. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) displayed in (Table 1) demonstrated that the aqueous extract exhibited the lowest IC₅₀ values (1.93 µg/mL and 2.95 µg/mL) both for the DPPH[•] and ABTS⁺ free radical scavenging efficiency.

One of the preventive antioxidant mechanisms of plant extracts is the chelation of transition metals such as iron which acts as catalyst in the Haber-Weiss reaction to generate the highly reactive hydroxyl radical. FRAP and phosphomolybdenum assay were used to investigate the capacity of plant extracts to act as preventive antioxidant. Results are displayed on Table 2. All the tested samples demonstrated a preventive antioxidant potential. However, ethanolic extract showed the best ferric reducing power (p<0.05) compared to the other samples while the aqueous-ethanol extract exhibited the best phosphomolybdenum antioxidant activity (higher than that of BHT used for comparison) (p<0.05). Conversely, the ethanolic extract presented the highest phenol and flavonoids contents (Table 3) while the aqueous counterpart showed the highest content of flavonols.

Table 2: Phenolic metabolites content and antioxidant potential of different leaves extracts of *Syzygium guineense* var *macrocarpum*.

		SGH ₂ O	SGE ₂ OH	SGH ₂ O/E ₂ OH	BHT
Polyphenol content	Total phenol content, mg eq. QE/g Ext.	148.96±0.76 ^a	439.76±5.15 ^b	163.90±9.82 ^c	
	Flavonoids, mg eq. QE/g Ext.	1,010.00±25.00 ^{ab}	1,040.00±51.16 ^b	665.00±35.00 ^c	
	Flavonols, mg eq. QE/g Ext.	42.73±1.86 ^a	11.54±1.41 ^b	27.96±1.15 ^c	
Antioxidant potential	Phosphomolybdenum	61.66±5.2 ^a	72.77±4.2 ^{ab}	198.33±1.5 ^c	122.22±35.60 ^d
	Frap	129.56±3.10 ^{ab}	262.03±10.1 ^b	115.49±8.5 ^c	

Values are expressed as mean±SD. In the same line the values affected with different letters are significantly different at p<0.05. SGH₂O/E₂OH, *Syzygium guineense macrocarpum* (leaves) aqueous-ethanol; SGE₂OH, *Syzygium guineense macrocarpum* (leaves) ethanol; SGH₂O, *Syzygium guineense macrocarpum* (leaves) aqueous; mg eq. QE/g Ext., milligram equivalent quercetin/gram of extract.

Table 3: Correlation study between variables.

A	DPPH	ABTS	Molyb	Frap	Flavo	Phe	Flavonol
DPPH	1						
ABTS	0.762	1					
Molyb	0.395	0.156	1				
Frap	0.594	0.788	-0.390	1			
Flavo	0.000	0.390	-0.785	0.795	1		
Phe	0.802	0.946	0.217	0.793	0.393	1	
Flavonol	-0.802	-0.946	-0.217	-0.793	-0.393	-1.000	1

B	Per L	Per H	Per K	Per B	SOD L	SOD H	SOD K	SOD B	CAT L	CAT H	CAT K	CAT B	MDA L	MDA H	MDA K	MDA B	GLU L	GLU H	GLU K	GLU B
Per	1																			
L																				
Per	0.893	1																		
H																				
Per	-0.321	-0.536	1																	
K																				
Per	0.036	0.143	0.214	1																
B																				
SOD	-0.429	-0.607	0.607	0.393	1															
L																				
SOD	0.357	0.643	-0.536	-0.250	-0.929	1														
H																				
SOD	-0.214	0.143	-0.500	0.393	0.071	0.143	1													
K																				
SOD	0.393	0.286	0.607	0.500	0.321	-0.143	-0.179	1												
B																				
CAT	-0.071	0.214	-0.429	0.500	0.214	0.000	0.964	0.000	1											
L																				
CAT	-0.071	0.179	0.071	0.857	0.357	-0.071	0.714	0.464	0.786	1										
H																				

CAT	0.571	0.679	-0.0710.786	0.000	0.143	0.286	0.607	0.429	0.714	1							
K																	
CAT	0.000	0.036	0.571	0.821	0.571	-0.3210.214	0.821	0.357	0.821	0.679	1						
B																	
MDA	-0.378	-0.5590.288	-0.5770.018	-0.180	-0.649	-0.396	-0.739	-0.703	-0.631	-0.450	1						
L																	
MDA	-0.505	-0.505	-0.0540.036	0.360	-0.4320.090	-0.5230.054	-0.036	-0.180	-0.1260.555	1							
H																	
MDA	-0.857	-0.8930.214	-0.2860.571	-0.5710.143	-0.4640.071	-0.143	-0.714	-0.1790.450	0.577	1							
K																	
MDA	-0.036	-0.214	-0.179	-0.929	-0.3930.143	-0.536	-0.571	-0.643	-0.964	-0.821	-0.8930.613	-0.0180.250	1				
B																	
GLU	-0.1790.036	0.286	0.786	0.464	-0.1430.607	0.571	0.679	0.964	0.607	0.893	-0.595	-0.072	-0.036	-0.929	1		
L																	
GLU	0.000	0.250	-0.0710.821	0.286	-0.0360.786	0.393	0.857	0.964	0.679	0.714	-0.847	-0.162	-0.179	-0.8930.893	1		
H																	
GLU	0.357	0.286	0.321	0.214	0.071	0.036	-0.0360.714	0.071	0.250	0.250	0.429	-0.631	-0.901	-0.393	-0.2140.321	0.357	1
K																	
GLU	-0.0710.071	0.393	0.857	0.500	-0.2140.429	0.679	0.536	0.929	0.714	0.964	-0.505	-0.018	-0.143	-0.9640.964	0.821	0.286	1
B																	

A: correlation between scavenging potential and polyphenol metabolites; B: correlation between enzymatic antioxidant and lipid peroxidation parameters from rat organs. Molyb, phosphomolybdenum test; flavonols, flavonol assay; Phe, polyphenol assay; flavonoids, flavonoid assay; ABTS, ABTS radical scavenging test; DPPH, DPPH radical scavenging test; Per, peroxidase; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; MDA, malondialdehyde; GLU, glutathione; L, liver; H, heart; K, kidney; B, brain.

The phenolic profile (Table 4) varies according to the solvent of extraction. Meanwhile, apigenin and p-coumaric acid are found in all the three extracts but in different concentration. Six of 14 phenols used as standards are found both in the aqueous and aqueous-ethanol extracts against 4 in the ethanolic extract although the latter appeared as the richest extract with respect to the total phenol content. These results suggest that the tested extracts may contain other phenols which were not identified using these standards. This suggestion is further comforted by the presence of other peaks than those of standards on chromatograms (Figure 1).

Table 4: HPLC phenolic profile of *Syzygium guineense macrocarpum* extracts (leaves).

Phenol standard	SGH ₂ O			SGE ₂ OH		SGH ₂ O/E ₂ OH	
	Retention time, min	A, mUA	Concentration, mg/g DW	A, mUA	Concentration, mg/g DW	A, mUA	Concentration, mg/g DW
3.4-OH benzoic acid	19.10±00	6,344.17	250.25±0.00			2,514.59	99.19±0.00
Apigenin	33.49±00	11,400	2.59±0.00	10,060	2.28±0.00	330.90	0.075±0.00
Caffeic acid	25.67±00			18,200	339.56±0.00		
Catechin	23.48±00						
Eugenol	29.43±00					584.24	168.89±0.00
Gallic acid	14.38±00					8,207.63	210.34±0.00
O-coumaric acid	25.11±00			3,043.45	93.95±0.00		
OH-tyrosol	21.91±00						
P-coumaric acid	30.52±00	4,446.53	87.06±0.00	7,922.66	155.13±0.00	6,325.90	123.86±0.00
Quercetin	42.19±00	4,141.45	389.29±0.00				
Rutin	29.45±00	5,033.15	1,455.00±0.00				
Syringic acid	25.55±00						
Tyrosol	21.77±00					1,651.12	96.45±0.00
Vanillic acid	25.27±00	13,200	421.69±0.00				

SGH₂O/E₂OH, *Syzygium guineense macrocarpum*(leaves) aqueous-ethanol; SGE₂OH, *Syzygium guineense macrocarpum*(leaves) ethanol; SG H₂O, *Syzygium guineense macrocarpum*(leaves) aqueous.

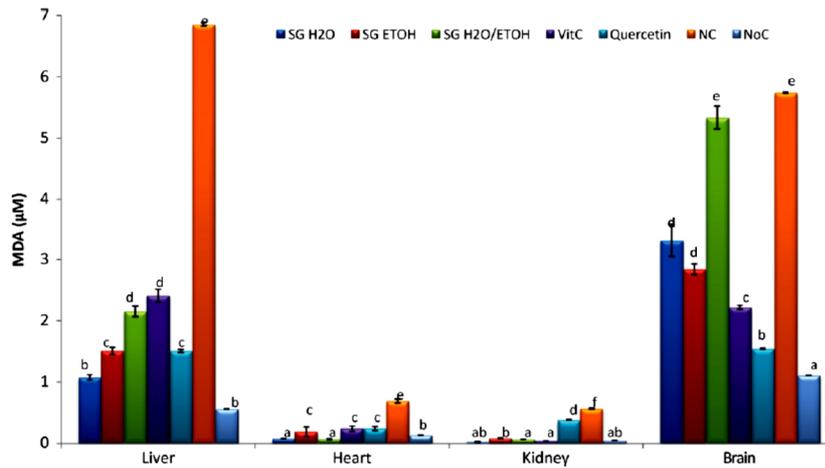


Figure 1: Lipid peroxidation inhibiting potential of leaf extracts on different organ homogenates.

Oxidation of biomolecules is currently considered as the main molecular mechanism involved in the toxicity process that lead to cell death. The iron complex of the chelating agent nitrilotriacetic acid was used to induce lipid peroxidation. Our results show that Fe³⁺-NTA led to a significant increase in lipid peroxidation (p<0.05) associated with SOD, catalase, and glutathione peroxidase activities depletion in all tissues assayed compared to the negative control. These results are in accordance with those of [39] which showed Fe³⁺-NTA to be nephrotoxic. Indeed, Fe³⁺-NTA may act through the generation of free radicals with simultaneous decrease in antioxidant defenses.

MDA is one of the stable secondary products of the free radical-mediated lipid peroxidation cascade which is widely used as a marker of lipid peroxidation. The results of the protective effect of plant extracts against lipid peroxidation (Figure 2) show that the protective effect of plant extracts varied depending on the extraction solvent and tissue homogenate. All the extracts lowered significantly (p<0.05) the amount of MDA when compared to the negative control. However, the aqueous extract exhibited the best protective activity by lowering by 6 fold and 26 fold respectively the MDA content in the liver and the kidney homogenates comparatively to the negative control. Conversely, in the heart and brain homogenates aqueous-ethanol and ethanolic counterparts were the most active ones respectively. The inhibition of lipid peroxidation is confirmed by the restoration of enzyme activities in plant treated homogenates.

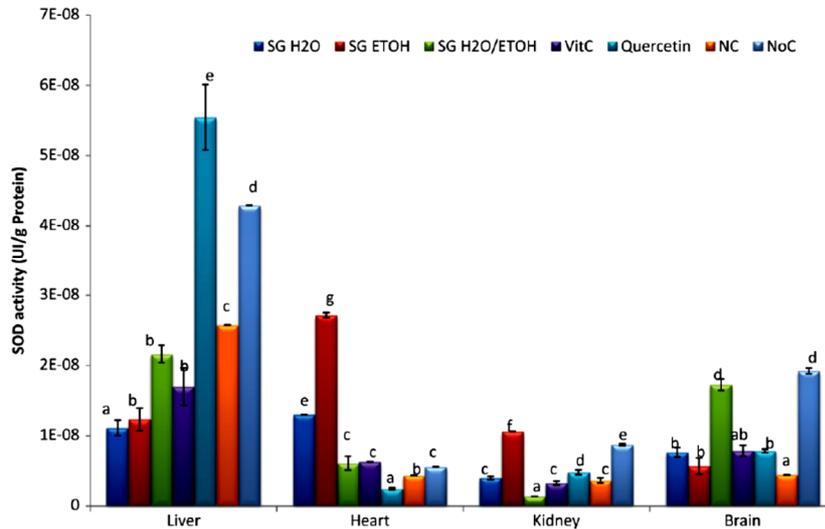


Figure 2: SOD protective effect of leaf extracts on different organ homogenates.

SODs are the first line of defense against oxidative stress among the highly sophisticated antioxidant system evolved by mammalian cells to cope with deleterious effects of ROS. The ability of the extracts to restore the SOD activity is summarized in Figure 3. All the samples restored significantly ($p < 0.05$) the activity of SOD in all the homogenates. Nonetheless, the ethanolic extract protects more efficiently the heart and the kidney (significantly higher than negative control and positive controls) while the aqueous-ethanol extract was more efficient both in the liver and the brain. However the protective activity of the latter extract remains lower than that of the normal control. The ability of the samples to protect the cells may be ascribed in part to their antioxidant and their polyphenol content. In fact this suggestion is comforted by the results of the phenolic content which revealed that the ethanolic extract has the higher level among all the tested samples. These antioxidant molecules may act either as electron donors or hydrogen atom donors as pointed out by the DPPH• and ABTS⁺ radicals scavenging potential or by modulating the antioxidant enzymes activities. Besides the aforementioned mechanisms, metal transition chelation is not to be excluded. Indeed, numerous studies [40, 41] have shown that flavonoids which are significantly present in higher level in the investigated samples demonstrated efficient iron chelators potential. In addition to their direct antioxidant effect, the extracts might also act by stimulating the cellular defenses against oxidative stress [42].

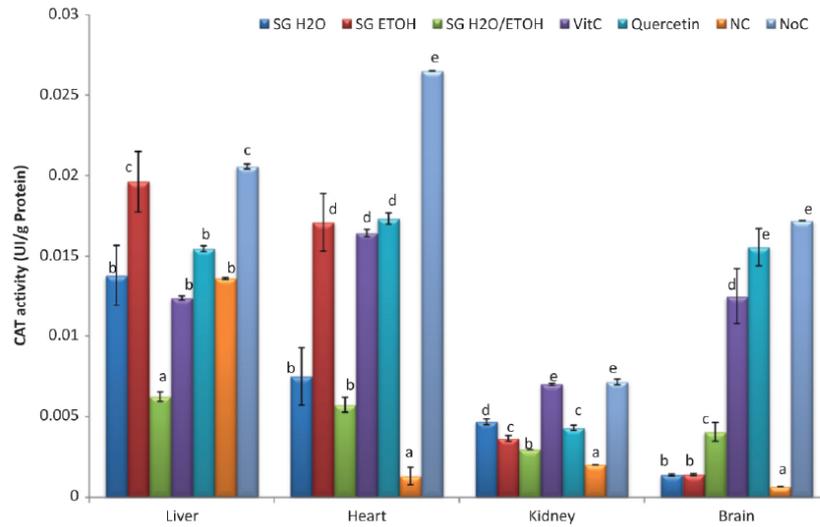
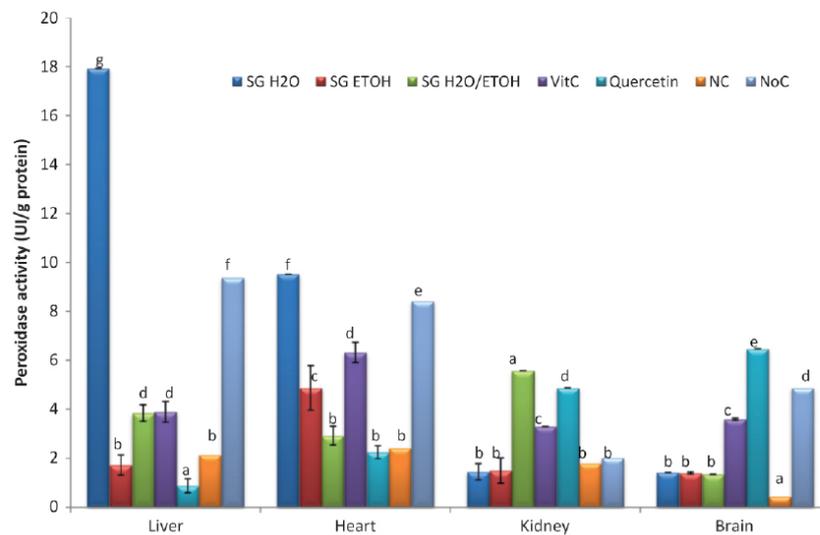


Figure 3: Catalase protective effect of leaf extracts on different organ homogenates.



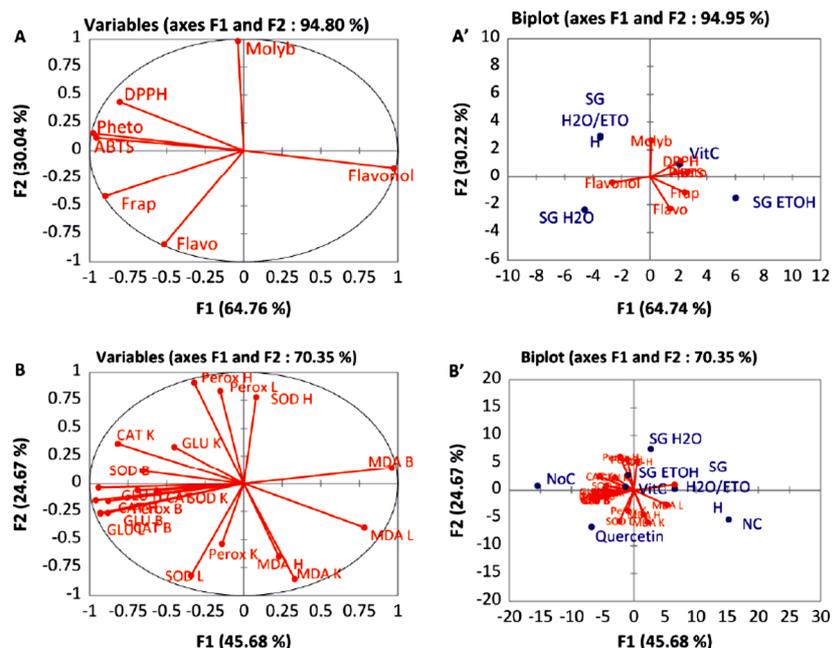


Figure 6: Degree of association between antioxidant capacity and free radical scavenging potential of different extracts A and A': distribution of the tests, projection of the extracts and tests around the F1 and F2 axis; B and B': distribution of the tests (from organs), projection of the extracts and tests (from organs) around the F1 and F2 axis. Molyb: Phosphomolybdenum test; Flavonols: Flavonol assay; Pheto: Polyphenol assay; Flavonoids: Flavonoid assay; ABTS: ABTS radical scavenging test; DPPH: DPPH radical scavenging test. SG H2O/ETO: Syzygium guineense macrocarpum aqueous-ethanol; SG ETOH: syzygium guineense macrocarpum ethanol; SG H2O: Syzygium guineense macrocarpum aqueous; Vit C: vitamin C; NC: negative control; NoC: Normal control. Per: peroxidase; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; MDA: malonaldehyde; GLU: Glutathione; L: liver; H: heart; K: kidney; B: brain

Glutathione (GSH) is often referred to as the body's master antioxidant and is used as a cofactor by multiple enzymes. Figure 6 exhibits the reduced glutathione levels in different organ homogenates. From this figure we can notice that the ability of plant extracts to revert back the glutathione level varies according to the organ homogenate. In the liver, heart and brain homogenates, the ethanolic extract showed the significant ($p < 0.05$) beneficial effect compared to the other samples. Furthermore, this beneficial effect is higher than that of vitamin C except in the brain homogenate. Conversely, the aqueous-ethanol extract restored better the GSH content in kidney homogenate. These results further confirm the ability of these plant extracts to protect vital organs from deleterious effects of ROS since GSH detoxifies peroxides generated from oxygen radical attack on biological molecules, reduces oxidized centers on DNA, proteins, and other biomolecules [44]. Nonetheless, the antioxidant capacity is not the only likely mechanism. Indeed, recent studies have shown that functional and biological activities of plant compounds are related to the modulation of several cellular and molecular processes and pathways including metabolism, survival, proliferation and apoptosis [45]. The spearman correlation (Table 3) studied to determine the degree of association between free radical scavenging potential and polyphenolic metabolites content (Table 3) and between enzymatic antioxidant and lipid peroxidation markers in different homogenates (Table 3) showed in general a positive and significant correlation between DPPH and ABTS (0.762) on one hand, and total phenol content FRAP (0.802), ABTS (0.946) and flavonoid (0.793) on the other hand.

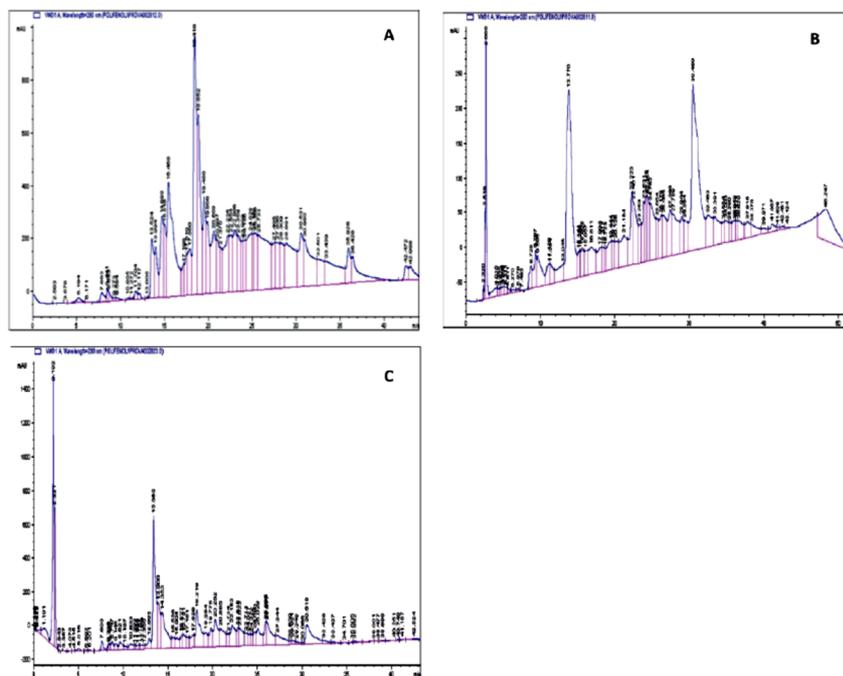


Figure 7: Chromatogram of extract from *syzygium guineense* var *macrocarpum*; (A) aqueous extract; (B) ethanolic extract; (C) aqueous ethanol extract.

Since several methods were used to assess the antioxidant potential of plant extracts and given the difference in activity of each extract with respect to a specific radical or method, data were subjected to principal component analysis (PCA) (Figure 7) to easily discriminate the best extract among all from a statistical point of view. From the obtained results, flavonols, total phenol content, ABTS, FRAP and DPPH, are strongly correlated to the F_1 axis with contribution percentages of 20.983, for flavonols and total phenol content, and 20.100, 17.773 and 14.259 respectively whereas phosphomolybdenum, and flavonoids are closely loaded to F_2 axis with 45.900 and 33.912 % respectively. From the biplot (Figure 7) the overall antioxidant effectiveness of plant extracts taking into account all the performed assays ranked as follows SGETOH>SGH₂O>SGETOH/H₂O

Conclusions

All the extracts showed a concentration-dependent free radical quenching potential, and the ability to protect all the tested organs by inhibiting the lipid peroxidation and potentiating or restoring the activity of enzymatic end non enzymatic markers of oxidative stress. The polyphenolic profile revealed the presence of at least one simple phenolic acid (gallic, caffeic, para-coumaric acid) although the majority (6 out of 14) of the compounds used as standard are present in the aqueous and aqueous-ethanol extracts. However, further studies need to be carried out to identify the active molecules and their mechanism of action.

Acknowledgement

We are grateful to Mr. Ngansop Eric from the Cameroon National Herbarium who harvested and identified the plant material.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission. FTN conducted the study assisted by MMB; BNPC conducted the statistical analysis and PCA helped in building and correcting the manuscript, PCA designed the research co-directed the research work with NYJ and provided reagents. NJR carried the HPLC of the extracts under the supervision of AC and MB.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404:787–790.
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leonart M. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev*. 2013;12:376–390.
- Al-Omar MA, Beedham C, Alsarra IA. Pathological roles of reactive oxygen species and their defense mechanisms. *Saudi Pharm J*. 2004;12:1–17.
- Reuter S, Gupta SC, Madan MC, Bharat BA. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1603–1616.
- Seifried DE, Anderson EI, Fisher JA, Milner A. Review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18:567–579.
- Strayo D, Adhikari S, Tilak-Jain J, Menon VP, Devasagayam TP. Antioxidant activity of an aminothiazole compound: possible mechanisms. *Chem Biol Interact*. 2008;173:215–223.
- Cole GM, Lim GP, Yang F, Teter B, Begum A, Ma Q, et al. Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiol Aging*. 2005;26:133–136.
- Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze K, Poulsen L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49:159–174.
- Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:317S–325S.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer*. 1994;22:175–184.
- Pieme CA, Ngoupayo J, Nkoulou CH, Moukette B, Nono BL, Ama Moor VJ, et al. Syzygium guineense extracts show antioxidant activities and beneficial activities on oxidative stress induced by ferric chloride in the liver homogenate. *Antioxidants*. 2014;3:618–635.
- Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage. Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*. 2008;591:66–72.
- Malele R, Moshi M, Mwangi J, Achola K, Munenge R. Pharmacological properties of extracts from the stem bark of Syzygium guineense on the ileum and heart of laboratory rodents. *Afr J Health Sci*. 1997;4:43–45.
- Ashebir M, Ashenafi M. Assessment of the antibacterial activity of some traditional medicinal plants on some food-borne pathogens. *Ethiop J Health Dev*. 1999;13:211–216.
- Oketch-Rabah HA, Dossaji SF. Molluscicides of plant origin: molluscicidal activity of some Kenyan medicinal plants. *South Afr J Sci*. 1998;94:299–301.
- Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacchi R, Tapondjou AL, Boud H, Lontsi D. Antibacterial triterpenes from Syzygium guineense (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol*. 2005;101:283–286.
- Ior LD, Otimenyin SO, Umar M. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extract of the leaf of Syzygium guineense in rats and mice. *IOSR J Pharm*. 2012;2:33–36.
- Noudogbessi JP, Yédomonhan P, Sohounhloué DC, Chalchat JC, Figuéredo G. Chemical composition of essential oil of Syzygium guineense (Willd.) DC. var. guineense (Myrtaceae) from Benin. *Rec Nat Prod*. 2008;2:33–38.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sonklanokarin. J Sci Tech*. 2004;26.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1231–1237.
- Benzie F, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70–76.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitative of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999;269:337–341.
- Singleton V, Draper D. The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wine. *Am J Enol Vitic*. 1964;15:34–40.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999;64:555–559.
- Kumaran A, Karunakaran R. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of Phyllanthus species from India. *Lebensm Wiss Technol*. 2007;40:344–352.
- Moukette B, Pieme C, Biapa P, Njimou J, Moor V, Stoller M, et al. Phenolic content of Hypodaphnis zenkeri and its antioxidant effects against Fenton reactions' mediated oxidative injuries on liver homogenate. *Antioxidants*. 2014;3:866–889.
- Awai M, Narasaki M, Yanianoi Y, Seno S. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol*. 1979;95:663–673.

28. Igbal M, Sharma MD, Zadeh HR, Hasan N, Abdulla M, Athar M. Glutathione metabolizing enzymes and oxidative stress in ferric nitriloacetate (Fe-NTA) mediated in hepatic injury. *Redox rep.* 1996;2:385–391.
29. Misra H, Fridovich I. Estimation of superoxide dismutase. *J Biochem.* 1972;247:3170–3178.
30. Sinha A. Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem.* 1972;47:389–394.
31. Ellmann GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–77.
32. Butkovic V, Klasinc L, Bors W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *J Agric Food Chem.* 2004;52:2816–2820.
33. Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993;84:407–412.
34. Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem.* 2005;53:1841–1856.
35. Popovici C, Saykova Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev Génie Ind.* 2009;4:25–39.
36. Dai J, Mumper J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer. *Properties Mol.* 2010;15:7313–7352.
37. Bossokpi IP. Etudes des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). Bamako: Université de Bamako; 2002:133.
38. Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:753–758.
39. Sundaram S, Kannappan CV, Kannappan P. Enzymatic and non enzymatic antioxidant activity of *Tabernaemontana divaricata* R. Br. against DEN and Fe-NTA induced renal damage in Wistar albino rats. *J Appl Pharm Sci.* 2015;5:033–037.
40. Moreli Lescoat C, Cogrel P, et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes cultures. *Biochem Pharmacol.* 1993;45:13–19.
41. Van Acker S, Bast A, Van Der Vijgh W. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In: Rice-Evans C, Packer L, editors. *Flavonoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker; 1998:221–251.
42. Costa L, Garrick J, Roquè P, Pellacani C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2986796. DOI:10.1155/2016/2986796.
43. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Rev Med Liege.* 2007;62:628–638.
44. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000;267:4904–4911.
45. Forbes-Hernandez TY, Gasparriani M, Afrin S, Bompadre S, Mezzetti B, Quiles JL, et al. The healthy effects of strawberry polyphenols: which strategy behind antioxidant capacity? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;56:S46–S59.

ARTICLES EN COURS DE REDACTION :

- Fractions isolated from ethanolic extract of leaves of *Syzygium guineense* inhibit myeloid leukemia cell lines *in vitro* and tumor growth on acute myeloid xenografts via G2/M phase arrest and intrinsic apoptotic pathway triggering.



Research Paper

Extracts from *Syzygium guineense* inhibit cervical cancer cells proliferation through cell cycle arrest and triggering apoptosis

Accepted 3rd January, 2019

ABSTRACT

Tankeu Nzufo Francine^{1,2,4*}, Pieme Constant Anatole¹, Jyoti Kode^{2,3}, Trupti Pradhan⁴, Lenta Ndjakou Bruno⁵, Ngogang Yonkeu Jeanne^{3,4} and Shubhada Chiplunkar^{3,4}

¹Laboratory of Biochemistry, Department of Biochemistry and Physiological Sciences; Faculty of Medicine and Biomedical Science, University of Yaoundé I, P. O. Box 1364, Yaoundé, Cameroon.

²Anti-Cancer Drug Screening Facility (ACDSF); Advanced Centre for Treatment, Research and Education in Cancer; Tata Memorial Centre, Navi Mumbai 410210-India.

³Homi Bhabha National Institute (HBNI), Training School Complex, Anushakti Nagar, Mumbai 400085, India.

⁴Laboratory of Immunology; Advanced Centre for Treatment Research and Education in Cancer; Tata Memorial Centre, Navi Mumbai 410210-India.

⁵Department of Chemistry, Higher Teacher Training College, University of Yaoundé I, P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon.

*Corresponding author. E-mail: francinetankeu@gmail.com.

Cancer is the second most deadly disease worldwide. However, its therapeutic treatment still faces several impediments mainly related to the severity of side effects and multidrug resistance of current cancer chemotherapeutics. This suggests a permanent need towards searching new compounds which could be less cytotoxic to normal cells and overcome drug resistance. *Syzygium guineense* is a plant of the Myrtaceae family widely distributed in tropical countries used in traditional Cameroonian medicine for the treatment of liver cirrhosis and vaginal infections. In this study, we investigated the cell growth inhibitory potential of leaf and bark extracts of *S. guineense* on human cervical cancer cells, SiHa and HeLa, followed by the study of the effects of active fractions on cell cycle as well as their potential to induce apoptosis. The Bax and Bcl-2 protein content were assessed in the most sensitive cell line (SiHa). The GC/MS analysis helped to identify the putative compounds responsible for the anti-proliferative and cytotoxic effects. The results clearly showed that fractions L₄ and L₅ derived from the ethanolic leaf extracts exerted the most potent anti-proliferative effect in both SiHa and HeLa cells. GI₅₀ values were respectively 48.11 and 33.64 µg/mL in SiHa and 56.43 and 41.69 µg/mL in HeLa. Treatment of cells with L₄ and L₅ caused prominent S and G₂/M phase arrest in SiHa and HeLa, respectively. The characterization of the mechanism underlying the apoptotic effect in SiHa showed an upregulation of Bax and a down regulation of Bcl-2. These results suggest anti-proliferative potential of *S. guineense* secondary metabolites due to cell cycle arrest and apoptosis induction mediated through Bax-dependent mitochondrial pathway.

Key words: apoptosis, Bax, Bcl-2, cell cycle, SRB assay, *Syzygium guineense*.

Abbreviations: Bcl-2, B-cell lymphoma 2; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS, Fetal bovine serum; HPV, Human Papilloma Virus; RPMI, Roswell Park Memorial Institute Medium; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TBST, TrisBuffered Saline with Tween.

INTRODUCTION

Cancer is a class of diseases in which a cell or a group of cells exhibit unrestrained growth, invasion and metastasis resulting from a disruption of tissue homeostasis. According to GLOBOCAN, 18.1 million new cases and 9.6 million deaths occurred in 2018 (Bray et al., 2018). Current estimates indicate that women represent almost the half of the global burden with cervical cancer ranking as the fourth most common cancer after breast, colorectal and lung

cancers (Ferlay et al., 2014). In 2012, about 528.000 new cases were recorded worldwide and cervical cancer only lead to 266.000 deaths (Ferlay et al., 2014). In Cameroon, 13.8% of all female malignancies are linked to cervical cancer which is the second most common gynecological and the second leading cause of death among women (Enow et al., 2012).

Due to severe side effects of surgery, radiotherapy and

chemotherapy as well as their high cost, phytotherapy is encouraged for the management of cancer. In fact, approximately 60% of all drugs undergoing clinical trials now for the multiplicity of cancers are either natural products or natural derived- compounds (Newman and Crag, 2016). Plant extracts can therefore be regarded as chemical libraries of structurally diverse compounds and their investigation constitutes a promising approach in drug discovery.

Syzygium guineense (Willd.) is a Cameroonian plant used by populations as spice. In African traditional medicine, this plant is used to treat amenorrhea, sexually transmitted diseases and its antibacterial properties have been demonstrated on *E. coli*, commonly involved in cervico-vaginal infections (Tsakala et al., 1996). The chemical composition of its methanolic extract of leaves revealed the presence of triterpenes (Djoukeng et al., 2005). Stem bark extracts were found to be rich in phenolic compounds, a well-known class of secondary metabolites endowed with promising anticancer properties (Pieme et al., 2014). Moreover, *S. aromaticum* has been proved to be a suitable source of betulinic acid, one of anticancer compounds currently undergoing clinical studies (Abdalrahim et al., 2012). However, the anticancer properties of *S. guineense* have not been explored much, although plants from the same genus have shown such effects on several cancer cell lines (Banerjee et al., 2011). Hence, this study was undertaken to investigate the anticancer effects of crude extracts from *Syzygium guineense* var. *macrocarpum* on two human cervical cancer cell lines, and elucidate the mechanism underlying the anticancer effect of the most active fractions, as well as to determine their phytochemical composition.

MATERIALS AND METHODS

Plant harvesting and extracts preparation

Leaves and barks of *Syzygium guineense* (Willd.) were harvested in Centre Region of Cameroon in November 2014 and identified by comparison to voucher number 4985HNC. The air-dried leaves and barks were ground and extracted as described by Tankeu et al. (2016). The aqueous and water-ethanol extracts were lyophilized while the ethanolicones were dried in an oven at 50°C. The resulting crude extracts were labeled as follows L₁ (crude ethanol extract from leaves); L₉ (crude aqueous extract from leaves); L₁₀(crude aqueous ethanol extract from leaves); B₁ (crude ethanol extract from barks); B₂ (crude aqueous extract from barks) and B₃ (crude aqueous ethanol extract from barks).

The crude ethanolic extract of leaves was subjected to vacuum chromatography over silica gel (200–300 mesh), elution was done with hexane, ethyl acetate and methanol by increasing the polarity of the mixture of solvents. All the

collected sub-fractions (200 mL) were grouped into four fractions according to thin layer chromatography (TLC) monitoring and labeled as follows: L₄: Fraction F₁ hexane/ethylacetate 6/4 (v:v); L₅: Fraction F₂ (hexane /ethylacetate 4/6 (v: v); L₆: Fraction F₃ (ethyl acetate: methanol (7/3); L₇: Fraction F₄ methanol.

Cytotoxic effect of plant extracts on different cancer cell lines

For the cytotoxicity assay, the SulfoRhodamine B (SRB) assay which is the standard method recommended by the NCI for the anticancer screening drug was performed as described by Chavan-Rohit et al. (2016). Growth inhibition, anti-proliferative and cytotoxic parameters of crude extracts and fractions were determined. Four different concentrations of 100, 50, 10 and 1 µg/mL of each extract were tested. Normal Peripheral blood Lymphocytes (NPBLs) were used as normal cells and Adriamycin was used as positive control and tested at 80, 40, 20 and 10 µg/mL. Briefly, about 5,000 cells were plated in 96 well plates in 100 µL of medium and incubated for 24 h and then cells were exposed to different concentrations of plant extracts followed by further 48 h incubation. Then, the cells were fixed with 50 µL of 30% (wt/v) trichloro acetic acid and kept at 4°C for 1 h. Plates were washed repeatedly four times and allowed to dry, and then stained with 50 µL of 0.4% SRB dye for 30 min. The excess dye was removed by repeated washing with 1%(v/v)acetic acid solution and plates were kept for drying. The protein-bound dye was dissolved in 10 mMTris-base solution (pH 10.5). The optical densities (OD) were measured at 540 nm using a micro-plate reader (Sunrise Model, Tecan Company, Germany). All the experiments were repeated three times and each concentration was plated in triplicate. Two plates serving as T_z were always kept and optical densities were measured after 24 h of incubation (at the time of drug addition to the test plates).

Three measurements were obtained: T_z: Average value of OD readings of the whole control plate 24 h after seeding the cells; Control (C): Average value of eight wells kept as control (72 h post seeding cells; Ti: Average value of OD readings of three wells of each concentration 48 h after drug addition.

The percent control growth was determined according to the equation: % Growth = $100 \times [(Ti - Tz) / (C - Tz)]$. A dose-response curve for each compound and each cell line was plotted. From each the dose-response curve for each compound, the equation of the linear curve was used to calculate the GI₅₀, TGI and LC₅₀ values as follows: GI₅₀= Concentration of the drug that produces 50% of growth inhibition; TGI = Concentration of the drug that produces total inhibition of cells; LC₅₀ = Lethal concentration 50 is the concentration of the drug that kills 50 % of cells (cytotoxic parameter).

DNA content and cell cycle phase distribution

About 0.2×10^6 cells/mL per well were treated with plant extracts at 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$, for 24 h. Cells were harvested and washed with 1 mL of 1X PBS twice and centrifuged at 1000 rpm for 10 min at 4°C . Then, cells were fixed using chilled 70% alcohol, washed again and the pellet was re-suspended in 500 μL of 1X PBS. 50 μL of RNase A (100 $\mu\text{g/mL}$) and 50 μL of 0.4 $\mu\text{g/mL}$ of propidium iodide (PI) were added and incubated at 37°C in the dark for 30 min. Finally, cells were acquired immediately on flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). Etoposide was used as positive control. The resulting DNA distributions were analyzed by Modfit 2.0 for the proportions of cells in G₀-G₁, S- phase and G₂/M phases of the cell cycle and apoptosis.

Analysis of Bax and Bcl-2 protein expression by western blot

Only SiHa cell line was used since it was more sensitive than HeLa according to SRB results. The method of Sun et al. (2018) with some modifications was used. Cells were treated for 6, 12 and 24 h with L₄ and L₅. For each period of time, a control was kept. Cells were treated at 100 and 80 $\mu\text{g/mL}$, respectively for L₄ and L₅, the concentrations of L₄ and L₅ which showed the highest percentage of apoptotic cells after cell cycle analysis. For protein expression analysis, control and treated cells were harvested and centrifuged at 1200 rpm for 10 min. Cell pellets were washed with 1X PBS and stored at -80°C . Cell lysates were obtained by sonication with lysis buffer which contained 0.5 M Na_3VO_4 and 0.5M PMSF. The total protein content in the collected supernatant was quantified using the Bradford method.

For β -actin, Bax, and Bcl-2, the protein samples were separated by 15% SDS-PAGE. The protein samples were then transferred onto a nitrocellulose membrane and blocked with 5% skim milk for 4 h. Anti-Bax, Anti-Bcl-2 antibody (1:1000) and anti- β -actin antibody (1:2000), diluted in 3% BSA, was added to the membrane and the membrane was incubated at 4°C overnight. After three washes with TBST, the immune complex was recognized by a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:2000). After three washes with TBST, the peroxidase activity was visualized using the ECL kit. The densitometric analysis of the bands was determined using a gel documentation system (Gel Analyzer, ShineTech, Beijing, China).

GC/MS analysis of fractions L₄ and L₅ derived from crude ethanolic extract of leaves

The GC/MS analysis of hexane/ethyl acetate fractions L₄

and L₅ was performed according to the method described by Salim et al. (2013). Identification was made by comparison of their mass spectra with those stored in NIST library. The relative percentages of chemical constituents in crude extract and fractions from leaves were calculated based on GC peak areas and expressed as percentage.

Statistical analysis

The anti-proliferative experiments were done in triplicates and each data point represents the average of 3 independent experiments. The distributions of the data are abnormal. The data were expressed as mean \pm SD. Data were analyzed using SPSS (Version 20.0.) One way analysis of variance was applied to observe the significance between the groups and post hoc Duncan's multiple range tests was performed at $p < 0.05$. Generation of graphs was completed using Graph Pad Prism® version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

RESULTS

The results of the anti-proliferative effect of the crude extracts and fractions of *S. guineense* on cervical cancer cells (SiHa and HeLa) are shown in Figure 1. This figure clearly showed a selective cytotoxic effect of extracts towards cancerous cells as compared with normal peripheral blood lymphocytes (NPBLs). The percent control growth of both crude extracts and fractions was above 90% at all the tested concentrations upon treatment of NPBLs (Figure 1i to k). A dose-dependent inhibition of cervical cancer cells growth upon treatment with crude extracts and fractions was also observed. SiHa cell line was found to be more sensitive to *S. guineense* extracts and fractions as compared with HeLa cells. The aqueous extract of bark (Extract B₂; Figure 1b and f) showed increased growth inhibitory and cytotoxic effect ($p < 0.05$) on both cell lines as compared with its ethanolic (Extract B₁) and hydro-ethanolic counterparts (Extract B₃). The GI₅₀ and TGI values for extract B₂ were 84.5 and 140 $\mu\text{g/mL}$ respectively, and LC₅₀ = 195.5 $\mu\text{g/mL}$ on SiHa while GI₅₀ for ethanolic and hydro-ethanolic extracts was 361.70 and 551 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In contrast, among the leaf extracts, the ethanolic one (Extract L₁) inhibited more efficiently the growth of SiHa and HeLa than its counterparts with respective GI₅₀ values of 122.3 and 126.4 $\mu\text{g/mL}$ respectively (Figure 1a and e; Tables 1 and 2), whereas that of aqueous and hydro-ethanolic ranged from 210.5 to 813.5 $\mu\text{g/mL}$. The lowest Total Growth Inhibition (TGI) and Lethal Concentration 50 (LC₅₀) values were also observed with the same extract at 285.1 and 205.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively on HeLa (Table 1).

Out of the four fractions derived from the leaf ethanolic extract, L₄ and L₅ showed the best anti-proliferative activity

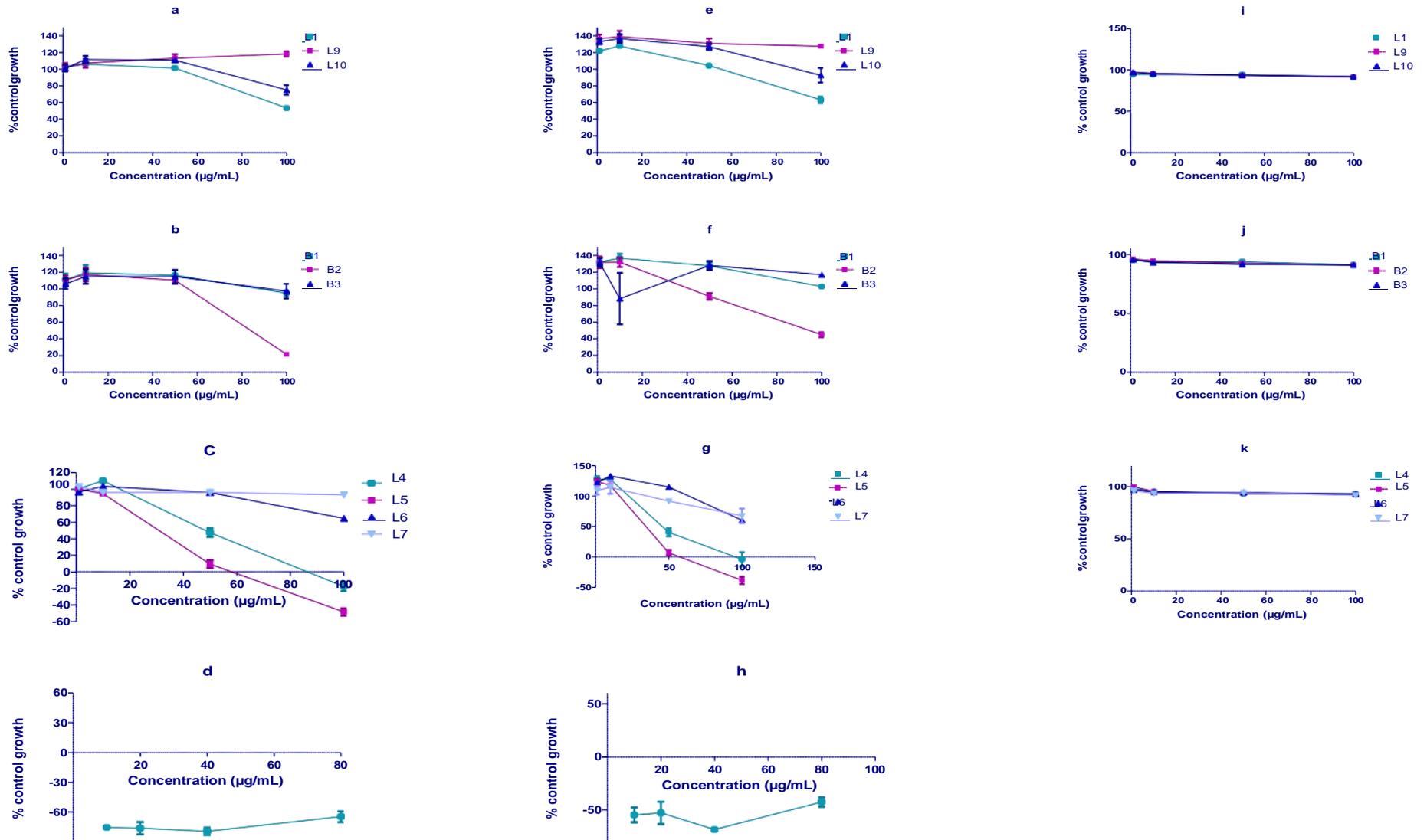


Figure 1: Percent control growth of Human cervical cancer cell line (HeLa) treated with crude extracts and fractions of *S. guineense* ; **a**: Leaves ; **b**: Barks ; **C**: Fractions derived from crude ethanolic extract of leaves; **d**: Adryamicin (positive control). **a-d**; effects on Hela cells; **e-h**: effects on SiHa cells, L₁ (crude ethanol extract from leaves); L₉ (crude aqueous extract from leaves); L₁₀ (crude aqueous ethanol extract from leaves); B₁ (crude ethanol extract from barks); B₂ (crude aqueous extract from barks) and B₃ (crude aqueous ethanol extract from barks). L₄: Fraction hexane /ethyl acetate 6 /4 (v : v); L₅: Fraction (hexane /ethyl acetate 4 /6 (v : v); L₆: Fraction (ethyl acetate: methanol (7/3); L₇: Fraction pure methanol ; **i-k**: effects on Normal Peripheral blood Lymphocytes; Values are mean ± SD of three determinations).

Table 1: Anti-proliferative and cytotoxic parameters of crude extracts of leaves of *S. guineense* on Human Cervical cell line (HeLa).

Parameter	HeLa	LC50 ($\mu\text{g/mL}$)	TGI ($\mu\text{g/mL}$)	GI50 ($\mu\text{g/mL}$)
Leaves extracts of <i>S. guineense</i>	L1	285.1	205.8	126.4
	L9	1739.6	1276.6	813.5
	L10	448.9	330.4	211.8
Barks extracts of <i>S. guineense</i>	B1	591.2	433.6	276.1
	B2	204.8	149.9	95.0
	B3	NE	NE	NE
Fractions of Ethanolic extract of Leaves of <i>S. guineense</i>	L4	126.7	91.6	56.4
	L5	99.1	70.4	41.7
	L6	276.0	201.2	126.5
	L7	259.3	183.5	107.7

NE: Not Evaluable; L₁ (crude ethanol extract from leaves); L₉ (crude aqueous extract from leaves); L₁₀ (crude aqueous ethanol extract from leaves); B₁ (crude ethanol extract from barks); B₂ (crude aqueous extract from barks) and B₃ (crude aqueous ethanol extract from barks). L₄: Fraction hexane /ethylacetate 6 /4 (v : v); L₅: Fraction (hexane/ethylacetate 4 /6 (v : v); L₆: Fraction (ethyl acetate: methanol (7/3); L₇: Fraction pure methanol.

Table 2: Anti-proliferative and cytotoxic parameters of crude extracts of leaves of *S. guineense* on human cervical cell line (SiHa).

	SiHa	LC50 ($\mu\text{g/mL}$)	TGI ($\mu\text{g/mL}$)	GI50 ($\mu\text{g/mL}$)
Leaves extracts of <i>S. guineense</i>	L1	323.4	222.8	122.3
	L9	NE	NE	NE
	L10	553.1	381.8	210.5
Barks extracts of <i>S. guineense</i>	B1	894.8	628.2	361.7
	B2	195.5	140.0	84.5
	B3	1429.7	990.4	551.0
Fractions of Ethanolic extract of Leaves of <i>S. guineense</i>	L4	125.9	87.0	48.1
	L5	97.0	65.1	33.2
	L6	444.0	300.0	156.1
	L7	1956.7	1305.6	654.5

NE: Not Evaluable; L₁ (crude ethanol extract from leaves); L₉ (crude aqueous extract from leaves); L₁₀ (crude aqueous ethanol extract from leaves); B₁ (crude ethanol extract from barks); B₂ (crude aqueous extract from barks) and B₃ (crude aqueous ethanol extract from barks). L₄: Fraction hexane /ethylacetate 6 /4 (v : v); L₅: Fraction hexane /ethylacetate 4 /6 (v : v); L₆: Fraction (ethyl acetate: methanol (7/3); L₇: Fraction pure methanol.

profile ($p < 0.05$) both in SiHa and HeLa cell lines (Figure 1c and g). At 50 $\mu\text{g/mL}$, fraction L₅ had a quasi-cytostatic effect and became cytotoxic (cell death) beyond 50 $\mu\text{g/mL}$ on both cell lines. This cytotoxic effect justifies the negative percent control growth observed with this fraction, as shown in Figure 1c and g. Similarly, fraction L₄ showed a cytostatic effect at 100 $\mu\text{g/mL}$ on HeLa cells and a cytotoxic effect at the same concentration on SiHa. These anti-proliferative and cytotoxic effects of fractions L₄ and L₅ are further supported by GI₅₀, total growth inhibition and LC₅₀ values as shown in Tables 1 and 2. On SiHa cell line, L₄ exhibited GI₅₀ and TGI values of 48.1 and 87 $\mu\text{g/mL}$, respectively while L₅ demonstrated a slightly better activity with GI₅₀ and TGI of 33.2 and 65.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The same fractions were also the most active on HeLa but with slightly higher anti-proliferative and cytotoxic parameters (Figure 1c and Table 1). Positive control Adriamycin

exhibited strong anti-proliferative efficacy against both these cell lines (Figure 1d and h)

Moreover, cell cycle analysis was done by flow cytometry to study the effects of L₄ and L₅ treatment on the different phases of cell cycle as well as their ability to induce apoptosis. It emerged from cell cycle analysis results (Figure 2) that L₅ inhibited cell proliferation by blocking the cells in S and G₂/M phase in SiHa and HeLa cell lines, respectively with 29.88% and 60.75% as compared to the untreated cells (10.01% and 19.69%)(Figures 3B and 3D). Nonetheless, it is noticeable that at 100 $\mu\text{g/mL}$ there is a marked increase in the S phase population concomitantly with a drop in the number of G₂/M cells (74.95% versus 1.68%). Conversely, fraction L₄ did not induce any major effect on the cell cycle of SiHa cells while it induced a G₂/M phase arrest in HeLa cells with 79.07% of cells at 100 $\mu\text{g/mL}$ as compared to the untreated control cells(19.69%)

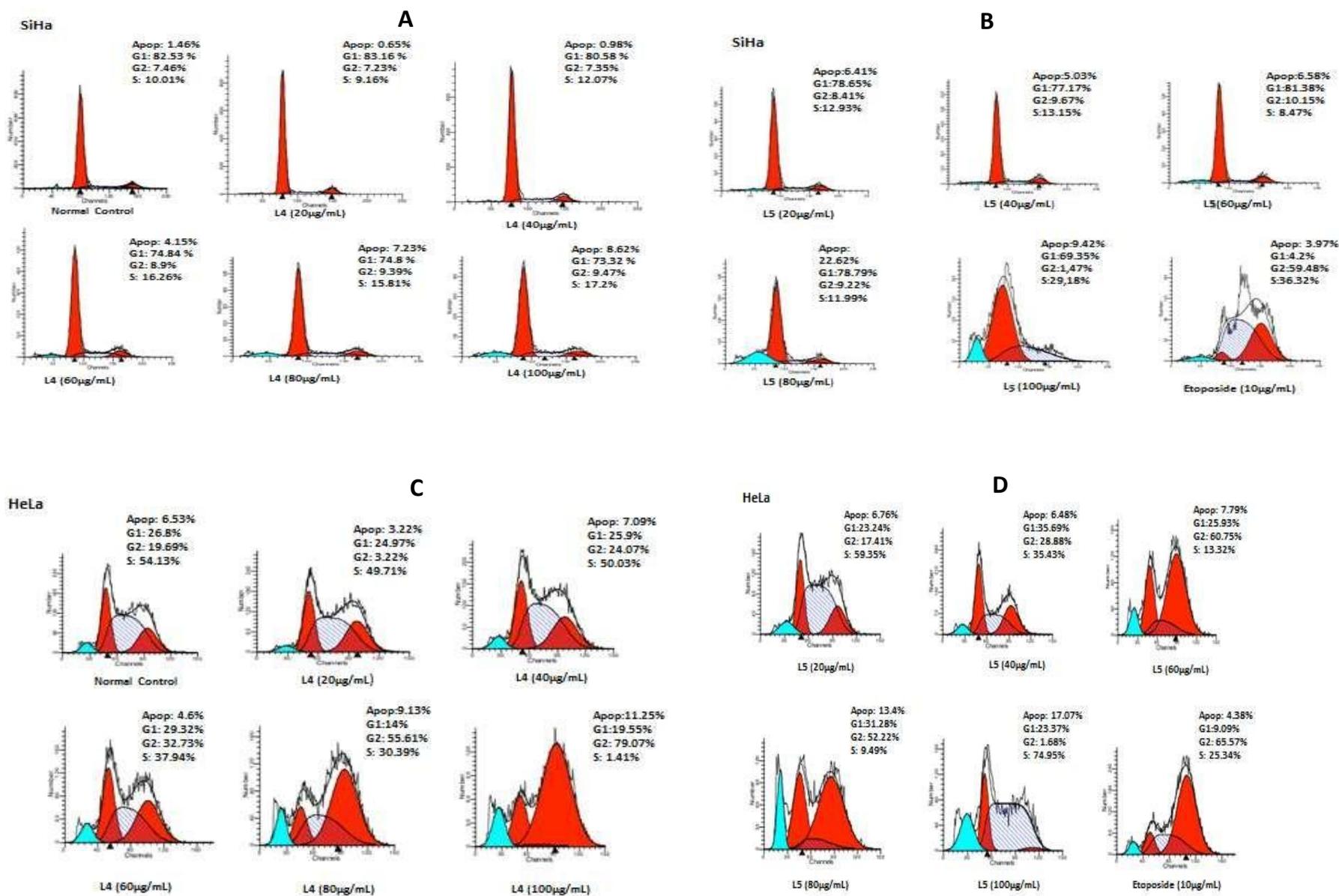


Figure 2: Cell cycle analysis of SiHa and HeLa cells treated with fractions L4 and L5.

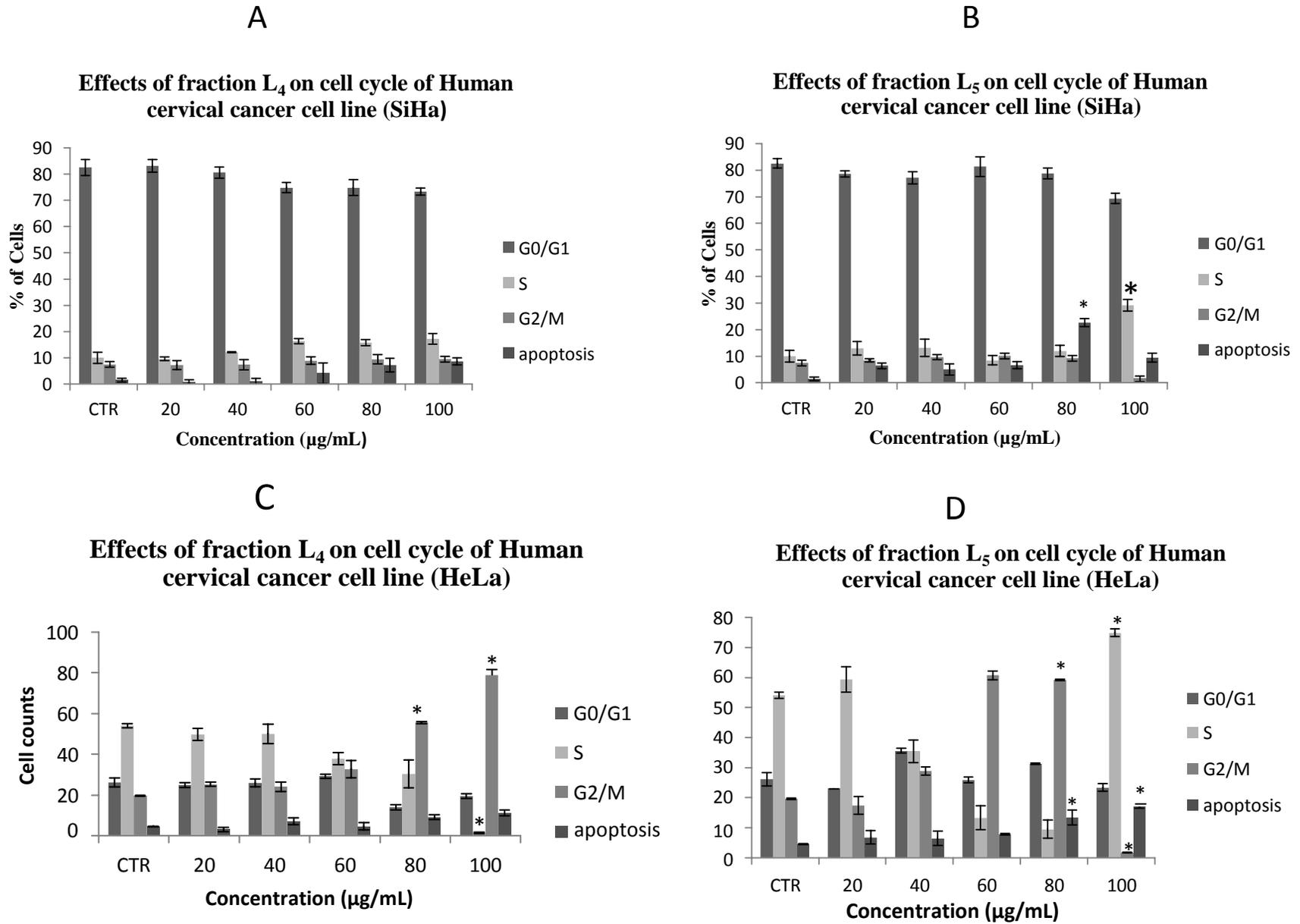


Figure 3: Effects of fractions L₄ and L₅ on cell cycle and DNA content of SiHa and HeLa cells.

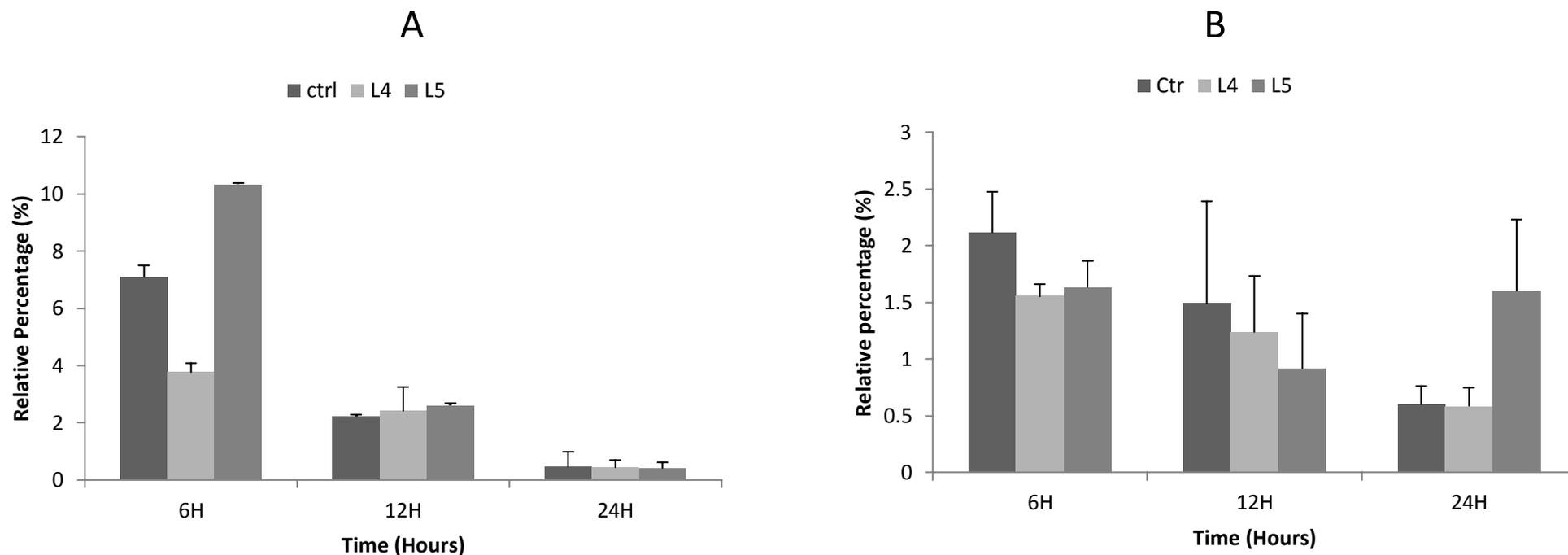


Figure 4: Expression profile of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 in human cervical cancer cell line (SiHa) A: Bax; B: Bcl-2.

(Figures 3A and 3C).

In parallel with the alterations observed in the phases of the cell cycle after treatment with the fractions L₄ and L₅, a sub-G1 peak characteristic of the apoptotic cells was also observed. The analysis revealed the induction of a dose-dependent apoptosis (Figure 3A, C, and D). Nonetheless, it is noteworthy that the highest percentage of apoptotic cells was rather observed at 80 µg/mL with L₅ on SiHa cells (Figure 3B).

Although apoptosis involves both intrinsic and extrinsic pathways, tumors arise more frequently through dysregulation of the intrinsic pathway. To gain insights into the molecular pathway involved in

L₄ and L₅-induced cell death, the protein expression profile of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 was studied by western blotting. The results showed a concomitant upregulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 after 6 h of treatment of SiHa cell line with L₅ (Figures 4A, 5 and 6). This upregulation of the pro-apoptotic protein Bax decreases gradually with the time and seems to return to the normal almost after 24 h of treatment, accompanied by an up-regulation of Bcl-2 as compared with the control (Figure 5). In the case of fraction L₄, Bax was down-regulated after 6 h and seems to return to the normal level after 24 h. Similarly, the level of Bcl-2 decreased after 6 and 12

h but returns to the basic level as compared with the control after 24 h (Figure 4B). However, the Bax/Bcl-2 ratio (Figure 6) showed a significant difference only after 6 h of treatment of cells with fraction L₅ as compared to the control.

Since the biological activities of plant extracts are related to their content in certain class of secondary metabolites, the phytochemical analysis of L₁-derived fractions L₄ and L₅ was done by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. Fractions L₄ and L₅ showed 149 and 126 peaks respectively (Figure 7A and B). Methyl hydrogen disulfide was the main compound in L₄(54.58%), the remaining compounds fall into classes of terpenes, fatty acids,

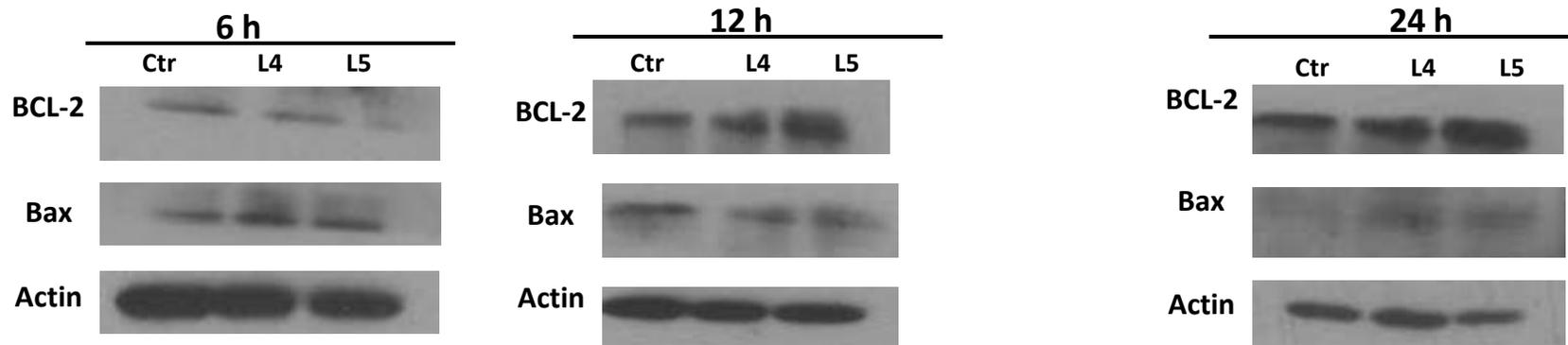


Figure 5: Western blot analysis of Bax and Bcl-2 proteins expression profile in human Cervical cancer cell line (SiHa) ; Ctr: Control.

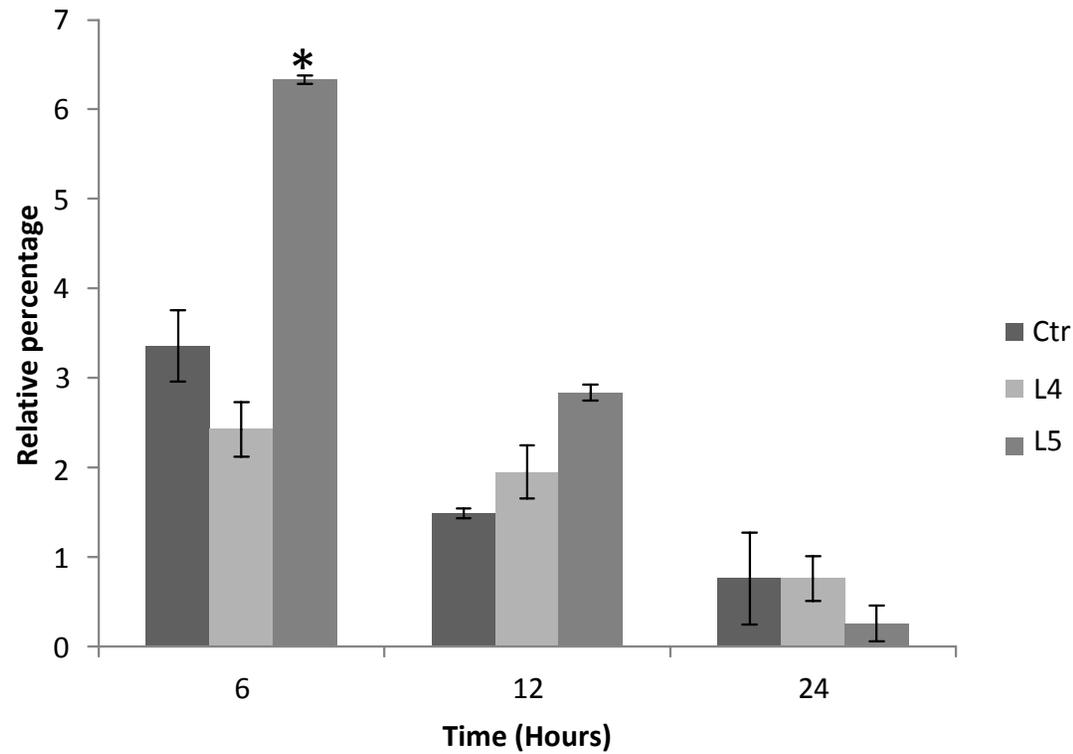


Figure 6: Expression profile of ratio Bax/Bcl2 in human cervical cancer cell line (SiHa).

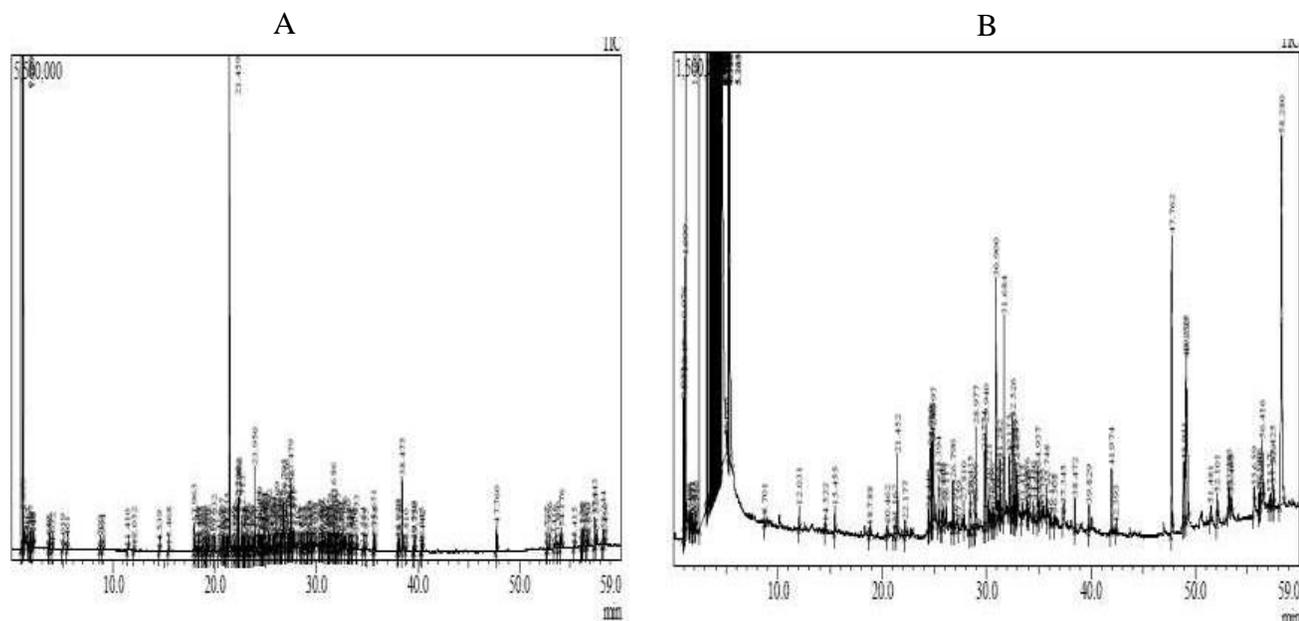


Figure 7: Chromatograms of GC/MS analysis of fractions L₄ and L₅ derived from ethanolic crude extract from leaves of *Syzygium guineense*; A: L₄: hexane-ethyl acetate 80:20 (v:v). B: L₅ hexane-ethyl acetate 60:40 (v:v).

Table 3: Major compounds of interest found in fraction L₄ derived from crude ethanolic extract of leaves by GC/MS analysis.

RT	Common name	% Area	Systematic name
0.996	-	54.58	Methyl hydrogen disulfide
1.099	-	0.45	Methacrolein
1.169	-	5.46	Ethyl Acetate
1.317	-	0.01	Cyclohexane
17.963	-	0.40	Copaene
19.127	α -Bourbonene	0.07	1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,4,7,8,8a-hexahydro-3,6,8,8
19.373	Spathulene I	0.04	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-
19.692	β -cubebene	0.02	1HCyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]b enzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-,
20.416	acordiène	0.03	Spiro[4.5]dec-7-ene, 1,8-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-
21.459	Curcumene	9.04	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-
22.115	α -bergamotene	0.40	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3
22.406	-	0.89	Ledol
22.713	-	0.69	Cedrene
26.263	-	0.16	tau.muurolol:
26.795	Trans-nuciférol	1.50	6-(p-Tolyl)-2-methyl-2-heptenol
31.792	-	1.76	.alpha.-Bisabolol
32.337	phytol	1.49	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol

sterols, and hydrocarbons (Table 3). Unlike in L₁ and L₄, L₅ mainly contained dimethylsulfoxonium formyl-methylide (20.27%) followed by sulfurous, nitrogen and oxygenated hydrocarbons (Table 4).

DISCUSSION

Natural products have proven to be very useful in anticancer drug development over the last decades,

Table 4: Major compounds of interest found in fraction L₅ derived from crude ethanolic extract of leaves by GC/MS analysis.

RT	% Area	Sytematic Name
3.097	20.27	Dimethylsulfoxoniumformylmethylide
3.170	9.7	Hepta-4,6-diyn-2-ol
3.201	9.31	Sulfurdioxide
3.292	10.56	Tetrafluoroformamidine
3.398	3.87	Aminomethanesulfonicacid
3.457	2.40	Disulfide, dimethyl
3.630	4.42	Ethene, 1,1-difluoro-
3.675	6.98	Ethene, 1,2-difluoro-
3.722	4.78	Methanesulfonylazide
3.767	1.05	Methanesulfonic anhydride
3.795	2.99	(N-(-2-Acetamido))-2-aminoethanesulfonic acid
3.892	4.02	Dimethyl sulfone
3.972	2.15	Tetrazolo[1,5-b]pyridazine, 6-chloro-
3.990	1.08	2-Propanol, 1,3-dichloro-
4.205	1.34	2-Aminoethyl hydrogen sulfate
4.280	3.89	3-Thiatricyclo[3.1.1.0(2,4)]heptane 3-oxide
4.372	2.51	Sulfurousacid, dimethyl ester
4.421	1.94	Methanesulfonylchloride
4.450	1.40	Thiophosphordiamide, S-methyl ester

particularly those derived from terrestrial plants. SRB assay is one of the most widely used methods for drug-cytotoxicity testing and the standard method recommended by National Cancer Institute (NCI) for anticancer drug-screening. Based on this method, our results clearly showed that, extracts from *S. guineense* exhibited a growth inhibitory potential against the tested cervical cancer cell lines. These results are in agreement with those of Banerjee and Narendhirakannan (2011) who reported also the anti-cervical cancer proliferative effect of ethanolic extract of *Syzygium cumini*.

Fractions L₄ and L₅ derived from ethanolic extract of leaves showed a significant increase (about two fold) of the growth inhibitory and cytotoxic potential as compared with the mother crude ethanolic both in SiHa and HeLa cells. These results show that the fractionation process resulted in the isolation of molecules responsible for the observed anti-proliferative effect in fractions L₄ and L₅. Moreover, these bioactive compounds are suggested to be of low polarity since fractions L₄ and L₅ are mixtures of compounds eluted with the 80:20 and 60:40 hexane-ethyl acetate mixture (v: v), respectively. The phytochemical profile of these fractions further supports this hypothesis by their richness in terpenes and fatty acids, which are known low polarity metabolites (Pejin et al., 2014). Moreover several studies reported the anti-proliferative effect of terpenes (Cavalieri et al., 2011).

A number of biological effects such as enzyme modulators, cell cycle disruption and apoptosis triggering

have been reported as molecular mechanisms involved in the anticancer activity of plant extracts (Pieme et al., 2014). Thus, cell cycle analysis revealed an increase in S phase cells population in SiHa upon treatment with L₄ and L₅, suggesting that the latter arrested SiHa cells at the S phase by stimulating the cells from the G₀/G₁ phase to the S phase, thereby preventing the cells from undergoing mitosis and subsequently inhibiting their proliferation. Conversely, both fractions rather induced a G₂/M phase arrest on HeLa cells. However, both fractions can be considered as mitosis inhibitors on both the cell lines. Additionally, L₄ and L₅ triggered apoptosis in both the cell lines which justifies the observed cytotoxicity. These results are in agreement with several research data dealing with the mechanism of action underlying the anticancer effect of natural products (Singh et al., 2010; Belayachia et al., 2017). Furthermore, Banerjee et al. (2011) demonstrated that *S. cumini* extract inhibits growth and induces apoptosis in HeLa and SiHa cervical cancer cells.

One mechanism evolved by cancer cells responsible for their uncontrolled proliferation is to escape or resist apoptotic cell death either by up-regulating anti-apoptotic proteins or down regulating pro-apoptotic proteins. Our results of expression profile of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 by western blot analysis clearly showed an increase in Bax and a decrease in Bcl-2 expression after 6 h. Bax might suppress the effect of Bcl-2 thereby contributing to the outer mitochondrial membrane permeability required for the release of apoptogenic factors

involved in the execution of cell death by promoting caspase activation or by acting as caspase-independent death effectors (Pawlowski and Kraft, 2000). Consistent with our data, it has been suggested that a high ratio of Bax/Bcl-2 can lead to a collapse of the mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis (Teijido et al., 2010). Moreover, it has been greatly reported that Bcl2 is inactivated by phosphorylation when cells are arrested in G₂/M phase (Tashiro et al., 1998). This hypothesis also agrees with our data in HeLa treated cells. Nonetheless, although we did not study the effect on tumor suppressor protein P₅₃, another mechanism could be the activation of P₅₃ which might stimulate the synthesis of P₂₁, thereby preventing the kinase activity of Cdk/Cyclin B which catalyzes the phosphorylation of serine/threonine residue in the cell cycle regulatory target proteins. The S phase arrest exhibited in SiHa also comforts the hypothesis in favor of P₅₃ activation and subsequently increased the synthesis of P₂₁. Absolutely, P₅₃ activation appears as the common pathway to be triggered in order to exert both S and G₂/M phase arrests since P₂₁ can inhibit respectively cyclin A/Cdk2 and Cyclin B/Cdk 1 complexes, thereby inducing both S and G₂/M phase arrests. Compounds such as phytol, α -bisabolol, cedrene and copaene, found in fraction L₄, could be responsible for the observed anti-proliferative and cytotoxic effects. In fact, several research data dealing with the effect of these compounds on cell cycle have been reported so far (Pejin et al., 2014; Bonifacio et al., 2012). However, the major compounds identified in fraction L₅ have not yet been reported in the literature as endowed with anticancer effect. This suggests that either identified minor compounds reported in the literature for their anticancer activity might be responsible for the best activity exhibited by this fraction, or major compounds may have intrinsic anticancer effect not yet elucidated. Nonetheless, major compounds could also act synergistically with minor ones leading to an improvement of the overall anticancer effectiveness of fraction L₅.

CONCLUSION

The current study demonstrated that *S. guineense* possess anti-proliferative effect on SiHa and HeLa cells. Our results indicated that fractions L₄ and L₅ derived from the crude ethanolic extract inhibited the proliferation of SiHa and HeLa cell lines at a dose- and time-dependent manner via S and G₂/M phase arrests, respectively as well as mitochondrial apoptotic programmed cell death. These data may complement its use for the treatment and management of cancer in Africa since it is used in African traditional medicine to manage various ailments. However, more studies on their mode of action will be relevant to deeply understand the molecular pathway involved in the observed anti-proliferative properties. Toxicities studies should also be performed to assess its safety and optimize its potential use as a lead in anticancer therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. P.S. Ramanathan Advanced Instrumentation Centre, Ramnarain Ruia College, Matunga, Mumbai-400019 for performing the GC/MS analysis. This study was supported by the NAM S&T-Research Training Fellowship for Developing Countries Scientists (RTF-DCS) from Ministry of Science and Technology of Indian government.

REFERENCES

- AbdalahimF, AishaA,KhalidM, Abu-Salah, SalmanA,Alrokayan, MohammadJ, SiddiquiZ, IsmailA, MalikS, Abdul M (2012). *Syzygium aromaticum* extracts as good source of betulinic acid and potential anti-breast cancer. Rev. Bras. Farmacogn.22(2): 335-343.
- Banerjee J, Narendhirakannan RT (2011). Phytochemical analyses; antibacterial; *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities of ethanolic extract of *syzygiumcumini* (L.) seed extract. Int. J. Pharm. Sci. Res. 2: 1799-1806.
- Belayachia L, Luquerob CA, Merghoubd N, Fernández de Mattos S, Amzazia S, Villalong P, Youssef B (2017). Induction of cell cycle arrest and apoptosis by *ormeniseriolepis* a morrocan endemic plant in various human cancer cell lines. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 14(2): 356-373.
- Bonifacio M, Rigo A, Guardalben E, Bergamini C, Cavaliere E, Fato R *et al.* (2012). α -bisabolol is an effective proapoptotic agent against BCR-ABL(+) cells in synergism with Imatinib and Nilotinib. PLoS One. 7(10): e46674.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 68(6):394-424
- Cavaliere E, Rigo A, Bonifacio M, Carcereri de Prati A, Guardalben E, Bergamini C *et al.*; (2011). Pro-apoptotic activity of α -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. J. Transl. Med. 9: 45. doi: 10.1186/1479-5876
- Chavan R, Khan M, Sathe N, Mankar N (2016). A Review: SRB Assay For Screening Anticancer Activity Of Herbal Drugs (In-Vitro). Int. Ayurvedic Med. J. 4(2): 66-70.
- Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacchi R, Tapondjou AL, Boud H, Lontsi D (2005). Antibacterial triterpenes from *Syzygiumguineense* (Myrtaceae). J. Ethnopharmacol. 101: 283-286.
- Enow GE, Ndom P, Doh AS (2012). Current cancer incidence and trends in Yaoundé; Cameroon. Oncol. Gastroenterol. Hepatol. Rep. 1(1): 58-63.
- Newman DJ, Cragg GM (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 79(3): 629-661.
- Pawlowski J, Kraft AS (2000). Bax-induced apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97(2): 529-531.
- Pejin B, Kojic V, Bogdanovic G (2014). "An insight into the cytotoxic activity of phytol at *in vitro* conditions." Nat. Prod. Res. 28(22): 2053-2056.
- Pieme CA, Kumar SG, Dongmo MS, Moukette MB, Fekam BF, Ngogang JY, Saxena AK (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annonamuricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. BMC Complement. Alternat. Med. 14: 516-525.
- Pieme CA, Ngoupayo J, Nkoulou C, Moukette B, Nono B, Ama V, Minkande J, Ngogang J (2014). *Syzygium guineense* Extracts Show Antioxidant Activities and Beneficial Activities on Oxidative Stress Induced by Ferric Chloride in the Liver Homogenate. Antioxid. 3(3): 618-635.
- Salim LA, Hossain MA, Weli AM, Al-Riyami Q, Al-Sabahi JN (2013). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of different organic crude extracts from the local medicinal plant of *Thymus vulgaris* L. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3(1): 69-73.
- Singh M, Tyagi S, Bhui K, Prasad S, Shukla Y (2010). Regulation of cell growth through cell cycle arrest and apoptosis in HPV 16 positive human cervical cancer cells by tea polyphenols. Invest. New Drugs. 28(8): 216-224.

- Sun W, Zhanga B, Yua X, Zhuang C, Sun XL, Xinga JY, Xiua Z, Donga Y (2018). Oroxin A from *Oroxylum indicum* prevents the progression from prediabetes to diabetes in streptozotocin and high-fat diet induced mice. *Phytomed.* 38: 24-34.
- Tankeu NF, Pieme CA, Njimou JR, Biapa NPC, Moukette MB, Bravi M, Chianese A, Ngogang YJ (2016). Organo-protective and antioxidant properties of leaf extracts of *Syzygium guineense var macrocarpum* against ferric nitriloacetate-induced stress of Wistar rats. *J. Complement. Integr. Med.* 14(1). doi: 10.1515/jcim-2015-0086
- Tashiro E, Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M (1998). Caspase-3 activation is not responsible for vinblastine-induced Bcl-2 phosphorylation and G2/M arrest in human small cell lung carcinoma Ms-1 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 89(9): 940-946.
- Teijido O, Dejean L (2010). Upregulation of Bcl-2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS Lett.* 584(15): 3305-3310.
- Tsakala TM, Penge O, John K (1996). Screening of *in vitro* antibacterial activity from *Syzygium guineense* (Willd) hydrosoluble dry extract. *Ann. Pharm. Fr.* 54(6): 276-279.

Cite this article as:

Tankeu NF, Pieme CA, Jyoti K, Trupti P, Lenta NB, Ngogang YJ, Shubhada C (2018). Extracts from *Syzygium guineense* inhibit cervical cancer cells proliferation through cell cycle arrest and triggering apoptosis. *Acad. J. Med. Plants.* 7(2): 042-054.

Submit your manuscript at:

<http://www.academiapublishing.org/ajmp>