

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU



UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN SCIENCES DE LA SANTE  
(UFR/SDS)

-----  
Section Pharmacie



Année Universitaire 2010-2011

Thèse N° : 186

**ETUDE DES PROPRIETES ANTIPROLIFERATIVES  
ET ANTIRADICALAIRES DE L'EXTRAIT  
METHANOLIQUE DES FLEURS D' *Adenium  
obesum* (Apocynaceae)**

**THESE :**

Présentée et soutenue publiquement le **31 Octobre 2011** par

**KIHINDO Abdel Aziz**

Né le 12 juin 1982 à AZAGUIE (Côte d'Ivoire)

Pour l'obtention du grade de **Docteur en pharmacie (Diplôme d'État)**

**JURY**

**Directeur de thèse :**

Pr Jean Baptiste NIKIEMA

**Co-directeurs :**

Pr Jacques SIMPORE

Dr Charlemagne GNOULA

**Président :** Pr Ag. Elie KABRE

**Membres:** Dr Marius LOMPO

Dr Charlemagne GNOULA

Dr Seydou SOURABIE

# **LISTE DU PERSONNEL**

### *DEDICACES*

**A mon père *Lassina KIHINDO***, pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour. Tu as su cultiver en moi l'amour du travail et l'envie d'aller plus loin. J'espère être à la hauteur de tes attentes. Je prie que Dieu te donne longue vie pour que tu puisses voir la concrétisation de tes espoirs !

**A ma mère *Julienne Hedi ABOKON*** : Maman, je n'oublierai jamais tes sages conseils prodigués à mon endroit. Ton soutien primordial a toujours été la réussite de tes enfants. Tu es le mieux qu'un fils puisse espérer. Voici l'aboutissement de tes nombreuses nuits de prières. Maman, ce travail te revient. Puisse l'éternel te garder longtemps et te combler de bonheur. Je t'aime.

**A la mémoire de Feue ma grande mère *Pauline Amino YAO* :**

Les voies de Dieu sont impénétrables et je lui rends grâce pour tout ! Tu as été ma mère pendant mon enfance et tu as toujours voulu le meilleur pour moi et je sais combien ce jour aurait été important pour toi. Je t'aimerai toujours. Puisse Dieu me permettre de ne pas faillir à la mission que tu m'as confiée. Que ton âme repose en paix !

**A mon oncle *Armand ABOKON*** : vous êtes un modèle de persévérance et la pierre que vous avez apportée à l'édifice n'a pas été des moindres. Vous avez été toujours là pour moi en me traitant comme votre fils. Toujours à mes petits soins que ce soit sur le plan moral ou financier. Je vous en suis reconnaissant.

## Dédicaces

---

**A mes frères et sœurs Adama, Tatiana et Raïssa :** A force de courage et de persévérance, j'achève aujourd'hui un travail qui est aussi le vôtre. Puisse l'affection, la confiance et la solidarité qui nous animent rester inébranlables.

Fraternellement !

**A mes tantes ABOKON Viviane, OFFOYI Sylvie et mes cousins adorés Wilfried, Kevin et Yvan :** vous avez été une famille pour moi lors de mes études secondaires. Merci pour toute l'affection et la tendresse. Je vous aime.

**A toute la grande famille ABOKON et KIHINDO :** Puissions nous restés toujours unis.

**A mes amis d'enfance :** je ne cite pas les noms de peur d'en oublier. Je garderai toujours en souvenir les moments que nous avons passés ensemble. Que Le Tout Puissant nous garde aussi longtemps ensemble et qu'il guide nos pas sur le droit chemin.

**A mes camarades et amis :** Karim KAFANDO, Issifou NOMBRE, Gervais KINDA, Isidore KABORE, Dr Adama SAWADOGO, Dr Augustin TANGAHIRE, Dr Fidèle BIO, Dr Alima YACOUBOU, Dr Jacqueline KOUAME, Dr Aristide OUE DRAOGO, Dr Ina TRAORE, Dr Tounghin ZANGUE, Saybou SAWADOGO, Richard YOFFO, Ismaël OUEDRAOGO, Rasmene ZONGO, Ange NE NEBI, Marie Clotilde KOCOLA, Lydia TIEMTORE, Saffiatou TRAORE, Patricia OUBA. Continuons dans la voie de la consolidation de nos liens d'amitié et de fraternité et gardons toujours l'esprit d'équipe. Bonne chance à nous tous. Amicalement.

**A mes amis de l'internat de l'UFR/SDS :** Toute ma gratitude.

**A tous ceux qui se rappellent encore de moi.**

## Remerciements

---

### ***REMERCIEMENTS***

La réalisation de ce travail n'a été possible que grâce à la disponibilité et à la sincère collaboration de certaines bonnes volontés. A cet effet, nous voudrions exprimer notre profonde gratitude :

#### **Aux Professeurs Jean Baptiste NIKIEMA et Jacques SIMPORE**

Pour m'avoir accueilli au CERBA pour ce travail ;

#### **Au Docteur Charlemagne GNOULA**

Pour m'avoir si bien encadré lors de ce travail. Sincères remerciements pour les encouragements, les conseils et les suggestions dont j'ai bénéficié pour la réalisation de cette étude ;

#### **Au Professeur Eloi PALE**

Pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour les extractions, les caractérisations phytochimiques et la chromatographie sur colonne ;

#### **Au Docteur Souleymane GANABA**

Pour m'avoir apporté son aide dans la recherche et la récolte du matériel végétal ;

#### **A Tous les enseignants de l'UFR/SDS et le personnel**

Merci pour les enseignements reçus, profondes reconnaissances.

J'exprime mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance à :

**Docteur Victoire BENAO, Mr Daouda BORO** et au personnel de la pharmacie et du laboratoire de l'AVENIR

**Docteur Pierre TAOKO** et au personnel de la pharmacie TAOKO

## Remerciements

---

**Docteur Constantin DABIRE, Docteur Adama HEMA, Haina KOUNKOUNZI, Moumouni KOALA** pour leur disponibilité et leurs conseils

**Docteur Thierry PALENFO, Docteur Aristide OUEDRAOGO, Docteur Mathieu COULIBALY, Docteur Souleymane FOFANA, Docteur Florence OUEDRAOGO, Saya N'GUESSAN, Paulin KIKOUN** pour les services rendus

**Aux étudiants thésards du CERBA** : Hétéié, I ssa, Ma rtial, P rincia, Romuald pour l eur collaboration au laboratoire

**A tout le personnel du centre médical Saint Camille et du CERBA** pour leur amabilité

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie

Très cordialement

# **A NOS MAITRES ET JUGES**

**A Notre Maître et Directeur de thèse**

**Professeur Jean Baptiste NIKIEMA**

**Professeur titulaire de Pharmacognosie à l'UFR/SDS**

**Chef de département des sciences pharmaceutiques appliquées à l'UFR/SDS**

**Directeur Général de la DGPML**

**Président du conseil d'administration du centre MURAZ de BOBO**

Honorable maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de diriger ce travail. Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements précis et clairs. Votre prodigieux esprit de chercheur, votre rigueur scientifique et l'amour du travail bien fait, font de vous l'un des grands maîtres de notre faculté.

Veillez trouver ici cher Maître, l'expression de notre plus grand respect.

**A Notre Maître et Président du Jury**

**Professeur Agrégé Elie KABRE**

**Maître de conférences agrégé de Biochimie à l'UFR/SDS**

**Directeur de la coordination technique et de l'assurance qualité au  
Laboratoire National de Santé Publique**

Honorable maître, nous sommes comblés de l'immense honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos lourdes responsabilités.

Votre disponibilité, vos qualités intellectuelles, d'homme de rigueur et de discipline dans le travail forcent notre admiration.

Recevez cher Maître l'expression de notre profonde gratitude



**A Notre Maître et Juge**

**Docteur Marius LOMPO**

**Maître de Recherche de pharmacologie à l'IRSS**

**Enseignant vacataire en pharmacologie à l'UFR/SDS**

Honorable maître, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail malgré vos occupations, nous reconforte à plus d'un égard.

Vos connaissances scientifiques et votre ardeur au travail forcent notre admiration. Trouvez ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

**A Notre Maître et Codirecteur de thèse**

**Docteur Charlemagne GNOULA**

**Maitre-assistant en Chimie thérapeutique à l'UFR/SDS**

**Chercheur au CERBA**

C'est pour nous une opportunité de vous avoir eu comme encadreur.

Nous ne saurons jamais vous remercier assez pour tout le sacrifice que vous faites pour l'encadrement de vos étudiants. Vos qualités humaines et intellectuelles, votre disponibilité permanente, votre aide morale nous ont permis de mener à bout ce travail. Votre détermination, votre courage et votre rigueur font de vous un exemple dans le domaine de la recherche.

Acceptez cher maître, le témoignage de notre profond respect, notre grande considération et notre sincère reconnaissance

**A Notre Maître et Juge**

**Docteur Seydou SOURABIE**

**Enseignant vacataire de pharmacognosie à l'UFR/SDS**

**Chef de clinique du laboratoire d'analyses biomédicales du centre médical  
du camp Général Aboubacar Sangoulé LAMIZANA**

**Chargé de recherche en biochimie au département MEPHATRA de l'IRSS**

Cher maître, c'est un immense plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre simplicité, votre disponibilité sont des qualités qui sont grandes et vos connaissances scientifiques contribueront certes à améliorer ce travail.

Croyez cher Maître à nos sentiments de respect, de reconnaissance et d'admiration.

**« Par délibération, l'UFR/SDS a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation »**

## Liste des abréviations

---

### LISTE DES ABREVIATIONS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>ADN</b>              | : Acide Désoxyribonucléique                                      |
| <b>ARN</b>              | : Acide Ribonucléique  |
| <b>BHA</b>              | : Butyl Hydroxy-Anisole  |
| <b>BHT</b>              | : Butyl Hydroxy-Toluène  |
| <b>CHU-YO</b>           | : Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouedraogo             |
| <b>CH<sub>3</sub>OH</b> | : méthanol   |
| <b>CCM</b>              | : Chromatographie sur Couche Mince                               |
| <b>CERBA</b>            | : Centre de Recherche en Biologie Moléculaire Pietro Annigoni    |
| <b>CNRST</b>            | : Centre National de la Recherche Scientifique et Technologiques |
| <b>Cm</b>               | : Centimètre   |
| <b>CO<sub>2</sub></b>   | : Dioxyde de carbone   |
| <b>DPPH</b>             | : Diphényl Picryl-Hydrazyl                                       |
| <b>DMSO</b>             | : Diméthyl Sulfoxide   |
| <b>DMEM</b>             | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium                             |
| <b>EOR</b>              | : Espèces oxygénées Réactives                                    |
| <b>FBS</b>              | : Fœtal Bovine Serum   |
| <b>IARC</b>             | : Institut Américain de Recherche sur le Cancer                  |
| <b>IC<sub>50</sub></b>  | : Inhibitory Concentration 50%                                   |
| <b>ICC</b>              | : Insuffisance Cardiaque Congestive                              |
| <b>mL</b>               | : millilitre   |
| <b>MTT</b>              | : Mitochondrial Tetrazolium Test                                 |
| <b>NCI</b>              | : National Institute of Cancer                                   |
| <b>OMS</b>              | : Organisation Mondiale de la Santé                              |
| <b>ORL</b>              | : Oto-Rhino-Laryngologie   |
| <b>PBS</b>              | : Phosphate Buffered saline Solution                             |

## Liste des abréviations

---

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| <b>Rf</b>    | : Référence frontale                  |
| <b>VHB</b>   | : Virus de l'Hépatite B               |
| <b>VIH</b>   | : Virus de l'Immunodéficience acquise |
| <b>V/V</b>   | : Volume/ volume                      |
| <b>µg</b>    | : microgramme                         |
| <b>µg/ml</b> | : microgramme/litre                   |
| <b>µL</b>    | : microlitre                          |
| <b>UV</b>    | : ultra-violet                        |
| <b>°C</b>    | : degré Celsius                       |

## Liste des tableaux

---

### **LISTE DES TABLEAUX**

|  |    |
|--|----|
| Tableau I: Classification des produits chimiothérapeutiques utilisés en clinique sur base de leur mécanisme d'action.....                          | 17 |
| Tableau II : Propriétés pharmacologiques du cyclophosphamide.....  | 19 |
| Tableau III : Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes d'If.....   | 21 |
| Tableau IV : Cancers inhibés par des antioxydants chimio préventifs des fruits et légumes .  | 26 |
| Tableau V : Composition du mélange réactionnel du test de réduction du DPPH (mL).....  | 48 |
| Tableau VI : Groupes chimiques mis en évidence dans l'extrait.....   | 50 |
| Tableau V II : Valeurs d'IC50 déterminées par MT T après évaluation de l'effet de ces substances sur la croissance globale des cellules U373 ..... | 60 |

## Liste des figures

---

### **LISTE DES FIGURES**

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Les étapes de formation du cancer .....   | 6  |
| Figure 2 : Prévisions de l'augmentation de la mortalité due au cancer dans diverses régions du monde .....                    | 8  |
| Figure 3 : Répartition des cancers selon le sexe au Burkina Faso. ....  | 11 |
| Figure 4 : Structure du cyclophosphamide.....   | 18 |
| Figure 5 : Structure du paclitaxel .....  | 19 |
| Figure 6 : Structure du docetaxel .....   | 20 |
| Figure 7 : Plante entière d' <i>Adenium obesum</i> . (Jardin botanique du CNRST).....   | 28 |
| Figure 8 : Fleur d' <i>Adenium obesum</i> .....   | 28 |
| Figure 9 : Schéma de présentation d'une plaque de CCM.....  | 41 |
| Figure 10 : Schéma du développement chromatographique d'une plaque .....  | 42 |
| Figure 11 : Illustration d'une plaque 96 puits dans laquelle un test colorimétrique MTT a été réalisé .....                   | 46 |
| Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....   | 47 |
| Figure 13 : Chromatogramme de caractérisation des tanins .....  | 51 |
| Figure 14 : Chromatogramme de caractérisation des alcaloïdes.....   | 52 |
| Figure 15 : Chromatogramme de caractérisation des flavonoïdes .....   | 53 |
| Figure 16 : Chromatogramme de caractérisation des saponosides .....   | 54 |
| Figure 17 : Chromatogramme de caractérisation des anthocyanes .....   | 55 |
| Figure 18 : Chromatogramme de caractérisation des cardenolides.....   | 56 |
| Figure 19 : Chromatographie sur colonne (Amberlite XAD-7) de l'extrait méthanolique des fleurs d' <i>Adenium obesum</i> ..... | 57 |

## Liste des figures

---

|  |    |
|--|----|
| Figure 20 : Chromatogrammes de caractérisation des polyphénols (anthocyanes, flavonoïdes et tanins).....   | 57 |
| Figure 21 : Chromatogrammes de caractérisation des cardenolides de l'extrait méthanolique sec (A) et de la fraction polyphénolique (B) des fleurs d' <i>Adenium obesum</i> ..... | 58 |
| Figure 22 : Réactions de caractérisations des anthocyanes, des flavonoïdes et des tanins .....   | 58 |
| Figure 23 : Inhibition de la prolifération cellulaire globale de l'extrait méthanolique des fleurs sur la lignée U373 .....  | 59 |
| Figure 24 : Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait CH <sub>3</sub> OH des fleurs d' <i>Adenium obesum</i> .....   | 61 |
| Figure 25 : Evaluation de l'activité antiradicalaire de la fraction polyphénolique d' <i>Adenium obesum</i> et de la quercétine .....  | 62 |
| Figure 26 : Structure générale des anthocyanes .....   | 86 |
| Figure 27 : Structure générale des cardenolides.....   | 86 |



# Sommaire

---

## Sommaire

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCTION/ ENONCE DU PROBLEME .....   | 1  |
| PREMIERE PARTIE : GENERALITES .....  | 5  |
| A.GENERALITES SUR LE CANCER .....  | 6  |
| I. Le cancer .....   | 6  |
| I.1-Définition-généralités .....   | 6  |
| I.2-La cancérogenèse.....  | 6  |
| II. Epidémiologie du cancer .....  | 8  |
| II.1-Incidence et mortalité dans le monde .....                                | 8  |
| II.2-Incidence et mortalité en Afrique .....                                   | 10 |
| II. 3- Les facteurs favorisants .....  | 12 |
| III. Stratégies thérapeutiques classiques.....                                 | 13 |
| III.1- Généralités .....   | 13 |
| III.2- La chimiothérapie .....   | 14 |
| IV. Les médicaments anti-cancéreux .....                                       | 15 |
| IV.1- Classification des agents anti-cancéreux utilisés en chimiothérapie..... | 15 |
| IV.1.1- Les agents alkylants .....   | 15 |
| IV.1.2- Les agents intercalants .....  | 15 |
| IV.1.3- Les agents anti-métabolites et les inhibiteurs des topoisomérases..... | 15 |
| IV.1.4- Les poisons du fuseau mitotique.....                                   | 16 |
| IV.2- Propriétés des médicaments anti-cancéreux .....                          | 18 |
| IV.2.1- Le cyclophosphamide .....  | 18 |
| IV.2.2- Les alcaloïdes d’If.....   | 19 |
| B- GENERALITES SUR L’ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....                               | 22 |
| I. Les radicaux libres .....   | 22 |
| II. Les antioxydants .....   | 23 |
| III. Antioxydants et prévention du cancer .....                                | 24 |

# Sommaire

---

|  |    |
|--|----|
| C. GENERALITES SUR <i>ADENIUM OBESUM</i> (FORSK) ROEM SCHULT (APOCYNACEAE) ..... | 27 |
| I. Caractéristiques botaniques (Nacoulma, 1996) .....                            | 27 |
| II. Description botanique (Arbonnier, 2000).....                                 | 27 |
| III. Habitat ; distribution botanique.....                                       | 29 |
| IV. Données phytochimiques établies (Nacoulma, 1996).....                        | 29 |
| V. Données ethno pharmacologiques.....   | 29 |
| V.1. Usages thérapeutiques (Neuwinger, H.D., 2000) .....                         | 29 |
| V.2. Autres usages (Neuwinger, H.D., 1996).....                                  | 29 |
| DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE .....  | 31 |
| I.  OBJECTIFS DE L'ETUDE.....  | 32 |
| I.1. Objectif général.....   | 33 |
| I.2. Objectifs spécifiques .....   | 33 |
| II.  MATERIELS ET METHODES.....  | 34 |
| II.1. Cadre de l'étude.....  | 35 |
| II.2. Matériels et méthodes de l'étude .....                                     | 35 |
| II.2. 1 Matériels d'étude .....  | 35 |
| II.2.1.1 Matériel végétal .....  | 35 |
| II.2.1.2 Matériels d'étude phytochimique .....                                   | 36 |
| II.2.1.2.1 Matériels d'extraction et de caractérisation .....                    | 36 |
| II.2.1.2.2 Solvants et réactifs d'analyse.....                                   | 36 |
| a. Solvants d'analyse pour la CCM .....  | 36 |
| b. Substances témoins d'analyse CCM .....  | 36 |
| c. Réactifs .....  | 36 |
| II.2.1.3 Matériels pour l'étude biologique.....                                  | 37 |
| II.2.1.3.1 Lignées cellulaires et milieux de culture .....                       | 37 |
| II.2.1.3.2 Matériels de laboratoire .....  | 37 |
| II.2.1.3.3 Solvants et réactifs du test antiprolifératif .....                   | 38 |
| II.2.1.3.4 Solvants et réactifs du test antiradicalaire.....                     | 38 |

# Sommaire

---

|   |    |
|---|----|
| II.2.2 Méthodes d'étude.....  | 38 |
| II.2.2.1- Méthode d'étude phytochimique .....   | 38 |
| II.2.2.1.1 Méthode d'extraction.....  | 38 |
| II.2.2.1.2 Rendement des extractions .....  | 39 |
| II.2.2.1.3 Caractérisation phytochimique .....  | 39 |
| II.2.2.1.4 L'analyse CCM.....   | 41 |
| II.2.2.1.5 Séparation et purification des polyphénols de l'extrait.....                                 | 44 |
| II. 2.2.2 – Méthode d'étude pharmacologique .....   | 44 |
| II.2.2.2.1 La culture cellulaire .....  | 44 |
| II.2.2.2.2 Le test antiprolifératif .....   | 45 |
| II.2.2.2.3 Test « in vitro» de l'activité antioxydante : Test de réduction du radical stable DPPH ..... | 47 |
| III .RESULTATS .....  | 49 |
| III.1. RESULTATS PHYTOCHIMIQUES .....   | 50 |
| III.1.1 Rendement d'extraction .....  | 50 |
| III.1.2 Caractérisation des principaux groupes chimiques .....  | 50 |
| III. 1.3- Chromatographie sur couche mince (CCM) .....  | 51 |
| III. 1.3.1- Caractérisation des tanins.....   | 51 |
| III.1.3.2- Caractérisation des alcaloïdes .....   | 52 |
| III.1.3.3- Caractérisation des flavonoïdes.....   | 53 |
| III. 1.3.4- Caractérisation des saponosides.....  | 54 |
| III.1.3.5- Caractérisation des anthocyanes .....  | 55 |
| III.1.3.6- Caractérisation des cardenolides .....   | 56 |
| III.1.4- Séparation et purification des polyphénols .....   | 57 |
| III. 2. RESULTATS BIOLOGIQUES.....  | 59 |
| III.2.1 Activité antiproliférative de l'extrait et des substances cytotoxiques de référence.....        | 59 |
| III. 2.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire des extraits.....                                    | 60 |
| IV. DISCUSSION .....  | 63 |
| IV.1. Le rendement de l'extraction.....   | 64 |

## Sommaire

---

|   |    |
|---|----|
| IV.2. Le screening phytochimique .....                              | 64 |
| IV.3- L'analyse CCM.....  | 65 |
| IV.4. Etudes biologiques .....                                      | 66 |
| IV.4.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait ..... | 66 |
| IV.4.2. Etude de l'effet antiprolifératif de l'extrait .....        | 68 |
| V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....                                 | 70 |
| V-1. CONCLUSION .....   | 71 |
| V-2. PERSPECTIVES.....  | 72 |
| REFERENCES.....   | 73 |
| ANNEXES .....   | 84 |
| SERMENT DE GALIEN .....   | 87 |
| RESUME.....   | 88 |

**INTRODUCTION/ ENONCE DU PROBLEME**

## Introduction/Enoncé du problème

---

Le cancer est une maladie caractérisée par une croissance et une propagation incontrôlées des cellules anormales. Il perturbe les activités cellulaires qui sont nécessaires au développement et au maintien des organismes multicellulaires : notamment la croissance, la différenciation, la mort cellulaire programmée et l'intégrité des tissus (Mareel et Lerooy, 2003).

C'est une pathologie maligne, qui implique trois étapes distinctes mais interconnectées : l'initiation (cellule normale qui se transforme en cellule initiée), la promotion (cellule initiée qui devient une cellule pré-néoplasique), la progression (cellule pré-néoplasique qui devient une cellule néoplasique) (Thangapazham et al, 2006).

Les principaux facteurs de risque sont le tabagisme, la consommation d'alcool, les infections chroniques liés aux HBV, HCV, HPV (respectivement le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C et le virus du papillome humain), le mode de vie et l'alimentation.

Ainsi le cancer est devenu un véritable problème de santé publique dans le monde : il représente la deuxième cause de mortalité dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires.

En effet, le cancer est une maladie considérée comme une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004, (soit 13% de la mortalité mondiale) et 7,8 millions en 2008 (CIRC, 2008). L'American Cancer Society (ACS) estime à 1,5 millions le nombre de nouveaux cas de dépistés en 2009, et à 560.000 le nombre de malades morts de leur cancer en 2009 (Jemal et al, 2009). D'après les projections, le nombre de décès dû au cancer devrait augmenter pour atteindre 17 millions en 2030 à l'échelle mondiale (Lingwood et al, 2008).

Malgré l'idée selon laquelle le cancer touche principalement les populations des pays riches, la réalité est toute autre, plus de 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à faible revenu ou à revenu intermédiaire (CIRC, 2008).

En Afrique, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 667.000 dont 314.000 chez les hommes et 353.000 chez les femmes avec 5180.000 décès dont 252.000 hommes et 266.000 femmes (Boyle P. & Levin B., 2008).

Au Burkina Faso, le cancer constitue la troisième cause de mortalité après les maladies infectieuses et les maladies cardio-vasculaires (OMS, 2005). Ainsi, en 2005, les cancers représentaient 3,3% des causes de décès au Burkina Faso ; et représenteraient en l'an 2030 environ 6,0% des causes de décès.

## Introduction/Enoncé du problème

---

Toutefois, face à ce fléau des solutions existent. Ainsi, on pourrait réduire la morbidité et/ou la mortalité due à cette maladie en appliquant des stratégies fondées pour la prévention, le diagnostic précoce et la prise en charge des malades. Le traitement du cancer a pour but de guérir, de prolonger la vie et d'améliorer la qualité de vie des patients. Il existe trois types de stratégies thérapeutiques anticancéreuses à savoir la stratégie chirurgicale, la stratégie radiothérapeutique et la stratégie médicale comprenant l'immunothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie.

Par ailleurs, le traitement du cancer est onéreux, compliqué et difficile d'accès pour la population. La prise en charge des cancers requiert des combinaisons de plusieurs classes de médicaments anticancéreux (Chauvergne, 2001). Ceci expose le patient à la cumulation des effets indésirables (souvent graves) des différents médicaments associés.

Au Burkina Faso, selon la Direction des Etudes et de la Planification (D.E.P) du ministère de la santé il n'existerait pas de centres spécialisés dans le traitement des cancers et la stratégie nationale de prise en charge est en cours de réalisation.

Ainsi des solutions visant à réduire l'incidence du cancer, proposent des mesures de prévention. En effet, le maintien de l'équilibre oxydant/antioxydant permet de préserver les performances physiologiques de l'organisme et de prévenir la survenue des pathologies dues au stress oxydatif comme le cancer. A cet effet un apport exogène d'antioxydants serait très bénéfique à l'organisme.

Les antioxydants joueraient un rôle dans la prévention mais aussi dans la réduction du cancer. De nombreuses études ont montré que les composés antioxydants réduisent le risque de nombreux cancers (Kim et al, 2000 ; Paiva et Russel, 1999 ; Zheng et al, 1997).

On dispose des antioxydants de synthèse (le butyl hydroxy-toluène BHT, le butyl hydroxy-anisole) et naturels (des oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, des vitamines C et E, des composés végétaux comme le carotène, les anthocyanes, polyphénols...) (Portes E., 2008). Cependant la toxicité des antioxydants de synthèse (BHT, BHA) limite leur utilisation.

Les antioxydants les mieux tolérés par l'organisme et les plus efficaces proviennent des végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968).

Face à ce fléau, aussi préoccupant dans le monde entier, de nombreux travaux ont conduit à d'énormes progrès sur la recherche du traitement du cancer. Ainsi, Vanquaquebeke et al (2005) et Mijatovic et al (2006, 2007) ont montré l'activité anti tumorale de cardenolides (cardiotoniques stéroïdiques) extraits des écorces de racines de *Calotropis procera*.

## Introduction/Enoncé du problème

---

*Adenium obesum*, une plante ornementale de la famille des Apocynaceae, très répandue ; riche en anthocyanes (composés phénoliques) et en cardenolides (Nacoulma, 1996) a retenue notre attention.

Certains cardenolides (cardiotoniques stéroïdiques) inhiberaient fortement la prolifération et la migration des cellules tumorales (Lefranc et al, 2007) et peuvent représenter de nouvelles molécules pouvant traiter les glioblastomes.

Certains composés phénoliques présentent un pouvoir antioxydant très marqué (Ribéreau-Gayon, 1968). Ils joueraient un rôle intéressant dans la prévention du cancer.

Ainsi nous nous proposons d'explorer et d'étudier in vitro les propriétés antiprolifératives et antiradicalaires des extraits de fleurs d'*Adenium obesum* (Apocynaceae).



## **PREMIERE PARTIE : GENERALITES**

## A.GENERALITES SUR LE CANCER

### I. Le cancer

#### I.1-Définition-généralités

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'une même cellule, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques qui lui permettent de se diviser indéfiniment.

« Le Cancer » est un terme général désignant toute maladie pour laquelle certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Les nouvelles cellules résultant de cette prolifération incontrôlée peuvent former une tumeur maligne (néoplasme) et se propager à travers le corps.

Un tissu tumoral présente en général une croissance cellulaire supérieure à celle du tissu normal homologue. Ceci s'explique par une division accrue et surtout des mécanismes des morts cellulaires diminués ou inhibés chez les cellules tumorales en regard des cellules normales du tissu dont elles sont issues. La capacité des cellules cancéreuses à envahir les tissus avoisinants et à former des tumeurs secondaires confère à la tumeur son caractère malin (Hayot ; 2006).

#### I.2-La cancérogenèse

On peut distinguer trois étapes dans la genèse d'un cancer dont les deux premières sont obligatoirement successives sans quoi le processus cancéreux s'arrête : l'initiation, la promotion tissulaire et la progression (Figure 1).

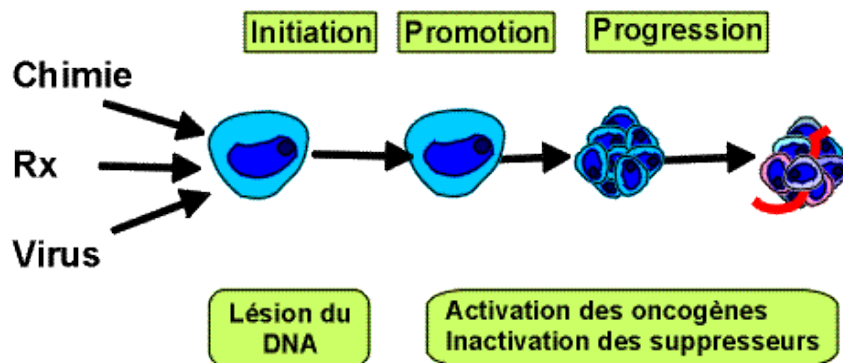


Figure 1: les étapes de formation du cancer (Oudard, 2005)

## Généralités sur le cancer

---

✓ **L'initiation** : c'est le passage de la cellule normale à la cellule potentiellement cancéreuse : il s'agit donc d'une transformation maligne à l'échelon cellulaire, mais dont l'apparition sous forme d'une tumeur nécessite une deuxième étape, la promotion ; C'est un phénomène irréversible pouvant apparaître après un contact avec le cancérigène (physique, chimique, viral). Il est lié à une modification du DNA : mutation ou surtout translocation d'un fragment entier.

✓ **La promotion** : c'est la phase de stimulation du clone transformé, « initié », aboutissant à la phase de croissance tumorale pluri-cellulaire ; Elle doit survenir après l'initiation pour entraîner l'apparition de la tumeur cancéreuse. Son rôle est de maintenir l'initiation, et de lui permettre de s'exprimer. Elle est caractérisée par une grande instabilité génomique et une augmentation de la perte d'homéostasie. La cellule cancéreuse perd la capacité à « reconnaître sa vieillesse », initier sa mort et réparer les dommages de son ADN.

✓ **La progression** : elle correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique. La capacité de s'étendre, localement et à distance, sous forme de métastase est une propriété spécifique des tumeurs malignes.

Une métastase est une tumeur maligne constituée de cellules issues de la tumeur primitive et se développant à distance de celle-ci. Le mécanisme de dissémination commence par le détachement des cellules tumorales de la tumeur primitive puis ensuite les cellules libérées vont emprunter diverses voies telles que la voie lymphatique, vasculaire et intracavitaire.

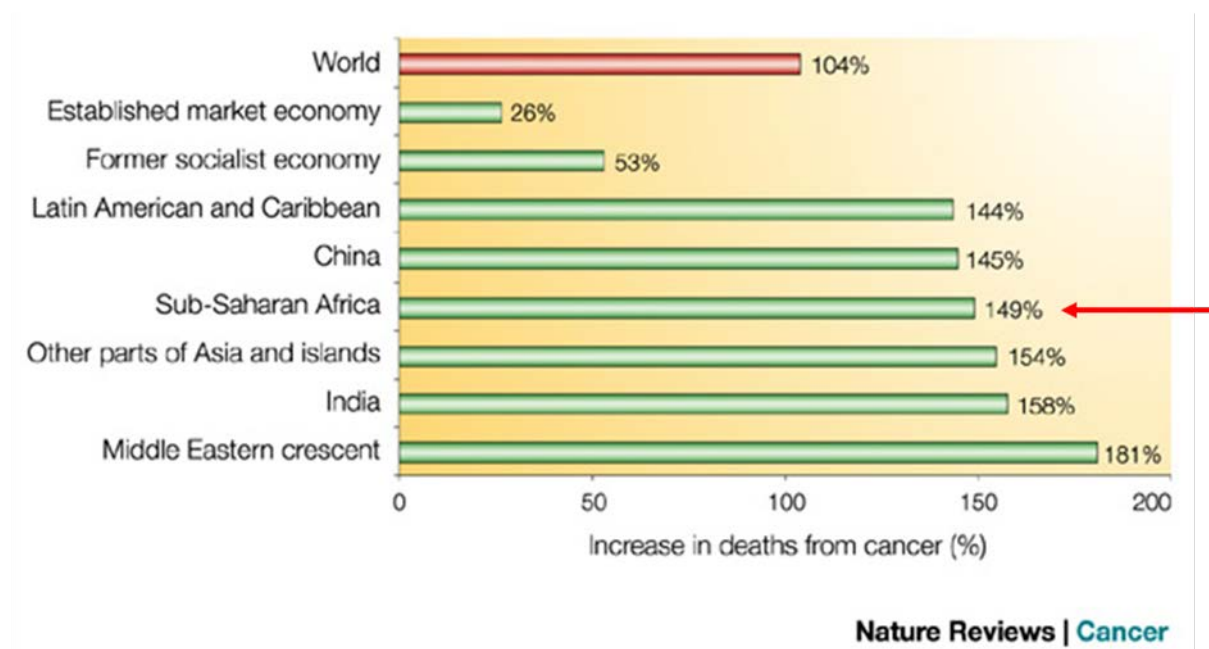
C'est une étape essentielle à la croissance des tumeurs primaires et à la formation de métastases puisqu'elle permet aux cellules cancéreuses d'accéder à la circulation sanguine (Folkman ; 2003). En effet, tout comme dans les tissus normaux, les tumeurs ont besoin d'un apport adéquat en oxygène et en nutriments.

## II. Epidémiologie du cancer

### II.1-Incidence et mortalité dans le monde

L'incidence mondiale du cancer a plus que doublé en 30 ans. Environ douze millions de cas de cancer sont déclarés chaque année dans le monde avec sept millions de décès (Boyle P. & Levin B., 2008).

On estime à vingt cinq millions le nombre de patients vivants avec un cancer. La fréquence du cancer pourrait augmenter de 50% dans le monde avec quinze millions de nouveaux cas par an en 2020 (OMS, 2007) du au vieillissement de la population dans les pays développés comme ceux en voie de développement. En 2030, les prévisions sont évaluées à 75 millions de personnes malades avec 17 millions de décès dont 60% surviendront dans les pays en développement (Lingwood et al, 2008).



**Figure 2 : Prévisions de l'augmentation de la mortalité due au cancer dans diverses régions du monde (Rastogi et al, 2004)**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la mortalité due au cancer augmenterait d'environ 104% dans le monde d'ici à 2020. Les plus fortes progressions seront observées

## Généralités sur le cancer

---

dans les pays en voie de développement (Amérique latine, Asie, Moyen-Orient, Afrique). (Rastogi et al, 2004).

Le cancer de poumon est le plus fréquent dans le monde avec 1,2 millions de nouveaux cas par an suivi du cancer de sein (1 million de cas). Il semble aussi être le plus mortel avec 17,8% de décès dans le monde suivi du cancer de l'estomac (10,4%) et du cancer de foie (8,8%).

En effet, les principaux types de cancer responsables de la mortalité cancéreuse sont les suivants : cancer du poumon (1,3 millions de décès) ; cancer de l'estomac (803 000 décès) ; cancer du foie (639 000 décès) ; cancer du colon (610 000 décès) ; cancer du sein (519 000 décès) (OMS, 2002)

### II.2-Incidence et mortalité en Afrique

Dans les pays en voie de développement, plus de six millions de nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année avec plus de quatre millions de décès (OMS, 2005).

En Afrique, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 667000 dont 314000 chez les hommes et 353000 chez les femmes avec 518 000 décès dont 252 000 hommes et 266000 femmes (Boyle P. & Levin B., 2008).

Les cancers les plus courants et principales causes de décès sont le sarcome de Kaposi suivi du cancer du foie et de la prostate chez les hommes ; le cancer du col de l'utérus et de sein étaient les plus fréquents et mortels chez les femmes (Boyle P. & Levin B., 2008).

Au Sénégal, l'incidence du cancer est estimée à 200 00 nouveaux cas par an tandis qu'en Algérie elle est de 30000 cas par année (Kourta D., 2007).

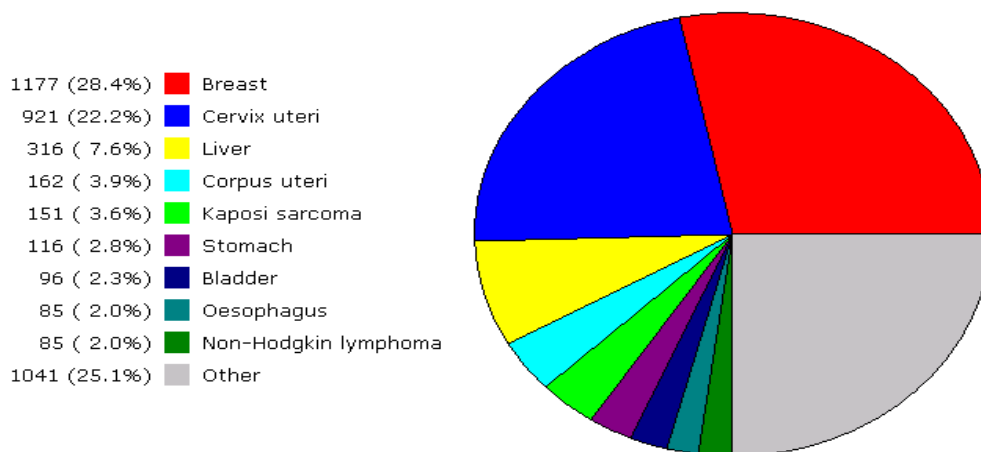
Au Burkina Faso, le cancer constitue la troisième cause de mortalité après les maladies infectieuses et les maladies cardio-vasculaires ; il touche de plus en plus de burkinabé (OMS, 2005). Le Burkina Faso dispose de peu de données épidémiologiques sur le cancer.

Le cancer a causé environ 8000 morts au Burkina Faso en 2005 parmi lesquels 4700 avaient moins de 70 ans (OMS ; 2005). Le taux de mortalité du au cancer qui était en 2005 de 3,3% pourrait passer à 6% d'ici à 2020 (OMS ; 2005).

Chez les femmes en 2005, le cancer du sein était le plus fréquent et a constitué la première cause de mortalité par le cancer. Chez les hommes en 2005, le cancer de la prostate était le plus dominant et constituait la première cause de mortalité par le cancer.

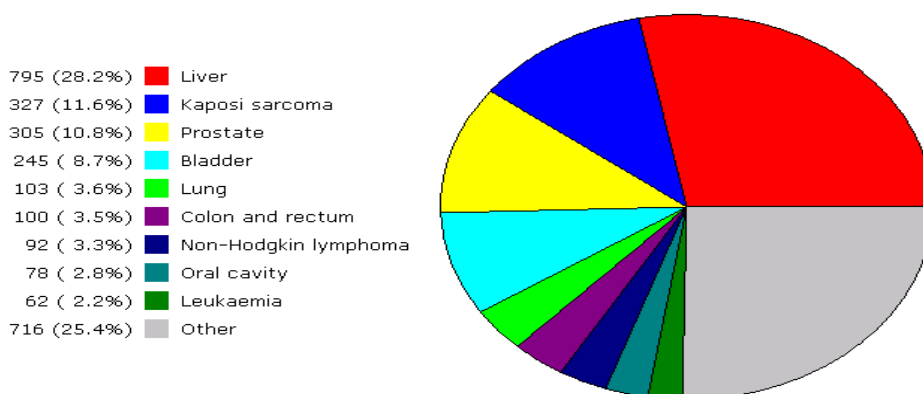
## Généralités sur le cancer

Burkina Faso  
New cancer cases (all ages), Females  
Total: 4150



GLOBOCAN 2002, IARC

Burkina Faso  
New cancer cases (all ages), Males  
Total: 2823



GLOBOCAN 2002, IARC

**Figure 3 : Répartition des cancers selon le sexe au Burkina Faso.**

### II. 3- Les facteurs favorisants

Le fardeau du cancer est plus élevé dans les sociétés riches en raison d'une forte incidence de tumeurs associées au tabagisme et au mode de vie occidental (OMS, 2005). En effet, le tabagisme est la principale cause de décès lié au cancer ; il entraîne le plus souvent un cancer de poumon et parfois de cancers de larynx, de la cavité buccale, du pharynx, de l'œsophage (IARC, 1986).

L'alcool représente une cause de cancers buccaux, œsophagiens et hépatiques (OMS ; 1999).

Certains composés chimiques ( les amines aromatiques, le benzène, l'amiante, les métaux, le goudron de houille, les pesticides) présents sur certains lieux de travail sont associés à une augmentation du risque de cancer chez les travailleurs. Ils affectent les poumons, la peau, le foie et la vessie (Steward & Kleihues, 2005).

L'exposition aux rayonnements ionisants de source naturelle, industrielle ou médicale, peut entraîner une grande variété de néoplasmes (leucémie, cancer de sein, et de thyroïde) (IARC, 2000). Le rayonnement solaire est la source la plus importante d'irradiation aux ultraviolets et entraîne plusieurs types de cancer de peau (IARC, 1992).

Le tabagisme, la consommation d'alcool, la consommation insuffisante de fruits et de légumes et les infections chroniques liées au x virus, bactéries ou parasites ( le virus de l'hépatite B (VHB) pour le cancer de foie, le virus du papillome humain (HPV) pour le cancer du col de l'utérus, le VIH pour le sarcome de Kaposi, la bactérie Helicobacter pour le cancer de l'estomac et le parasite Schistosoma pour le cancer de la vessie) sont les principaux facteurs de risques dans les pays en développement en particulier au Burkina Faso (CIRC,2008).



## III. Stratégies thérapeutiques classiques

### III.1- Généralités

Les traitements antitumoraux visent à ralentir la progression de la maladie, voire à la guérir. Ces traitements peuvent être dirigés contre la cellule tumorale ou d'autres éléments impliqués dans la prolifération et l'invasion comme l'endothélium, le système immunitaire. Au niveau de la cellule tumorale, la cible peut être l'ADN, l'ARN ou les protéines (Espinosa et al ; 2003).

Il existe trois types de stratégies thérapeutiques anticancéreuses dites « classiques » (Baudisson et al ; 2006) :

- ✓ **La stratégie chirurgicale** : qui permet d'extraire la tumeur  
Elle a pour but l'élimination de la tumeur par ablation. Elle est à visée curative contre les cancers solides en cas de diagnostic précoce de la tumeur primitive, et à visée palliative en cas de diagnostic tardif pour des cancers déjà métastatiques ;
- ✓ **La stratégie radio thérapeutique** : qui utilise des rayons X pour éradiquer la tumeur  
Elle complète dans certains cas le traitement chirurgical. Ce traitement utilise des rayons X, des électrons, des protons ou neutrons, émis par une source externe qui irradie la tumeur. La radiothérapie agit soit en créant des lésions suffisantes pour tuer directement les cellules, soit en induisant l'apoptose de la cellule.
- ✓ **La stratégie médicale** : qui a pour but d'inhiber la croissance tumorale au moyen de médicaments. Cette stratégie médicale comprend : l'immunothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie très utilisée.
  - ◆ L'immunothérapie fait appel à deux mécanismes : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. La première consiste en un développement d'anticorps dirigés spécifiquement vers les antigènes de surface des cellules tumorales, déclenchant des attaques qui détruisent les cellules cibles. La deuxième correspond à l'utilisation de vaccins anti-tumoraux non toxiques qui serviraient à induire et à maintenir des réponses immunitaires ciblées spécifiquement contre la tumeur ;
  - ◆ L'hormonothérapie consiste à antagoniser l'effet pro-tumoral de divers types d'hormones, dont les œstrogènes dans le cas du cancer de sein (Lewis et al, 2004) et les androgènes dans le cas du cancer de la prostate (Liebermann, 2002).

### III.2- La chimiothérapie

La chimiothérapie est une administration orale ou intraveineuse de molécules anticancéreuses qui transitent dans le corps par la circulation sanguine, ou au contraire qui est délivré de manière massive dans un site précis atteint par un cancer. Le but de la chimiothérapie est d'enrayer ou tout au moins de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales. Malheureusement, les molécules cytotoxiques n'empêchent pas la dissémination métastatique des cellules cancéreuses.

Les premiers médicaments utilisés en chimiothérapie mis au point dans les années 1950 restent les plus efficaces. Il s'agit entre autres du 5-fluorouracile, du méthotrexate et du cyclophosphamide. C'est dans les années 1960 que sont découvertes les premières molécules anticancéreuses d'origine naturelle (vincristine, vinblastine et paclitaxel).

Actuellement le but de la chimiothérapie anticancéreuse est une thérapie antiproliférative et/ou pro-apoptotique.

La combinaison de médicaments cytotoxiques traite efficacement certains cas de cancers. Les traitements actuels échouent souvent parce qu'ils entraînent d'importants effets secondaires qui limitent les doses administrables. Une autre faiblesse fondamentale de la chimiothérapie est la capacité des cellules tumorales à développer une résistance aux agents antitumoraux par activation de voies de survie.

En effet, certaines cellules tumorales migrantes acquièrent une résistance à l'apoptose, les rendant insensibles aux traitements cytotoxiques classiques (Lefranc et al, 2005).

La chimiothérapie peut être appliquée de manière adjuvante à la chirurgie tout comme la radiothérapie.

Le traitement chimiothérapeutique actuel du cancer fait appel à une majorité de produits d'origine naturelle : près de 60% de médicaments antitumoraux proviennent de végétaux, animaux et micro-organismes (Hellman et Vokes, 1996) qui sont pour la plupart des antimétabolites.

## **IV. Les médicaments anti-cancéreux**

### **IV.1- Classification des agents anti-cancéreux utilisés en chimiothérapie**

Il existe cinq grandes classes de médicaments utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse.

Il s'agit des agents alkylants, des agents intercalants, des agents anti-métabolites, des inhibiteurs de topoisomérases et des poisons du fuseau mitotique (Tableau I).

#### **IV.1.1- Les agents alkylants**

Les agents alkylants sont des composés capables de fixer un groupe alkyl ( $R-CH_2$ ) sur des acides nucléiques (ADN) ou des protéines (Espinosa et al, 2003). Ils se fixent sur deux sites proches pour créer des ponts (intra ou inter-brins) dans les chaînes de l'ADN et créent des lésions complexes, ce qui peut entraîner un arrêt du cycle cellulaire, une mort cellulaire par apoptose et l'inhibition de la croissance tumorale (Espinosa et al, 2003).

Les agents alkylants appartiennent à plusieurs familles chimiques différentes. On peut citer comme exemple, les mustardes azotées (chlorambucil, busulfan, melphalan) les dérivés du Platine (Cisplatine, Carboplatine) (Espinosa et al, 2003).

#### **IV.1.2- Les agents intercalants**

C'est une classe d'agents anti-cancéreux qui agit par insertion d'une molécule aromatique plane dans la double hélice de l'ADN (Hurley 2002). Il s'ensuit un blocage de la réplication de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire puis la mort de la cellule. On peut citer en exemple la doxorubicine (Hurley 2002).

#### **IV.1.3- Les agents anti-métabolites et les inhibiteurs des topoisomérases**

Les topoisomérases sont des enzymes qui modifient le degré d'enroulement de l'ADN en induisant des cassures transitoires et parfaitement régulées afin d'assurer la réplication de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérases et les agents anti-métabolites agissent

indirectement sur l'ADN en bloquant des enzymes impliquées dans la synthèse ou la réplication de l'ADN.

Les inhibiteurs de ces enzymes empêchent la réparation des cassures, provoquant un arrêt du cycle cellulaire pouvant conduire à une mort cellulaire programmée de type I, c'est-à-dire l'apoptose.

### **IV.1.4- Les poisons du fuseau mitotique**

Les poisons du fuseau mitotique empêchent la division cellulaire par inhibition de la formation du fuseau mitotique. Les premières molécules de cette famille sont d'origine naturelle et furent découvertes dans les années 1960. Ces molécules, en se liant à la tubuline, inhibent sa polymérisation, ce qui empêche la formation des microtubules (Espinosa et al, 2003).

## Généralités sur le cancer

---

**Tableau I: Classification des produits chimiothérapeutiques utilisés en clinique sur la base de leur mécanisme d'action**

| <b>Classe pharmacologique</b>              | <b>Mécanisme d'action</b>  | <b>Exemples</b>  |
|--|--|--|
| Les anti-métaboliques                      | Interfèrent avec des enzymes ou métabolites cellulaires essentiels à la division cellulaire.   | Gemcitabine, capécitabine, fluorouracile, métrotrexate   |
| Les agents alkylants                       | Agissent par alkylation des nucléotides empêchant la réplication de l'ADN, ce qui bloque le cycle cellulaire et entraîne la mort cellulaire. | Cyclophosphamide, chlorambucil, dacarbazine, busulfan, cisplatine et carboplatine                |
| Les antibiotiques cytotoxiques             | Agissent par divers mécanismes incluant l'inhibition de la topoisomérase II, ou l'intercalation dans la chaîne d'ADN.                        | Anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine), épirubicine, idarubicine, bléomycine             |
| Les poisons du fuseau mitotique            | Bloquent les cellules au cours de la division cellulaire.  | Vinblastine, vincristine, vinorelbine, vindesine, paclitaxel, docetaxel                          |
| Les inhibiteurs des topoisomérases I ou II | Inhibent l'action de cette enzyme et interfère dans la réplication de l'ADN.   | Podophyllotoxines (etoposide et teniposide), dérivés de Camptothécine (topotecan et irinotecan). |

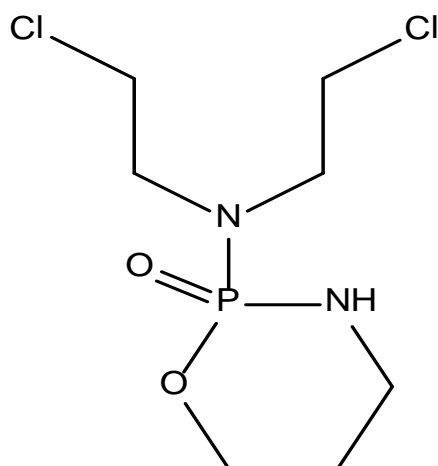
### IV.2- Propriétés des médicaments anti-cancéreux

Pour ce travail, nous avons choisi de nous intéresser particulièrement au cyclophosphamide et aux alcaloïdes d'If car ils appartiennent à la nomenclature des médicaments anti-cancéreux du Burkina Faso et aussi très demandés et plus accessibles.

#### IV.2.1- Le cyclophosphamide (ENDOXAN®)

Le cyclophosphamide est un agent alkylant appartenant à la famille des moutardes azotées. Il agit par alkylation des nucléotides empêchant la réplication de l'ADN, ce qui bloque le cycle cellulaire et entraîne la mort de la cellule.

##### ✓ Structure



**Figure 4 : Structure du cyclophosphamide**

##### ✓ Propriétés pharmacologiques

Le tableau ci-dessous reprend les indications, la voie d'administration, la posologie, les effets secondaires et contre indications du cyclophosphamide.

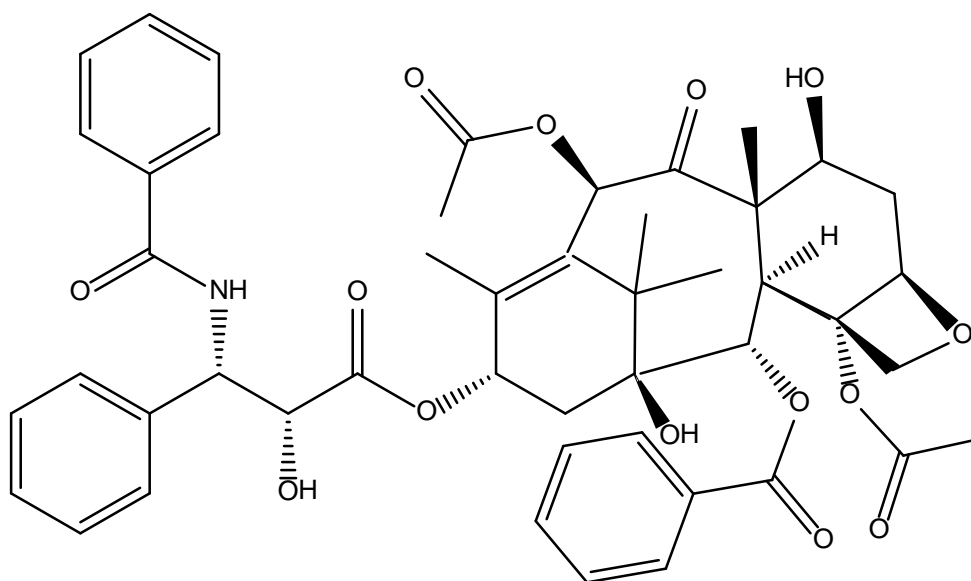
**Tableau II : Propriétés pharmacologiques du cyclophosphamide**

| Spécialité                               | Indications   | Voie<br>d'administration<br>et posologie   | Effets<br>secondaires   | Contre-<br>indications   |
|--|---|--|---|--|
| Cyclophosphamide<br>ENDOXAN <sup>®</sup> | Lymphomes<br>malins<br>hodgkiniens<br>ou non,<br>cancer du<br>sein, de<br>l'ovaire, du<br>testicule | IV, orale<br>300-800<br>mg/m <sup>2</sup> /jour en<br>cycles de 1 à 5<br>jours tous les 21<br>à 30 jours | Leucopénie,<br>réactions<br>allergiques,<br>alopécie,<br>nausées et<br>vomissements | Insuffisance<br>rénale<br>sévère,<br>grossesse et<br>allaitement |

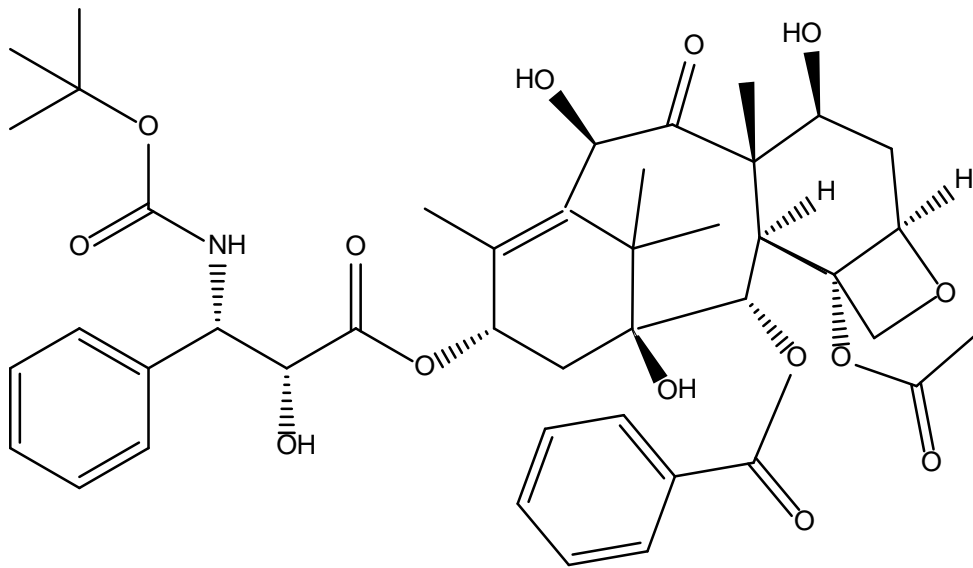
### IV.2.2- Les alcaloïdes d'If

Ce sont des taxanes ou taxoides. Ils sont constitués par le paclitaxel et un dérivé hemisynthétique : le docetaxel.

Le paclitaxel agit sur la polymérisation des tubulines tandis que le docetaxel inhibe le désassemblage des microtubules.



**Figure 5 : Structure du paclitaxel**



**Figure 6 : Structure du docetaxel**

✓ Propriétés pharmacologiques

Le tableau ci-dessous reprend les spécialités, les indications, la voie d'administration, la posologie, les effets indésirables et les contre-indications des alcaloïdes d'If



## Généralités sur le cancer

---

**Tableau III : Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes d'If**

| Molécules                | Spécialités           | Indications                            | Voie d'administration et posologie                                   | Effets secondaires  | Contre-indications       |
|--------------------------|-----------------------|--|--|---|--------------------------|
| <i><b>Paclitaxel</b></i> | Taxol <sup>®</sup>    | Cancer du sein, carcinome de l'ovaire, | I.V 135 -175mg/ m <sup>2</sup> en perfusion<br>toutes les 3 semaines | neutropénie, neuropathie périphérique, troubles cardiovasculaires, alopecia, nausées, vomissements, | Grossesse et allaitement |
| <i><b>Docetaxel</b></i>  | Taxotère <sup>®</sup> | Cancer du sein                         | I.V 100mg/ m <sup>2</sup><br>toutes les 3 semaines                   | neutropénie, réactions d'hypersensibilité, réactions cutanées, rétention hydrique, etc.             | Grossesse et allaitement |

## B- GENERALITES SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

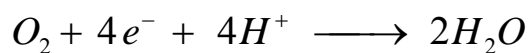
### I. Les radicaux libres

Dans les conditions normales, notre organisme produit en permanence des molécules oxydantes qui sont des formes hautement réactives le plus souvent dérivées de l'oxygène. Ce sont des radicaux libres.

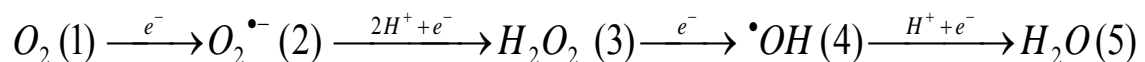
Ce sont des espèces chimiques (atomes et molécules) possédant un électron célibataire ; cette propriété les rend aptes à réagir avec des molécules lors des réactions en chaînes (Lehucher-Michel et al, 2001).

Ce sont des molécules instables en quête d'électrons et donc susceptibles de réagir immédiatement avec tous les constituants de la cellule (ADN, protéines, lipides) et de provoquer de graves altérations voire la mort de la cellule (Halliwell, 1994).

Les radicaux libres ont diverses origines physiologiques dont la principale est la réduction de l'oxygène ( $O_2$ ) en eau. Physiologiquement, l'incorporation de 4 électrons sur la molécule d'oxygène pour former de l'eau s'effectue par deux voies distinctes. La première, qui prédomine largement (95%), consiste en une réduction tétravalente de l'oxygène et met en jeu le système de transfert des électrons de la membrane interne des mitochondries (Lattier, 2001)



Il existe cependant, une voie minoritaire (5%) de réduction de l'oxygène, au cours de laquelle diverses espèces réactives de l'oxygène (EOR) sont formées :



(1) : Oxygène ; (2) : anion superoxyde ; (3) : peroxyde d'hydrogène ; (4) : radical hydroxyle ; (5) : eau

## Généralités sur l'activité antioxydante

---

On distingue deux grandes classes de radicaux libres:

- ◆ Les radicaux libres primaires directement formés à partir de l'oxygène ; ils sont les plus nocifs.

Ce sont : le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ), le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulier ( $O_2$ ) ... (Bartosz, 2003).

- ◆ Les radicaux libres secondaires : ils sont formés par l'action d'un radical libre primaire sur un composant cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines).

L'environnement ( radiation U V, pollution de l'air, le tabac, l'exposition au soleil), l'alcool, sont le plus souvent à l'origine de la formation des radicaux libres.

Dans ces conditions, notre organisme subit un stress oxydant ; c'est-à-dire que la production de radicaux libres primaires augmente très fortement d'où une oxydation de ses constituants cellulaires qui engendrera la formation de radicaux libres secondaires (ROO $\cdot$ ). Ces radicaux libres sont capables de réactions d'oxydations en chaînes à l'origine de la destruction de cellules pouvant entraîner de nombreuses pathologies comme le cancer, la cataracte, le vieillissement accéléré... (Sorg, 2004).

### II. Les antioxydants

Les antioxydants se définissent comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Metizi, 2009). Ils inhibent l'initiation ou la propagation de la chaîne de réaction et sont capables de prévenir ou de réparer les dommages provoqués. Ils agissent par l'un ou plusieurs des mécanismes suivants : réduction en donnant des atomes d'hydrogène, chélation des métaux pro-oxydants, inhibition de certaines enzymes (cytochromes P 450, lypooxygénases, cyclooxygénases), impliquées dans la génération de radicaux libres (Lukacinova et al, 2008)

Ce sont des molécules qui sont capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permettent de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

## Généralités sur l'activité antioxydante

---

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignées de défense :

- **Les antioxydants primaires**

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette lignée de défense est constituée des superoxydes dismutases (**SODs**), de la catalase et de la peroxydase (glutathion et ascorbate).

Ces enzymes agissent sur les radicaux libres primaires puisqu'elles permettent la transformation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en produits non toxiques.

- **Les antioxydants secondaires**

Cette deuxième lignée de défense complémentaire consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense précédents.

Ce sont des molécules exogènes fournies par l'alimentation comme par exemple la vitamine A, C ou E, les polyphénols (les flavonoïdes, les tanins, les coumarines), les oligo-éléments (le sélénium, le cuivre, le zinc, le manganèse) la beta-carotène...

### **III. Antioxydants et prévention du cancer**

Les radicaux libres de l'oxygène constituent des espèces très réactives mais indispensables à l'organisme. Ils augmentent dans l'organisme lors d'une infection, d'une inflammation et lors d'une exposition à des facteurs environnementaux (pollution, fumée de tabac, irradiation U V) où le stress oxydant (Kocchilin-Ramonatxo, 2006). Le stress oxydant est un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres oxygénés. Il est responsable de lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides). Ces dommages entraînent plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète, la cataracte, l'artériosclérose, le vieillissement (Valko et al, 2006).

## Généralités sur l'activité antioxydante

---

Notre organisme dispose de systèmes de défense contre cette production accrue de radicaux libres : ce sont les antioxydants qui protègent les cellules contre les dommages causés par ces radicaux libres.

Les antioxydants les neutralisent en leur donnant un électron arrêtant ainsi le processus.

Ainsi les antioxydants protègent les molécules organiques (graisses ou l'ADN) de l'oxydation et semblent jouer un rôle protecteur contre la cancérogenèse.

Les études de laboratoires sur les cultures cellulaires et les animaux ont montré que les antioxydants tels que la quercétine, la curcumine, le resveratrol et les catéchines inhibent la carcinogénèse (Borek C., 1997, 2004).

Le laboratoire EXPERENTIA aux Etats unis a montré qu'après trente-trois semaines d'exposition à un produit chimique cancérigène, les animaux dont la nourriture contenait des antioxydants dont les vitamines E et C, développèrent à 50%, moins de cancers de peau que ceux qui n'avaient reçus aucune protection.

En Chine, une étude a montré que la combinaison de sélénium (50 mg), beta-carotène (15 mg) et de vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol 30 mg) réduit de manière significative le risque de souffrir de cancers gastriques (Vitarmo J. et coll. ; 2003).

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation accrue de fruits, légumes et autres aliments qui contiennent des antioxydants peut protéger contre les dommages de l'ADN qui semblent initier la cancérogenèse (Wlodek et al, 2000).

La réduction du risque de cancer de prostate est associée à la prise régulière de légumes de couleur jaune très riches en caroténoïdes et de tomates riches en lycopène (Smith-Warner et al, 1999). La consommation de légumes du genre *Allium* (oignons, ail) riches en composés antioxydants organosulfurés et du sélénium réduirait le risque de cancer de la prostate et des cancers gastro-intestinaux (Steinmetz KA, 1999 ; Borek C., 2001 ; Greenwald P. et al, 2001).

Les antioxydants contenus dans les fruits, légumes et autres aliments sont très nombreux. Ainsi on retrouve :

- Vitamine C : orange, goyave, citron, chou, papaye, fraise...
- Vitamine E : huile de tournesol, de soja, œuf, beurre...
- Vitamine A : foie, œuf, lait...
- Sélénium : poisson, viande, œuf, pain...

## Généralités sur l'activité antioxydante

---

- Polyphénols (tanins, flavonoïdes) : vin, thé...
- Beta-carotène : patate, carotte, mangue, chou...
- Lycopène : tomate, pastèque, pamplemousse...

**Tableau IV : Cancers inhibés par des antioxydants chimio préventifs des fruits et légumes** (Reddy L. et al, 2003).

| Source           | Antioxydants   | Cancers inhibés  |
|------------------|--|--|
| Huiles végétales | Vitamine E   | Cancers de la peau (Paiva & Russell, 1999 ; Stahl et al ,2000)   |
| Carottes         | $\alpha$ - et $\beta$ - Carotène, composés phénoliques | Cancers du pancréas, du colon, du sein et du foie (Cheng et al ,2001 ; Eberhardt et al ,2000 ; King et al ,1997 ; Nishino et al ,2000) |
| Tomates          | Lycopène, vitamine C                                   | Leucémie, cancer du poumon (Giovannucci, 1999 ; Hecht et al ,1999 ; Kim et al ,2000 ; Watzl et al ,1999)                               |
| Ail, oignons     | Flavonoïdes, vitamine C, sélénium                      | Cancer de l'estomac (Barch et al ,1996 ; Zheng et al ,1997)  |
| Haricot          | Composés phénoliques                                   | Cancer induit par les aflatoxines (Cardador-Martinez et al, 2002 ; Galvano et al, 2001)  |

Ainsi un apport de s antioxydants exogènes pour l'organisme s'avère très utile pour lutter contre les différentes pathologies provoquées par les radicaux libres (Seifried et coll., 2007).

### C. GENERALITES SUR *ADENIUM OBESUM* (FORSK) ROEM SCHULT (APOCYNACEAE).

#### I. Caractéristiques botaniques (Nacoulma, 1996)

➤ **Famille : Apocynaceae**

➤ **Noms communs**

**Nom vulgaire :** Français : baobab des chacals, faux baobab, Adenium obèse, rose du désert, pied d'éléphant.

**Nom local :** Mooré : Zin-nega (sing.) Zin- nesé (pl.)

➤ **Synonymes :**

*Adenium arabicum* Balf.f. , *Adenium coetaneum* Stapf,

*Adenium honghel* A. DC, *Nerium obesum* Forsk. (Omino, E.A., 2002).

#### II. Description botanique (Arbonnier, 2000)

Arbuste succulent, ressemblant à un petit baobab avec un tronc court et trapu ( pied d'éléphant).

Ecorce lisse, brun clair, exsudant instantanément un abondant latex transparent ou blanc en cas de blessure, ramifications vigoureuses ascendantes. Floraison en saison pluvieuse.

Feuilles en rosettes terminales, dressées, sessiles ou subsessiles, obovales ou lancéolées, coriaces, glabres avec le dessus nettement plus foncé ou vert bleuâtre, floraison pendant la saison sèche lorsque la plante est defeuillée.

Fleurs grandes, d'un rouge éclatant en touffes de trois à cinq. Fruits en paires allongées avec de petites graines munies à leurs deux bouts d'une couronne de poils blanchâtres. Pollinisation par papillons. Reproduction par semis ou par boutures ou greffes.



**Figure 7 : Plante entière d'*Adenium obesum*. (Jardin botanique du CNRST, 12-11-2009, KIHINDO Abdel Aziz)**



**Figure 8 : Fleur d'*Adenium obesum* (Jardin botanique du CNRST, 12-11-2009, KIHINDO Abdel Aziz)**



### III. Habitat ; distribution botanique

*Adenium obesum* se rencontre dans les savanes herbeuses, arborées arides et dans les régions rocailleuses ou sableuses.

Il est présent au Nord du sahel, du Sénégal au Soudan, au Sud jusque dans la zone soudanienne, au Centre et au Nord-est de l'Afrique et en Arabie. On le cultive dans le monde entier pour ses qualités ornementales.

### IV. Données phytochimiques établies (Nacoulma, 1996)

Plusieurs groupes chimiques se retrouvent dans les différentes parties de la plante (fleurs et écorces).

Il s'agit de :

**Fleurs** : anthocyanosides, cardenolides ;

**Latex** : saponosides stéroïdes, cardenolides (honghelosides A à G) avec Oleandrigenol et digitoxigenol, gitoxigenol comme génines ;

**Ecorces** : hétérosides cardiotoxiques, saponosides.

### V. Données ethno pharmacologiques

#### V.1. Usages thérapeutiques (Neuwinger, H.D., 2000)

Les écorces sont utilisées en bains pour traiter les dermatoses et à éliminer les poux. Le latex sert en application sur les dents cariées, les plaies septiques et les ulcères. Les racines en décoction, seules ou en association avec d'autres plantes servent à traiter les maladies vénériennes. Elles sont aussi utilisées contre les rhinites.

#### V.2. Autres usages (Neuwinger, H.D., 1996)

Le jus de la racine ou de la tige d'*Adenium obesum* sert à préparer un poison de flèche pour les appâts de chacals, d'hyènes.

La décoction d'écorce et de feuilles est couramment employée comme poison pour la pêche.

## Généralités sur *ADENIUM OBESUM*

---

Des préparations à base d'*Adenium* sont utilisées comme poison d'épreuve et pour commettre des crimes. Le bois est parfois employé comme combustible

### VI. Données pharmacologiques établies

On se sert d'*Adenium obesum* à faible dose pour traiter l'insuffisance cardiaque congestive (ICC) et les problèmes de rythme cardiaque (arythmies atriales) mais à haute dose, elle conduit à l'insuffisance cardiaque systolique et à la mort. (Yamauchi et al, 1990).

L'extrait à l'éthanol des racines ralentit la croissance de *Bacillus subtilis*, mais il n'a pas montré d'activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou *Candida albicans*. (Cepleanu et al, 1994).

L'extrait aqueux d'écorces des tiges est un acaricide potentiel qui montre une toxicité élevée sur tous les stades de développement des tiques *Amblyomma spp* et *Boophilus*. (Mgbojikwe et al, 2002)

## **DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE**

## **I. OBJECTIFS DE L'ETUDE**

## Objectifs de l'étude

---

### **I.1. Objectif général**

Etudier l'effet antiprolifératif et l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum* (Forsk) ROEM.et SCHULT. (Apocynaceae)

### **I.2. Objectifs spécifiques**

1-Préparer un extrait méthanolique et une fraction polyphénolique à partir des fleurs d'*Adenium obesum* ;

2-Caractériser les principaux groupes chimiques de l'extrait méthanolique des fleurs;

3-Mettre en évidence l'activité antiproliférative de l'extrait méthanolique;

4-Rechercher l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et de la fraction polyphénolique par le test de réduction du radical DPPH.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

## II.1. Cadre de l'étude

Notre étude a été réalisée essentiellement dans deux laboratoires :

- Le laboratoire de chimie organique et physique appliquée de l'unité de formation et de recherche en sciences exactes et appliquées (UFR/SEA) de l'Université de Ouagadougou pour l'extraction et l'étude phytochimique ;
- Le laboratoire d'oncologie expérimentale du Centre de Recherche en Biologie moléculaire Pietro Annigoni à Ouagadougou pour les essais biologiques.

Le Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni a été inauguré le 14 Octobre 2006.

Ce centre comprend principalement trois unités :

- une unité de traitement ambulatoire des maladies génétiques et virales,
- une unité de recherche clinique,
- une unité de recherche fondamentale. L'unité de recherche fondamentale est subdivisée en deux laboratoires:
  - Laboratoire de Biologie et de génétique moléculaire,
  - Laboratoire de Phytochimie et d'oncologie expérimentale.

## II.2. Matériels et méthodes de l'étude

### II.2.1 Matériels d'étude

#### II.2.1.1 Matériel végétal

Il était constitué des pétales de fleurs d'*Adenium obesum*. Les fleurs ont été récoltées en novembre 2009 dans le jardin botanique du CNRST. Elles ont été séchées à l'abri de la lumière, de la poussière et réduites en poudre par broyage. Elles serviront à la réalisation de l'extrait de notre étude.

## II.2.1.2 Matériels d'étude phytochimique

### II.2.1.2.1 Matériels d'extraction et de caractérisation

- la verrerie de laboratoire
- un rotavapor de type Buchi RE 11 couplé à un bain marie de type Buchi
- une balance analytique Sartorius (sensibilité 1/10.000 grammes ; portée maximale 220 grammes)
- des chromatoplaques ( support : verre ; adsorbant : gel de silice 60F 254, cellulose microcristalline F254)
- une lampe ultra-violet (254 et 366nm).

### II 2.1.2.2 Solvants et réactifs d'analyse

#### a. Solvants d'analyse pour la CCM

- Système S1 : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial / eau : (100 : 11 : 11 : 26 v/v)
- Système S2 : chloroforme/acétone/ammoniaque 10% : (80 : 40 : 15 v/v)
- Système S3 : n-butanol/eau/acide acétique glacial : (10 : 5 : 5 v/v)
- Système S4 : chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau : (64 : 32 : 12 : 8 v/v)
- Système S5 : acétate d'éthyle/ méthanol/ eau : (100 : 13,5 : 10 v/v)
- Système S6 : acétate d'éthyle/acide formique/ acide acétique/eau : (100 : 11 : 11 : 8 v/v)

#### b. Substances témoins d'analyse CCM

- quercétine
- acide gallique
- cyanidine

#### c. Réactifs

- réactif de Meyer (Annexe)
- réactif de Dragendorff (Annexe)
- solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrée



## Matériels et méthodes

---

- réactif de Shibata (Annexe)
- ammoniacque 20% et 10%
- acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré
- acide chlorhydrique (HCl) concentré et 2%
- solution de chlorure ferrique à 1% et 2%
- tournure de magnésium
- vanilline sulfurique
- éthanol 50%
- réactif de Kedde (Annexe)

### II. 2.1.3 Matériels pour l'étude biologique

#### II.2.1.3.1 Lignées cellulaires et milieux de culture

La lignée cellulaire utilisée provient du laboratoire de toxicologie de l'institut de pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles (ULB).

Il s'agit des cellules cancéreuses de glioblastomes U373.

Les milieux de cultures étaient composés du DMEM/high modified (Dublecco's Modified Eagle's Medium) enrichi avec de la glutamine (0,6mg/ml).

Tous les milieux de culture ont été complétés avec une solution de Pen-Strep (0,2UI/ml de pénicilline et 0,2µg/ml de streptomycine), une solution de sulfate de kanamycine (0,1mg/ml) et de FBS (foetal bovine sérum) (5%v/v).

#### II.2.1.3.2 Matériels de laboratoire

- une hotte à flux laminaire muni d'une lampe ultra-violet LN 120 nue ;
- un incubateur à CO<sub>2</sub> avec filtre HEPA de marque Purcell ;
- un lecteur de microplaques ELx808 de marque Biotek couplé à un ordinateur piloté par un logiciel GEN5 1.07
- un agitateur de plaques Heidolph titrimax 1000
- un microscope à phase inversée
- un bain marie de marque Nüve
- une balance analytique
- des plaques multipuits (96 puits) Falcon à fonds rond et plat
- des flasques de culture cellulaire Falcon (25mL/12,5cm<sup>2</sup> et 250mL/80cm<sup>2</sup>)

## Matériels et méthodes

---

- des tubes polypropylène fond conique de 15ml et 50ml Falcon
- des pipettes sérologiques stériles à usage unique de 5 et 10 mL
- des micropipettes électroniques et manuelles de marque Eppendorf
- des tips

### II.2.1.3.3 Solvants et réactifs du test antiprolifératif

- MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) – 2,5 diphenyltetrazolium bromure Sigma Aldrich, France]
- dimethylsulfoxyde (DMSO)
- phosphate buffered saline solution (PBS)

### II.2.1.3.4 Solvants et réactifs du test antiradicalaire

- 1-1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) (VWR, France) ;
- Quercétine (VWR, France) ;
- méthanol ;
- dimethylsulfoxyde (DMSO).

## II.2.2 Méthodes d'étude

### II.2.2.1- Méthode d'étude phytochimique

#### II.2.2.1.1 Méthode d'extraction

50 g de poudre végétale ont été macérés dans 500 ml d'un mélange méthanol-acide chlorhydrique (99 :1, v/v). La macération est réalisée sous agitation à une température moyenne de 25°C pendant 24 h.

Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapor sous vide partiel à une température de 60°. Le résidu a été totalement séché à la température ambiante du laboratoire.

L'extrait sec obtenu a servi aux études antiprolifératives, antiradicalaires et à la caractérisation par CCM.

## Matériels et méthodes

---

### II.2.2.1.2 Rendement des extractions

Le rendement de l'extraction (%) a été estimé selon la formule :

$$r = (m/M) \times 100$$

M = prise d'essai pour l'extraction

m = masse d'extrait obtenu

### II.2.2.1.3 Caractérisation phytochimique

La caractérisation phytochimique des extraits a pour but la mise en évidence des différents groupes chimiques présents dans chacun d'eux. Il a été réalisé selon la méthode classique de Ciulei (1982) sur les extraits bruts.

Les tests de caractérisation chimique suivants ont été utilisés :

- le test de Shibata pour l'identification des flavonoïdes ;
- le test de Dragendorff et de Meyer pour l'identification des alcaloïdes (bases et sels) ;
- le test de Kedde pour l'identification des hétérosides cardiotoniques ;
- les réactions d'identification des saponosides, des tanins et des anthocyanes.

#### ✓ **Caractérisation des alcaloïdes**

Les tests de Dragendorff et de Meyer ont été utilisés :

5 mL de l'extrait ont été évaporés à sec ; le résidu a été dissous dans 2 mL d'acide chlorhydrique 2%. La solution a été filtrée sur coton et le filtrat a été utilisé pour faire réagir les réactifs de Dragendorff et de Meyer dans deux tubes à essai 1 et 2.

L'apparition d'un précipité jaune blanchâtre ou d'une opalescence en présence de 2 à 3 gouttes du réactif de Meyer témoigne de la présence des alcaloïdes bases dans l'extrait.

Le développement d'un précipité rouge orangé en présence de 2 à 3 gouttes du réactif de Dragendorff justifie la présence d'alcaloïdes sels dans l'extrait.

#### ✓ **Caractérisation des flavonoïdes**

5 mL de l'extrait ont été dissous dans 2 mL d'éthanol 50%. La solution obtenue a été légèrement chauffée dans un bain-marie chaud. Des fragments de tournures de magnésium

## Matériels et méthodes

---

(2 à 3) ont été ajoutés à la solution et 3 gouttes d'acide chlorhydrique concentré y ont été ajoutées. La solution a été laissée barbotée dans le bain-marie. L'apparition d'une coloration rouge (flavonols) ou orange (flavanones) indique la présence de flavonoïdes.

### ✓ **Caractérisation des saponosides**

2 mL de l'extrait ont été dilués de moitié avec de l'eau distillée dans un tube à essai et agités pendant au moins 15 minutes au vortex.

L'apparition d'une colonne de mousse d'au moins 1 cm de haut persistant pendant au moins 15 minutes indique la présence de saponosides.

### ✓ **Caractérisation des tanins**

1 ml de l'extrait méthanolique a été dilué dans 1 mL d'eau distillée et additionné de 3 gouttes d'une solution diluée de trichlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$  1%).

L'apparition d'une coloration bleu foncé indique la présence de tanins galliques.

La présence de tanins catéchiques est indiquée par l'apparition d'une coloration vert foncé.

Une coloration hybride indique la présence de tanins galliques et catéchiques.

### ✓ **Caractérisation des cardenolides**

1 ml de l'extrait a été dissous dans du méthanol ; le test de Kedde a été appliqué à la solution obtenue. L'apparition d'une coloration violette immédiate indique la présence de cardenolides.

### ✓ **Caractérisation des anthocyanes**

Les anthocyanes étant des substances fortement colorées, leur détection à l'œil nu est possible même à des concentrations très faibles.

Deux tests chimiques caractéristiques permettent une identification globale des anthocyanes en solution ; en milieu acide, les pigments anthocyaniques sont rouges et jaunes tandis qu'en milieu basique ils passent au bleu et rouge.

## II.2.2.1.4 L'analyse CCM

### ✓ La chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM consiste en une séparation des substances chimiques en fonction de leur affinité par rapport à deux phases : une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide (éluant) constitués par un système de solvant.

Des capillaires de 25  $\mu\text{L}$  ont été utilisés pour le dépôt des différents extraits (la tâche du dépôt ne dépassant pas 0,5 cm). Sur une même plaque sont déposés un témoin de référence quand nous en disposons et l'extrait des fleurs. La distance entre les spots était de 0,7cm environ (**Figure 9**). Les plaques ont été séchées à l'air ambiant et placées dans des cuves de migration contenant préalablement les différents systèmes de solvants (**Figure 10**).

La distance de parcours de l'éluant a été de 8 cm à partir du point de dépôt des spots. Après la migration les plaques ont été retirées, séchées, et révélées avec un réactif spécifique pour l'identification des groupes chimiques.

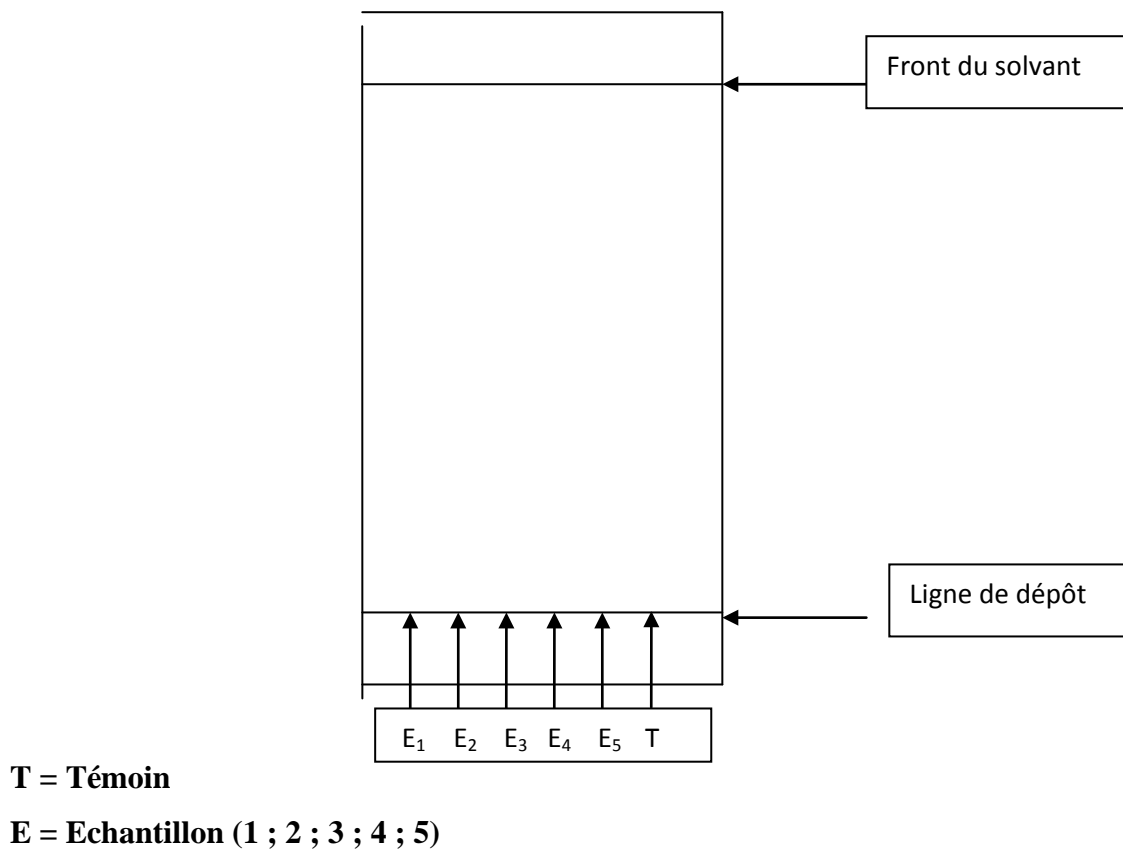
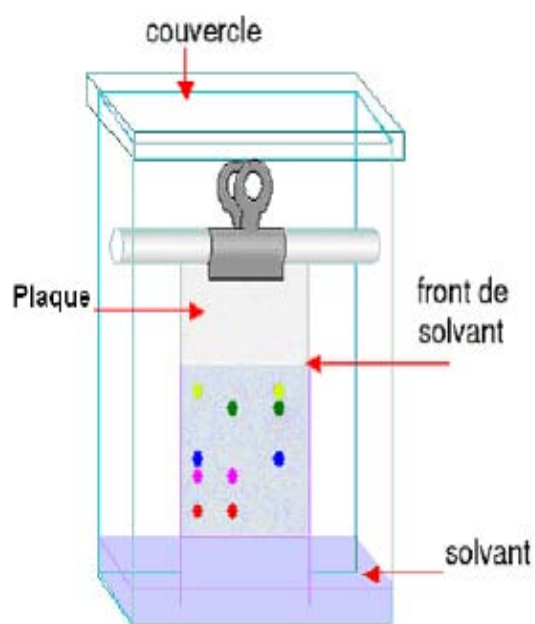


Figure 9 : Schéma de présentation d'une plaque de CCM



**Figure 10 : Schéma du développement chromatographique d'une plaque (Lagnika, 2005)**

### ✓ La révélation

#### • Détection des tanins

Le système de solvant était constitué de : n-butanol/eau/acide acétique glacial : (10 : 5 : 5 v/v). La solution témoin était une solution méthanolique d'acide gallique à 5 mg / ml.

Les plaques ont été pulvérisées avec une solution de chlorure ferrique à 2% ( $\text{FeCl}_3$  2%) dans du méthanol 80% et séchées à l'air.

L'apparition de tâches de coloration bleu foncé révèle la présence de tanins hydrolysables (galliques). Les tanins condensés (catéchiques) donnent une coloration verdâtre.

## Matériels et méthodes

---

- **Détection des saponosides**

Le solvant de migration était constitué par le mélange : chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau : (64 : 32 : 12 : 8 v/v). La pulvérisation par la vanilline sulfurique a permis la révélation. L'apparition de tâches brunes ou violettes après chauffage des plaques à plus de 100°C sur une plaque chauffante indique la présence de saponosides.

- **Détection des flavonoïdes**

L'éluant était constitué par le mélange : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau : (100 : 11 : 11 : 26 v/v). Le témoin était une solution de quercétine à 5mg/mL dans du méthanol. La révélation a été faite à la lumière UV à 365 nm après exposition des plaques aux vapeurs d'ammoniaque. Les flavonoïdes apparaissent jaunes ou jaunes orangés.

- **Détection des alcaloïdes**

Le système de solvant utilisé était composé de : chloroforme/acétone/ ammoniaque 10% : (80 : 40 : 15 v/v).

La révélation a été faite à la lumière UV à 365 nm. A cette longueur d'onde, les alcaloïdes apparaissent sous forme de spot bleu ou bleu-vert fluorescent.

- **Détection des cardenolides**

Le système de solvant utilisé était composé de : acétate d'éthyle/méthanol/eau : (100 : 13,5 : 10 v/v). La pulvérisation par le réactif de Kedde a permis la révélation. L'apparition de taches roses ou bleu violacées indique la présence de cardenolides.

- **Détection des anthocyanes**

Le système de solvant utilisé était composé de : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau : (100 : 11 : 11 : 26 v/v). Le témoin était une solution de cyanidine (3-oxyanthocyanidine). Les anthocyanes apparaissent rouges.

### II.2.2.1.5 Séparation et purification des polyphénols de l'extrait

#### ✓ Chromatographie sur colonne

Cette technique est utilisée pour la séparation et la purification des composés phénoliques des plantes. On utilise le Séphadex LH-20 comme adsorbant. Il permet de séparer, dans un même temps, les composés phénoliques de poids moléculaires variant entre 300 et 500 g/mol de polarité identique. Les composés sont séparés par ordre de poids moléculaire décroissant.

En outre on utilise l'Amberlite XAD-7 pour débarrasser l'extrait brut d'impuretés gênantes.

Pour la séparation des composés appartenant à plusieurs groupes, on procède par gradient de polarité croissante du solvant d'élution. Les solvants utilisés pour l'élution sont des mélanges éthanol-eau ou méthanol-eau acidifiés par HCl ou l'acide acétique dans les proportions ne dépassant pas 1% (v/v).

On réalise la fixation sur l'Amberlite XAD-7 dans une colonne de 24 cm de long et de 3 cm de diamètre. L'Amberlite est préparée dans de l'éthanol ou du méthanol. Le mélange obtenu est versé dans la colonne et on laisse reposer. Avant le dépôt de l'extrait aqueux, la colonne est lavée à l'eau pour éliminer l'alcool.

Après le dépôt et la fixation de l'extrait sur la résine Amberlite la colonne est lavée à l'eau acidifiée pour éliminer les substances solubles dans l'eau. Ainsi restent fixés les composés phénoliques que l'on récupère par élution avec de l'éthanol ou du méthanol à 70%.

Ainsi des CCM et des réactions de caractérisation sont réalisées pour identifier les différents composés des fractions obtenues.

Les filtrats obtenus sont évaporés sous vide puis séchés au lyophilisateur.

### II. 2.2.2 – Méthode d'étude pharmacologique

#### II.2.2.2.1 La culture cellulaire

Les lignées cellulaires étaient conservées dans de l'azote liquide et ont été cultivées durant deux à trois semaines avant le début des tests. Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM. Ce milieu a été enrichi en glutamine (0.6 mg/mL) et en sérum de veau



## Matériels et méthodes

---

fœtal (5% v/v). Un mélange d'antibiotique a été ajouté au milieu : pénicilline (0.2 UI/mL), streptomycine (0.2 µg/mL), kanamycine (0.1 mg/mL). Les cellules ont été cultivées en monocouche dans des flasques de culture cellulaire. Les milieux de culture étaient renouvelés le lendemain des mises en culture et ensuite toutes les 48 heures.

Les boîtes de culture étaient maintenues dans un incubateur humide à 37°C, avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence des cellules (quand les cellules occupent plus de 80% de la surface du flasque).

Le milieu de culture était alors éliminé et une solution de trypsine (0,05% m/v) était introduite dans les flasques de culture pour les rincer (deux fois) et permettre de détacher les cellules de leur support. L'effet de la trypsine était stoppé en rajoutant du milieu de culture dans les flasques. Selon la densité cellulaire obtenue, une fraction de la suspension cellulaire (1 à 4 mL selon la taille des flasques) était remise dans d'autres flasques et incubée dans les conditions précédentes.

### II.2.2.2 Le test antiprolifératif

Le test antiprolifératif permet la recherche d'un effet antiprolifératif sur un type cellulaire par une méthode évaluant la croissance cellulaire. Son but est de déterminer la concentration inhibitrice 50% (IC<sub>50</sub>) qui est la concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale.

Nous avons étudié l'effet antiprolifératif de notre extrait sur le taux de croissance globale d'une lignée cellulaire cancéreuse par le test colorimétrique MTT. Ce test fait partie des méthodes fondées sur des perturbations de la perméabilité des cellules et utilise le sel de tétrazolium MTT qui est un colorant nécessitant une étape de métabolisation une fois avoir pénétré dans les cellules vivantes.

Le test colorimétrique MTT a été décrit par Mosmann (1983) puis modifié par Carmichael et collaborateurs (1987). Il est basé sur la mesure du nombre de cellules vivantes, métaboliquement actives et capables de réduire l'anneau de tétrazolium contenu dans le sel de tétrazolium par leur succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de Formazan violets. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test et est quantifiée par spectrophotométrie en utilisant un lecteur de microplaques à 490 nm.

## Matériels et méthodes

Avant le début du test les cellules ont été comptées en utilisant le bleu Trypan qui est un colorant vital qui colore seulement les cellules mortes. La cellule de Neubauer a servi pour le comptage des cellules vivantes sous un microscope à phase inversée.

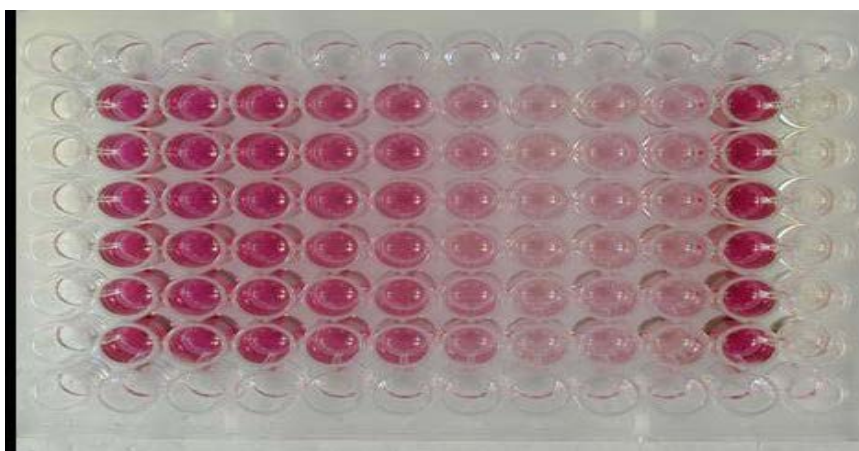
Les lignées cellulaires ont étéensemencées au jour J0 dans des plaques de 96 puits (à raison de 10 000 cellules / mL de milieu de culture) et incubées durant 24 heures pour assurer une adhésion adéquate des cellules. La première rangée de la plaque multi puits a été utilisée comme blanc et pour ce fait ne contenait que le milieu de culture.

A J1, une autre plaque de 96 puits (à fond rond) à été utilisée pour faire les dilutions nécessaires (chaque condition expérimentale a été analysée en quadruplicat, avec dix huit concentrations, de 500 µg/ml à 0.0038 µg/ml). Les concentrations des différents extraits étaient de 2,5 mg/mL (m/v). Une fraction de DMSO (pas plus de 1% v/v) était ajoutée sur les extraits pour une meilleure dissolution.

Les extraits ont été ainsi mis en contact avec les cellules et remises en incubations pendant 72 heures. Les rangées 5 et 9 de la plaque ont servi de contrôle et ne contenaient donc que des cellules vivantes.

A J4, le sel de tétrazolium dissout dans du PBS à une concentration de 0,5 mg/mL est introduit dans les 96 puits (200µL) après avoir versé le surnageant. Les plaques ont été incubées pendant 2 heures puis débarrassées de leur surnageant. 200µL de DMSO ont été introduits dans les puits afin de dissoudre les cristaux de Formazan. Les plaques ont été agitées pendant environ 30 minutes puis lues au spectrophotomètre à 490 nm.

Des courbes dose-réponse (concentration en fonction du pourcentage d'inhibition) par le logiciel PRISM (Graph Pad 5.0) sont réalisées pour l'extrait sur la lignée cellulaire U373. Ces courbes nous ont permis de calculer l'IC<sub>50</sub> de l'extrait.



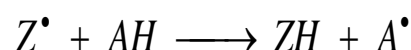
**Figure 11 : Illustration d'une plaque 96 puits dans laquelle un test colorimétrique MTT a été réalisé**

### II.2.2.2.3 Test « in vitro » de l'activité antioxydante : Test de réduction du radical stable DPPH

L'activité antiradicalaire a été évaluée « in vitro » par le test de réduction du DPPH qui évalue la capacité de l'extrait à céder des atomes d'hydrogène.

#### ✓ Principe de la réaction

Le 1,1 -diphényl-2-picrylhydrazyl ou le  $\alpha$ - diphényl - $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, de couleur violet foncé avec une absorption maximale autour de 520 nm. Lorsqu'il est en présence d'une substance pourvoyeuse d'atome d'hydrogène, il se réduit et devient jaune. Le changement de la coloration du violet au jaune est proportionnel à l'activité antioxydante



$Z^{\bullet}$  : DPPH non réduit    AH : corps réducteur    ZH : DPPH réduit

$A^{\bullet}$  : Corps oxydé

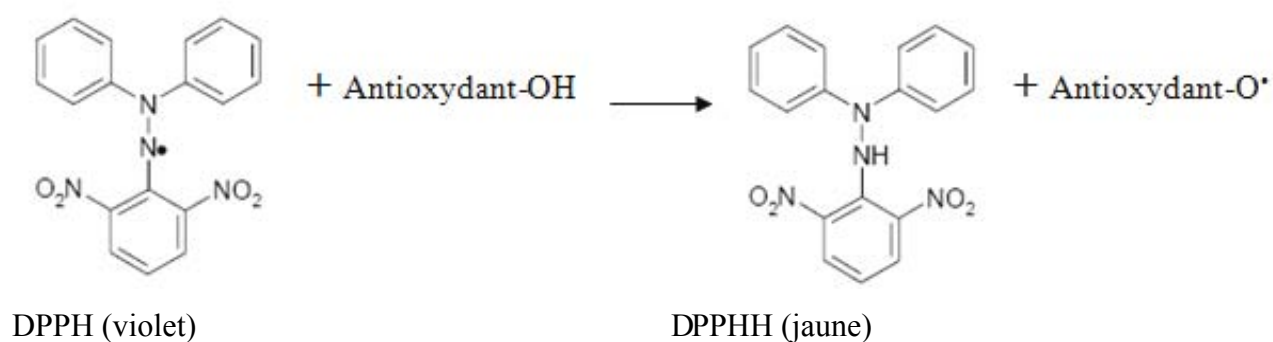


Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

## Matériels et méthodes

### ✓ Protocole expérimental

Le mélange réactionnel contenait 0,9 mL d'une solution méthanolique de DPPH (0,04 %) et 0,1 mL d'extrait de plante à des concentrations croissantes. Les drogues ont été dissoutes dans du DMSO. Après une incubation de 30 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière, la densité optique a été lue à 517 nm contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol (0,9 mL) et 0,1 mL de l'extrait. Un contrôle négatif (0,9 mL de DPPH + 0,1 mL du DMSO) a été également utilisé. La quercétine a été utilisée comme antioxydant de référence.

**Tableau V : Composition du mélange réactionnel du test de réduction du DPPH (mL)**

| Substances (mL)   | Test | Contrôle négatif | Blanc du contrôle négatif | Blanc du test |
|-------------------|------|------------------|---------------------------|---------------|
| DPPH              | 0,9  | 0,9              | -                         | -             |
| Extrait/référence | 0,1  | -                | -                         | 0,1           |
| Méthanol          | -    | -                | 0,9                       | 0,9           |
| DMSO              | -    | 0,1              | 0,1                       | -             |
| Total             | 1    | 1                | 1                         | 1             |

L'absorbance mesurée a été convertie en pourcentage d'activité antioxydante calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle négatif ; **A<sub>s</sub>** : absorbance du test corrigé

### **III .RESULTATS**

## III.1. RESULTATS PHYTOCHIMIQUES

### III.1.1 Rendement d'extraction

L'extraction par macération méthanolique réalisée à partir de 50 g de poudre des fleurs d'*Adenium obesum* a produit 20,46 g d' extrait soit 41%. L'extrait sec obtenu est de couleur rouge bordeaux.

### III.1.2 Caractérisation des principaux groupes chimiques

Les résultats obtenus après caractérisation des principaux groupes chimiques de l'extrait des fleurs sont consignés dans le tableau. Cette caractérisation a été faite selon la méthode classique de Ciulei I. (1982).

**Tableau VI : Groupes chimiques mis en évidence dans l'extrait**

| Groupes chimiques | Résultats |
|-------------------|-----------|
| Alcaloïdes        | -         |
| Tanins            | +         |
| Saponosides       | -         |
| Flavonoïdes       | -         |
| Anthocyanes       | +++       |
| Cardenolides      | +++       |

- : absence ; + : faible présence ; +++ : abondant

On note au regard de ce tableau que les anthocyanes et les cardenolides sont très abondants dans l'extrait. Les tanins existent mais en très petite quantité.

## III. 1.3- Chromatographie sur couche mince (CCM)

### III. 1.3.1- Caractérisation des tanins



A : Extrait methanolique d'*Adenium Obesum*

T : Témoin (acide gallique)

**Figure 13 : Chromatogramme de caractérisation des tanins**

Le solvant de migration était constitué de n-butanol / eau / acide acétique glacial (10 : 5 : 5). En plus de l'extrait brut une substance témoin : l'acide gallique a été déposé. Pour la révélation, les plaques ont été pulvérisées avec une solution de chlorure ferrique à 2 %. L'apparition des spots bleu-noir révèle la présence de tanins.

Le chromatogramme nous présente un spot bleu-noir pour l'extrait avec un  $R_f = 0,67$ . Le témoin présente un spot à  $R_f = 0,89$ .

## III.1.3.2- Caractérisation des alcaloïdes



A : Extrait méthanolique d'*Adenium Obesum*

**Figure 14 : Chromatogramme de caractérisation des alcaloïdes**

L'éluant était un mélange de chloroforme / acétone / ammoniac 10% (80 : 40 : 15). Pour cette caractérisation nous ne disposons pas de substance témoin. Après séchage des plaques, la révélation a été faite à la lumière UV à 365nm.

Le chromatogramme de l'extrait montre quatre spots à  $R_f = 0,08 ; 0,61 ; 0,69 ; 0,91$ .



### III.1.3.3- Caractérisation des flavonoïdes



A : Extrait méthanolique d'*Adenium Obesum*

T : Témoin (quercétine)

**Figure 15 : Chromatogramme de caractérisation des flavonoïdes**

L'exposition du chromatogramme aux vapeurs d'ammoniaque a mis en évidence un spot orange-jaune sur le parcours de la quercétine avec un  $R_f = 0,90$ .

L'éluant était constitué d'un mélange d'acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique glacial / eau (100 : 11 : 11 : 26). Le témoin a été la quercétine. La révélation a été faite à la lumière UV à 365 nm, après exposition aux vapeurs d'ammoniaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de spots jaunes, jaune-orange ou bleu-vert.

Le chromatogramme de l'extrait montre un spot avec un  $R_f = 0,79$ .

## III. 1.3.4- Caractérisation des saponosides



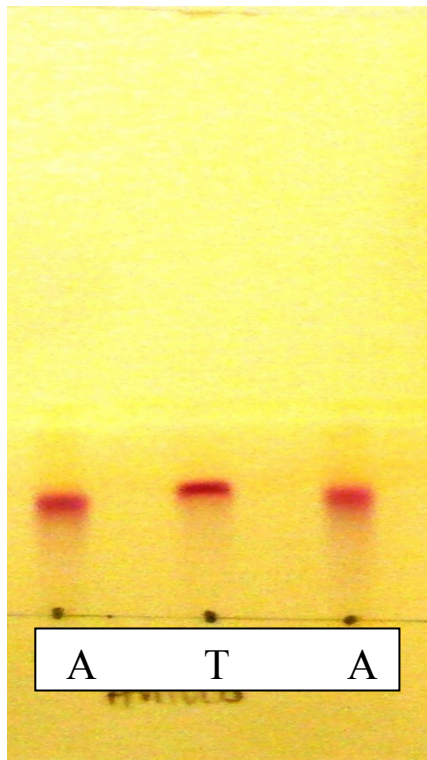
A : Extrait méthanolique d'*Adenium Obesum*

### Figure 16 : Chromatogramme de caractérisation des saponosides

Le système de solvant était composé de chloroforme / acide acétique glacial / méthanol / eau (64 : 32 : 12 : 8). Nous n'avons pas eu en notre disposition un témoin pour cette caractérisation. L'apparition de taches brunes ou violetées après développement des plaques indique la présence de saponosides.

Notre extrait présente deux spots avec des  $R_f = 0,42 ; 0,85$ .

## III.1.3.5- Caractérisation des anthocyanes



A : Extrait méthanolique d'*Adenium Obesum*

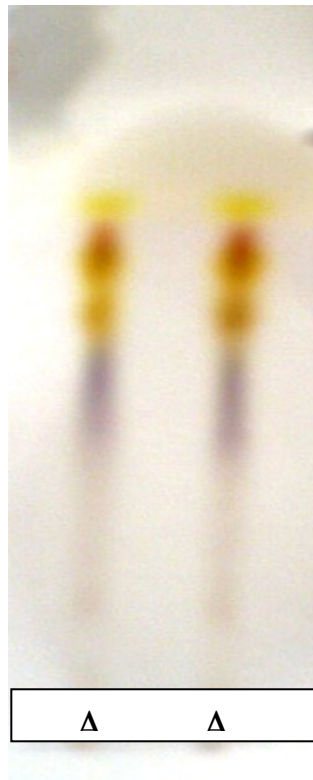
T : Témoin (cyanidine)

**Figure 17 : Chromatogramme de caractérisation des anthocyanes**

L'éluant était constitué d'un mélange EFAW : acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau (100 : 11 : 11 : 26). La cyanidine a été déposée comme témoin en même temps que l'extrait.

Notre extrait présente un spot rouge avec un  $R_f = 0,32$ . Le témoin présente un spot à  $R_f = 0,33$ .

## III.1.3.6- Caractérisation des cardenolides



A : Extrait méthanolique d'*Adenium Obesum*

### Figure 18 : Chromatogramme de caractérisation des cardenolides

Le système de solvant était constitué d'acétate d'éthyle / méthanol / eau (100 : 13,5 : 10). Nous ne disposions pas de témoin pour cette caractérisation. Pour la révélation, la plaque a été pulvérisée avec le réactif de Kedde.

L'apparition de spots rose ou bleu-violacée révèle la présence de cardenolides.

Le chromatogramme nous présente deux spots avec des  $R_f = 0,70$  et  $0,80$ .

## Résultats

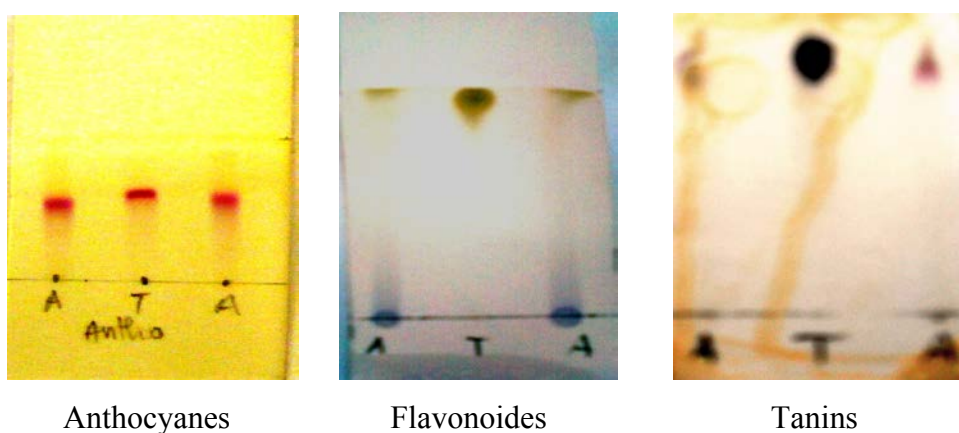
### III.1.4- Séparation et purification des polyphénols

Pour la caractérisation de l'activité antiradicalaire des fleurs d'*Adenium obesum*, nous avons réalisé une chromatographie sur colonne (Amberlite XAD-7) de notre extrait méthanolique afin de séparer et de purifier les composés phénoliques qui y sont (**Figure 19**). L'Amberlite nous a permis de débarrasser l'extrait brut d'impuretés gênantes afin de mieux isoler les polyphénols de celui-ci.



**Figure 19 : Chromatographie sur colonne (Amberlite XAD-7) de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum***

La fraction obtenue a été soumise à des analyses CCM afin de caractériser les polyphénols qui y sont. Ainsi des CCM des principaux groupes de composés phénoliques (des anthocyanes, des tanins, des flavonoïdes) ont été réalisées (**Figure 20**). Une CCM des cardenolides est faite pour vérifier leur présence ou non dans la fraction polyphénolique ; car étant présent dans l'extrait sec (**Figure 21**).



**Figure 20 : Chromatogrammes de caractérisation des polyphénols (anthocyanes, flavonoides et tanins)**

## Résultats

---

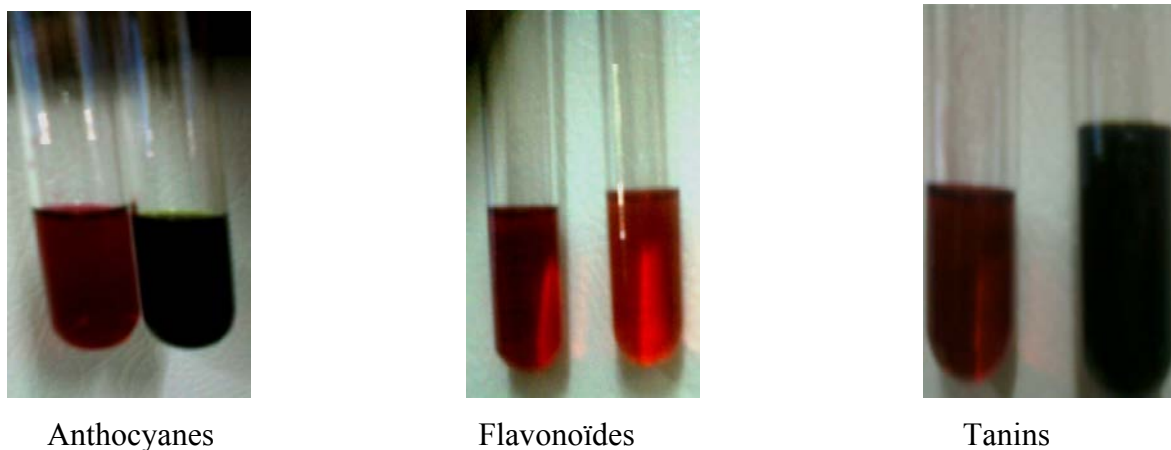


**Figure 21 : Chromatogrammes de caractérisation des cardenolides de l'extrait méthanolique sec (A) et de la fraction polyphénolique (B) des fleurs d'*Adenium obesum***

La non apparition des spots roses ou bleu-violacés sur le chromatogramme B révèle l'absence des cardenolides dans la fraction polyphénolique.

Ainsi notre fraction renferme majoritairement que des composés phénoliques.

Les tests de caractérisations réalisés ont révélé la présence d'anthocyanes (**Figure 22**)



**Figure 22 : Réactions de caractérisations des anthocyanes, des flavonoïdes et des tanins**

## Résultats

La coloration rouge en milieu acide et bleu en milieu basique révèle la présence d'anthocyanes.

Ce sont des composés faisant partie du groupe des flavonoïdes.

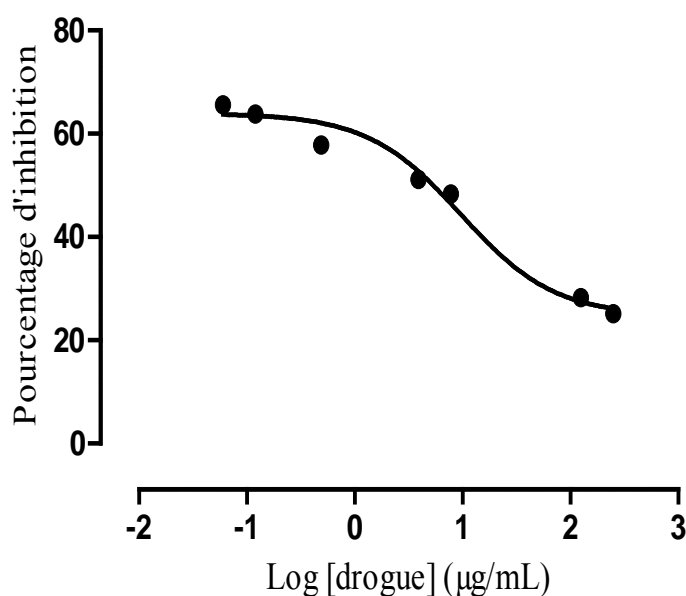
Leur structure chimique est caractérisée par un noyau flavylum (2-phénylbenzopyrylium) sur lequel sont substitués généralement des groupements hydroxyles (OH) et/ ou des sucres (Bruneton, J. (1993)).

### III. 2. RESULTATS BIOLOGIQUES

#### III.2.1 Activité antiproliférative de l'extrait et des substances cytotoxiques de référence

Nous avons évalué l'influence de notre extrait et de deux substances cytotoxiques de référence sur le taux de croissance globale des glioblastomes (U373) et ce à l'aide du test colorimétrique de cytotoxicité MTT. Il a permis de déterminer pour chaque composé testé les indices  $IC_{50}$  (concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules). Le tableau VII reprend les résultats du test de cytotoxicité MTT des différents composés testés.

L' $IC_{50}$  de notre extrait méthanolique correspond à la dose de 4,570  $\mu\text{g/ml}$ . L'extrait montre ainsi un effet antiprolifératif sensiblement égal à celui de l'etoposide mais moindre que celui du paclitaxel.



$$IC_{50} = 4,570 \mu\text{g/ml}$$

**Figure 23 : Inhibition de la prolifération cellulaire globale de l'extrait méthanolique des fleurs sur la lignée U373**

## Résultats

Les cellules cancéreuses en semencées étaient au nombre de 10000 cellules par millilitre de milieu de culture.

Le test MTT permet de mesurer le nombre de cellules vivantes métaboliquement actives capables de transformer par réduction mitochondriale le MTT en cristaux de Formazan violets. Le nombre de cellules vivantes est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette.

**Tableau VII : Valeurs d'IC<sub>50</sub> déterminées par MTT après évaluation de l'effet de ces substances sur la croissance globale des cellules U373**

| Composés testés            | IC <sub>50</sub> |
|----------------------------|------------------|
| Extrait CH <sub>3</sub> OH | 4,570 µg/ml      |
| Etoposide                  | 5,885 µg/ml      |
| Paclitaxel                 | 0,0017 µg/ml     |

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> correspondent aux concentrations qui réduisent de 50% la croissance cellulaire globale de lignées cancéreuses U373 après 3 jours d'incubation en présence des composés testés.

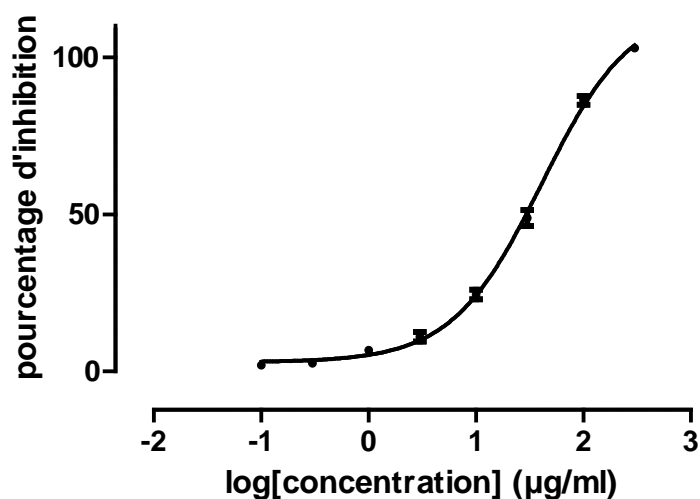
### III. 2.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire des extraits

Nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrate) comme un radical libre relativement stable.

L'effet antiradicalaire de notre extrait méthanolique vis-à-vis du radical DPPH est donné par la figure 24.



## Résultats



$$IC_{50} = 40,83 \mu\text{g/ml}$$

**Figure 24 : Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait CH<sub>3</sub>OH des fleurs d'*Adenium obesum***

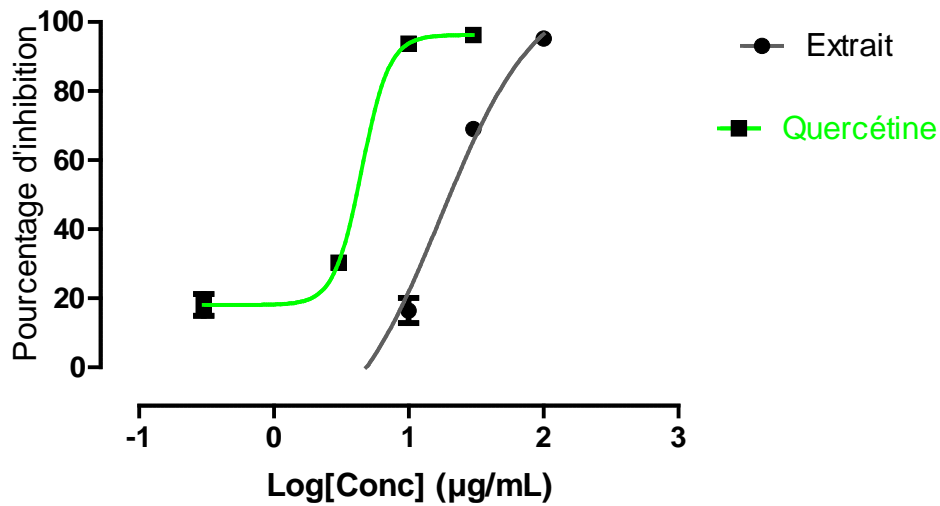
Le DPPH de couleur violette est réduit par les antioxydants en un composé de couleur jaune. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

L'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum* inhibe le radical DPPH avec un  $IC_{50}$  égal à 40,83 µg/ml.

Notre extrait a subi une séparation puis une purification des polyphénols qui y sont, ainsi la fraction ne contient que des anthocyanes.

L'effet antiradicalaire de la fraction polyphénolique vis-à-vis du radical DPPH est donné dans la figure 25.

## Résultats



$IC_{50}$  extrait = 17,32 µg/ml.

$IC_{50}$  quercétine = 4,48 µg/ml.

**Figure 25 : Evaluation de l'activité antiradicalaire de la fraction polyphénolique d'*Adenium obesum* et de la quercétine**

La fraction polyphénolique contenant les anthocyanes inhibe le radical DDPH avec un  $IC_{50}$  égal à 17,32 µg/ml tandis que la référence ; la quercétine a un  $IC_{50}$  égal à 4,48 µg/ml.

## **IV. DISCUSSION**

## Discussion

---

Notre étude a pour but d'évaluer l'effet de ses fleurs d'*Adenium obesum* sur la prolifération cellulaire globale des cellules cancéreuses U373.

*Adenium obesum* est une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle africaine pour traiter divers maux (Nacoulma ; 1996)

Nous avons conduit une étude expérimentale afin d'évaluer les propriétés cytotoxiques et antiradicalaires de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum*.

Cette étude a présenté des limites :

- Notre étude a été réalisée sur une seule lignée cellulaire les glioblastomes U373 alors que le NCI (National Institut of Cancer) recommande de réaliser les tests sur plusieurs lignées cellulaires.

### IV.1. Le rendement de l'extraction

Le rendement obtenu de l'extraction méthanolique de la poudre des fleurs d'*Adenium obesum* est de 41%. Cela traduit la richesse de la plante en composés polaires.

### IV.2. Le screening phytochimique

Les réactions colorimétriques réalisées sur l'extrait ont permis de mettre en évidence la présence en forte quantité d'anthocyanes et de cardenolides mais aussi de tanins en faible teneur.

Nacoulma /Ouédraogo en 1996 avait signalé la présence de ces mêmes éléments dans les fleurs de ladite plante cependant n'avait détecté aucune trace de tanins.

Les alcaloïdes, les saponosides et les flavonoïdes n'ont pas été détectés dans nos conditions expérimentales. Ceci pourrait être lié à la très faible teneur de ces principes chimiques dans l'échantillon de la plante.

Ces groupes chimiques caractérisés chez *Adenium obesum* sont retrouvés aussi chez certaines plantes de la famille des Apocynaceae. C'est ainsi que l'on retrouve des cardenolides chez *Thevetia nerifolia* et *Strophantus sarmentosus*, des tanins et des pectines anthocyanes chez *Cataranthus roseus* (Nacoulma ; 1996).

### IV.3- L'analyse CCM

Nous avons recherché et caractérisé les anthocyanes, les cardenolides, les tanins mais aussi les alcaloïdes, les saponosides et les flavonoïdes malgré leur absence lors du screening phytochimique.

La caractérisation des cardenolides est revenue positive avec la mise en évidence sur le chromatogramme de spot de couleur bleu violacée après la révélation par pulvérisation du réactif de Kedde.

Ces résultats confirment les tests colorimétriques des cardenolides.

Pour la recherche des anthocyanes, le spot obtenu sur le parcours de l'extrait, présente une coloration rouge qui témoigne de la présence des anthocyanes dans l'extrait. Le spot isolé sur le parcours de migration de la substance de référence de  $R_f = 0,33$  est superposable au spot retrouvé sur le parcours de l'extrait de  $R_f = 0,32$ .

L'analyse CCM des tanins a montré après révélation des taches de couleur bleue noire. Les fleurs renfermeraient ces types de composés.

Les saponosides, les alcaloïdes et les flavonoïdes malgré leur absence lors du screening phytochimique ont montré des spots lors de l'analyse CCM.

Ces spots montrent en effet, leur présence dans les fleurs d'*Adenium obesum* mais en très petite quantité.

Le criblage phytochimique et l'analyse CCM ont permis de caractériser des groupes chimiques dans les fleurs d'*Adenium obesum*. Ces groupes chimiques retrouvés sont des composés phénoliques (anthocyanes, tanins) d'où la justification de l'activité cytotoxique et/ou antiradicalaire de la plante.

### IV.4. Etudes biologiques

#### IV.4.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait

La réduction du radical DPPH est un test largement utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits. Ce test est basé sur la capacité des extraits à céder des atomes d'hydrogène ou d'électrons au DPPH qui possède un électron célibataire. En présence d'un réducteur, cet électron s'apparie et le milieu vire du violet au jaune.

Notre extrait méthanolique a montré une activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH avec un  $IC_{50}$  de 40,83  $\mu\text{g/ml}$ .

En effet, Palé et al, 2004 ont montré une activité antioxydante des fleurs d'*Adenium obesum* avec un  $IC_{50}$  de l'ordre de 38,80  $\mu\text{g/ml}$ . Ce résultat comparé au notre est légèrement plus élevé. Cette différence de résultat peut être due au lieu de récolte de la plante ainsi que des mesures d'entretien de la plante. En effet, Palé a récolté son matériel végétal dans une cour familiale (le domicile du Pr NACRO) où la plante a un meilleur entretien. Le notre a été pris dans le jardin botanique du CNRST.

Les polyphénols (acides phénoliques, les tanins, les flavonoïdes et les anthocyanes) constituent une famille qui présente un pouvoir antioxydant très marqué (Ribéreau-Gayon ; 1968).

Notre extrait purifié afin d'isoler les polyphénols a montré qu'il était en grande partie constitué d'anthocyanes qui font partie de la grande famille des flavonoïdes.

Ainsi cet extrait a révélé une activité antiradicalaire très nette vis-à-vis du radical DPPH avec un  $IC_{50}$  égal à 17,32  $\mu\text{g/ml}$ .

La quercétine ; composé pur a été utilisée comme référence, avait un  $IC_{50}$  égal à 4,48  $\mu\text{g/ml}$ .

Nos résultats comparés à l'effet de la quercétine qui est un composé pur restaient faibles. Cependant nous pourrions dire que nos extraits (méthanolique et purifié) possèdent un potentiel antiradicalaire non négligeable.

De nombreux travaux ont rapporté que les anthocyanes possèdent des propriétés antioxydantes (J-M.Kong et al ; 2003, M.D.Rivero-Pérez et al ; 2008).

Notre extrait purifié est très riche en anthocyanes d'où son activité antiradicalaire s'explique par la présence de ces composés.

## Discussion

---

En effet, les pigments anthocyaniques se comportent comme des piègeurs de radicaux libres (Bruneton ; 1993).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très réactives capables de réagir avec tous les composants des cellules (ADN, glucides, protéines et lipides).

Aux doses faibles, ils sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques.

Aux doses excessives, les radicaux libres deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction de ces espèces oxygénées réactives (EOR) au-delà de la capacité antioxydante des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant impliqué dans l'apparition de plusieurs pathologies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus de vieillissement.

Ainsi notre extrait potentiellement antiradicalaire pourrait être intéressant dans la prévention ou dans la réduction de l'incidence du cancer.

En effet, plusieurs études ont montré que les composés antioxydants inhibent de nombreux cancers (Cheng et al, 2001 ; Nishino et al, 2000).

Les polyphénols contenus dans le thé vert réduiraient significativement le risque de survenue de cancer de sein et de l'ovaire chez les sujets asiatiques (Zhang et al, 2002 ; Wu et al, 2003).

Les aliments riches en antioxydants tels que les fruits et légumes réduisent le risque de certains types de cancers (L.Reddy et al, 2003).

Les composés phénoliques pourraient prévenir la survenue de cancer par leur action antioxydante. Par ailleurs, ils peuvent empêcher la carcinogenèse en affectant les événements moléculaires dans le déclenchement, la promotion et les étapes de la progression tumorale (Yang et al, 2001).

Par conséquent, les composés phénoliques à travers leurs propriétés antioxydantes joueraient un rôle important dans la prévention du cancer.

### IV.4.2. Etude de l'effet antiprolifératif de l'extrait

L'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum* a provoqué une inhibition de la prolifération cellulaire globale des glioblastomes U373. La concentration inhibitrice 50 pour cent (IC<sub>50</sub>) était de 4,570 µg/ml.

Notre extrait a montré une activité antiproliférative sensiblement égale à celle de l'étoposide (IC<sub>50</sub> = 5,885 µg/ml), un anticancéreux de référence utilisé pour le traitement des cancers mais très largement inférieur à celle du paclitaxel (IC<sub>50</sub> = 0,017 µg/ml) utilisé dans le traitement des cancers.

Ce résultat montre que l'extrait a une activité antitumorale potentielle. En effet, le NCI estime qu'un extrait ayant démontré une activité inhibitrice de croissance (IC<sub>50</sub>) inférieure à 30 µg/ml lors d'essais préliminaires de cytotoxicité peut être considérée comme une source potentielle de molécules cytotoxiques (Jhokadze et al, 2007).

Les anthocyanes et les cardenolides (stéroïdes cardiotoniques) qui ont été décelés dans l'extrait posséderaient des propriétés antitumorales.

En effet, de nombreux travaux sur les anthocyanes ont montré un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire de certaines lignées cancéreuses dont les cellules du cancer du colon et les cellules du cancer gastrique (Kamei et al, 1998).

J.Dai et al, 2009 ont démontré un effet cytotoxique de s'extrait contenant des anthocyanes (ACEs) d'une espèce de fruits très riche en pigments anthocyaniques (Blackberries) sur les cellules HT-29 (cancer colorectal), les cellules MCF-7 (cancer du sein) et les cellules HL-60 (leucémies).

Les stéroïdes cardiotoniques ont été décrits comme des agents antitumoraux mais sans succès vu leur indice thérapeutique trop faible (Stenkvist B. ; 2001, McConkey DJ et al, 2000 ; Huang YT et al, 2004 ; Mijatovic T. et al, 2007).

D'autres études ont suivi et ont abouti à l'identification d'un nouveau stéroïde cardiotonique (la 2''-oxovoroscharine) au sein d'une plante africaine (*Calotropis procera*). Ensuite on lui a trouvé un analogue semi synthétique (cardenolide UNBS1450) présentant des activités antitumorales supérieures aux autres stéroïdes cardiotoniques, mais une cardiotoxicité moindre (Van Quanquebeke E. et al, 2005).

En effet, ce nouveau cardenolide inhibe fortement la prolifération et la migration des cellules de glioblastomes (Lefranc et al, 2006 ; 2008), de cancer du poumon non à petites



## Discussion

---

cellules (Mijatovic T. et al, 2006 ; 2007) et de cancer réfractaire de prostate (Mijatovic T. et al, 2008).

Les glioblastomes U373 représentent le grade ultime de malignité et sont caractérisés par une prolifération cellulaire importante, une migration diffuse et un taux important de néoangiogénèse. Ils restent incurables car très résistants aux médicaments induisant l'apoptose.

L'alternative de traitement possible est de limiter la prolifération et la migration des cellules gliales tumorales migrantes.

Ainsi, la molécule UNBS 1450 a été découverte ; elle exerce une activité antitumorale in vitro supérieur à celle du temozolomide médicament pro autophagique utilisé dans le traitement des glioblastomes.

Elle inhibe fortement la prolifération et la migration des cellules tumorales gliales. Ainsi ce cardenolide UNBS 1450 peut être utilisé en deuxième ligne après le temozolomide ou en même en association avec celui-ci dans le traitement des glioblastomes (Lefranc et al, 2008).

Par ailleurs, notre extrait méthanolique avec son effet antiprolifératif ( $IC_{50} = 4,570$  µg/ml) sur les glioblastomes, exerce une inhibition de la prolifération et de la migration de ces cellules tumorales U373.

Ainsi l'effet anti prolifératif de notre extrait sur les cellules U373 pourrait être attribué aux anthocyanes et/ou aux cardenolides décelés lors du screening phytochimique.

## **V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

# Conclusion

---

## V-1. CONCLUSION

La présente étude a permis la mise en évidence par des tests validés des groupes chimiques, de l'activité antiproliférative sur les glioblastomes U 373 et de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum* (Apocynaceae).

L'étude pharmacochimique de l'extrait a permis de mettre en évidence la présence des composés chimiques du groupe des anthocyanes, des cardenolides en forte quantité, des tanins en faible teneur et des traces de saponosides, de flavonoïdes et d'alcaloïdes.

L'extrait de plante a montré une activité antiradicalaire. En effet, l'extrait purifié CH<sub>3</sub>OH a produit une réduction vis-à-vis du radical DPPH.

La plante a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire globale des glioblastomes U373.

Ces résultats suggèrent un rôle important des anthocyanes et des cardenolides, mis en évidence dans l'extrait de la plante dans l'activité antiproliférative et antiradicalaire de la plante.

De ce fait, l'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum* pourrait être intéressant dans la prévention et dans le traitement du cancer.

Des études complémentaires (isolement des principes actifs, toxicité) sont nécessaires pour rendre ce travail utilisable dans le cadre de la mise au point d'un phyto-médicament.

### V-2. PERSPECTIVES

Au terme de cette étude préliminaire, des investigations ultérieures devront tendre à :

- Réaliser des essais biologiques de l'extrait afin d'identifier le ou les principe(s) responsable(s) de l'activité antiproliférative.
- Effectuer le test antiprolifératif sur plusieurs autres lignées cellulaires cancéreuses.
- Déterminer le mécanisme de cytotoxicité (cytotoxique ou cytostatique) de l'extrait méthanolique
- Vérifier la toxicité sur les cellules normales

**REFERENCES**

## Références

---

1. **ARBONNIER M.** Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest ; 2000. Ed. ISBN CIRAD, Pont-sur-Yonne, 541p.
2. **BARCH D.H., RUNDHAUNGEN L.M., STONER G.D.,PILLAY N.S., & ROSCHE W.A.** Structure function relationship of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 265 – 269.
3. **BARTOSZ G.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on toxicology*, 2003; 9: 5 – 21.
4. **BAUDISSION S; BELAID K; HUYGHUES E, PASINI M, PROVOST F.** Les thérapies anticancéreuses ciblées. *Revue de la littérature Année 2005/2006.* Département Génie Biologique. Université Nice SOPHIA ANTIPOLIS.
5. **BOREK C.** Antioxidants and cancer. *Sciences and Medicine* 1997; 4: 51-62
6. **BOREK C.** Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *J Nutrition*, 2001; 131: 1010S-1015S.
7. **BOREK C.** Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 2004; 3: 333 – 341.
8. **BRUNETON J.** Anthocyanosides Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales 2è Ed. Lavoisier Paris, 1993; 30: 300-310
9. **CARDADOR-MARTINEZ A., CASTTANO-TOSTADO E., LOAREA-PINA G.** Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit Contam* 2002; 19: 62 – 69.
10. **CARMICHAEL, J., DE GRAFF, W.G., GAZDAR, A.F., MINNA, J.D., MITCHELL, J.B.** Evaluation of tetrazolium – based semi automated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*, 1987; 47: 943 –946

## Références

---

**11. CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR LE CANCER,**

Le cancer dans le monde en 2008: le traitement du cancer et les soins dans les pays en développement. Centre international de recherche sur le cancer. Lyon, 2009 ; 20 : 310-325

**12. CEPLEANU F., HAMBURGER M.O., SORDAT B., MSONTHI J.D., GUPTA M.P., SAADOU M & HOSTETTMAMM K.** Screening of tropical medicinal plants for molluscidal, larvicidal, fungicidal and cytotoxic activities. International Journal of Pharmacognosy, 1994; 32: 294-307

**13. CHAUVERGNE, J. HOERNI B.** Abrégés de chimiothérapie anticancéreuse 4<sup>e</sup> Ed. Masson; Paris, 2001: 103p.

**14. CHENG Y.H., SHEN T.F., PANG V.F., & CHEN B.J.** Effects of aflatoxin and carotenoids on growth performance and immune response in mule ducklings. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol, 1999; 128: 19 – 26.

**15. CIULEI I.** Methodology for analysis of vegetables drugs. Ministry of chemical industry, 1982, Bucharest, 67p.

**16. DJAMILA KOURTA** Maladies cancéreuses dans le monde : près de huit millions de morts en 2007. Disponible sur [http : // www.elwatan.com](http://www.elwatan.com) consulté le 19/02/2009

**17. EBERHARDT M.V., LEE C.Y., LUI R.H.** Antioxidant activity of fresh apples. Nature, 2000; 405: 903 – 904.

**18. ESPINOSA E., ZAMORA P., FELIU J., GONZALEZ-BARON M.** Classification of anticancer drugs, a new system based on therapeutic target cancer treatment Reviews, 2003; 29: 515-523.

**19. FOLKMANN J.** Angiogenesis and Apoptosis Semin. Cancer Biol, 2003; 13:159-167

**20. GALVANO F., PIVA A., RITIENI A., & GALVANO G.** Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. J Food Prot, 2001; 64: 120 – 131.

## Références

---

- 21. GIOVANNUCCI E.** Tomatoes, tomato based products, lycopene and cancer: review of the epidemiological literature. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91: 317 – 331.
- 22. GREENWALD P., CLIFFORD CK., MILNER JA.,** Diet and cancer prevention. *Eur J of Cancer*, 2001; 37: 948 – 65.
- 23. HAYOT C.** Mise au point d'une stratégie pharmacologique originale pour l'obtention de composés anticancéreux anti-migratoires. Institut de pharmacie de Bruxelles, 2006 : 118p.
- 24. HECHT S.S., KENNEY P.M., WANG M., TRUSHIN N., AGARWAL S., RAO A.V., & UPADHYAYA P.** Evaluation of butylated hydroxyanisole, myo-inositol, curcumin, esculetin, resveratrol, and lycopene as inhibitors of benzo[a]pyrene plus 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Lett*, 1999; 137 : 123 – 130.
- 25. HELLMAN S., VOKES E.** Les projets des traitements actuels contre le cancer. Les progrès de la lutte contre le cancer, *Scientific American*, 1996
- 26. HUANG YT, CHUEH SC, TENG CM, GUH JH.** Investigation of Ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells *Biochem Pharmacol*, 2004; 67: 727-733.
- 27. HURLEY L. H.** "DNA and its associated processes as targets for cancer therapy." *Nat Rev Cancer.*, 2002; 2: 188-200.
- 28. International Agency for Research on Cancer (IARC)** Tobacco Smoking (IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risks of chemicals to human ,1986; 38, Lyon, IARC Press.
- 29. International Agency for Research on Cancer (IARC)** UV and Solar Radiation (IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risks of chemicals to human, 1992; 55, Lyon, IARC Press.
- 30. International Agency for Research on Cancer (IARC)** Ionizing radiation, Part 1: X- and Gamma Radiation and Neutron Smoking (IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risks of chemicals to human , 2000; 75, Lyon, IARC Press.



## Références

---

- 31. J.DAI, A GUPTE, L GATES, R .J. MURPHER.** A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 2009; 47: 837-847.
- 32. J-MING KONG; LIAN-SAI CHIA, NGOH-KHANG GOH, TET-FATT CHIA, R BROUILLARD.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Photochemistry*, 2003; 64: 923-933.
- 33. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, MURRAY T, THUN MJ.** Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* , 2008; 58: 71-96.
- 34. JHOKADZE M, ERISTAVI L, KUTCHUKHIDZE J, CHARIOT A, ANGENOT L, TITS M.JANSEN O, FREDERICH M.** In vitro cytotoxicity of some medicinal from Georgian Amaryllidaceae .*Phytother Res*, 2007; 21: 622-624
- 35. KAMEI H, HASHIMOTO Y., KOIDE T., KOJIMA T., HASEGAWA M.,** Anti-tumor effect of methanol extracts from Red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmacology*, 1998; 13: 447- 452.
- 36. KIM D.J., TAKASUKA N., NISHINO H., & TSUDA H.** Chemoprotection of lung cancer by lycopène. *BioFactors*, 2000; 13: 95 – 102.
- 37. KING T. J., KHACHLIK F., BORTKIEWICZ H., FUKUSHIMA L.H., SCOTT M., & BERTRAM J.S.** Metabolites of dietary carotenoids as potential cancer preventative agents. *Pure Appl Chem*, 1997; 69: 2135 – 2140.
- 38. KOCCHILIN-RAMONATXO, C.** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et métabolique*, 2006 ; 20 : 165 – 177.
- 39. LAGNIKA L.** Etude Phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse unique de doctorat ès pharmaceutique : pharmacognosie : Faculté de pharmacie de Strasbourg. Université Louis Pasteur Strasbourg I; **2005**: 281p.

## Références

---

- 40. LATTIER M.** Diabète et stress oxydant: étude d'une nouvelle molécule agoniste des récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques à visées antidiabétiques et antioxydantes. Thèse de Doctorat de Biologie ; UFR/Biologie Université Joseph Fourier Grenoble ; 2001 : 176p.
- 41. LEFRANC F., BROTCHE J., KISS R.** Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J.Clin.oncol.* 2005(a); 23: 2411- 2422.
- 42. LEFRANC F, MIJATOVIC T, CAMBY I, GAILLY P, VAN QUAQUEBEKE, DARRO F.** The binding of the UNBS 1450 cardenolide to the sodium pump in human glioblastoma (GBM) cells dramatically impairs both their migration and proliferation properties. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Washington DC, USA. April 1- 5, 2006.
- 43. LEFRANC F, MIJATOVIC T, KONDO Y et al.** Decreasing the sodium pump activity in glioblastoma cells induces autophagy and disorganizes their actin cytoskeleton with a resulting survival benefit in a pre-clinical model of glioblastoma. *Neurosurgery* 2008.
- 44. LEHUCHER – MICHEL M.P., LESGARDS J.F, DELUBAC O. P., DURAND P., PROST M.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La presse médicale*, 2001 ; 30 : 1076 – 1081.
- 45. LEWIS J.S., CHENG D., JORDAN V.C.** "Targeting oestrogen to kill the cancer but not the patient." *British Journal of Cancer*; 2004, **90**: 944-949.
- 46. LIEBERMAN R.** "Chemoprevention of Prostate Cancer: Current Status and Future Directions." *Cancer and Metastasis Reviews*; 2002, **21**: 297-309.
- 47. LINGWOOD RJ, BOYLE P, MILBURN A, NGOMA T, ARBUTHNOTT J, McCAFFREY R, KERR SH, KERR DJ.** The challenge of cancer control in Africa. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 398 – 403.

## Références

---

- 48. LUKACINOVA A., MOJZIS J., BENACKA R., KELLER J., MAGUTH T., KURILA P., et al** Preventive effects of flavonoids or alloxan – induced Diabets Mellitus in Rats. *Acta veterinaria*, 2008; 77: 175 – 182.
- 49. MAREEL M, LEROY A.** Clinical, cel lular, a nd molecular asp ects o f can cer invasion. *Physiol Rev.*, 2003; 83: 337-76.
- 50. Mc CONKEY DJ, LIN Y, NUTT LK, OZEL HZ, NEWMAN RA.** C ardiac glycosides stimulates Ca<sup>2</sup>. Increases and apoptosis in androgen independent, metastatic human prostate adenocarcinomas cells. *Cancer Res.* 2000 ; 60: 3807 -3812.
- 51. METIZI A.** Activité antioxydantes des extraits de graines de *Nigella sativa* L: etude « in vitro » et in « vivo ». Mémoire de Magister. Biochimie appliquée ; Faculté des Sciences, Université El Haj Lakhdar (Algérie) ; 2009 :105p.
- 52. MGOJKWE, L.O & OKOYE, Z.S.C.** Acaricidal effeicacy of the aqueous stem bark extract o f *Adenium obesum* on t he v arious l ife st ages o f cattle ticks. *N igerian J ournal o f Experimental and Applied Biology*, 2000; 2: 39-43.
- 53. MIJATOVIC T, MATHIEU V, GAUSSIN JF et al.** Cardenolide – induced lysosomal m embrane p erméalization d emonstrates therapeutic b enefits i n ex perimental human non – small cell lung cancers. *Neoplasia* 2006; 8: 402 – 412.
- 54. MIJATOVIC T, VAN QUAQUEBEKE E, DELEST B, DEBEIR O, DARRO F, KISS R.** Cardiotonic steroids o n t he ro ad to anti – cancer t herapy. *BBA – Reviews o n cancer* , 2007; 1776 :32 – 57.
- 55. MIJATOVIC T, ROLAND I, VAN QUAQUEBEKE et al.** The subnit of the soduim pump could represent a novel target to combat non – small cell lung cancers. *J Pathol.*, 2007; 212: 170 – 179.
- 56. MIJATOVIC T, DE NEVE N, GAILLY P. et al.** Nuleous and C- Myc : potential targets of cardenolide – mediated antitumor activity *Mol. Cancer Ther* , 2008; 7 : 1285 -1296.

## Références

---

- 57. M.D.RIVERO – PEREZ P. MUNIZ, M.L. GONZALEZ – SANJOSE.** Contribution of a nithocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. Food and Chemical toxicology, 2008; 46: 2815 – 2822.
- 58. MOSMANN T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J.Immunol. Methods, 1983 ; 65: 55 – 63.
- 59. NACOULMA / OUEDRAOGO O.G** Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. Tome I et II. Thèse de Doct. D'Etat ès Sciences Naturelles. Université de Ouagadougou 1996: 320p
- 60. NEUWINGER H.D.** African ethnobotany: poisons and drugs; Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1996: 941p.
- 61. NEUWINGER H.D.,** African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications; Medpharm Scientific, Stuttgart, Germany, 2000: 589 p.
- 62. NISHINO H., TOKUDA H., MURAKOSHI M., SATOMI Y., MASUDA M et al.** Cancer prevention by natural caretonoids. BioFactors, 2000; 13: 89 – 94.
- 63. OMINO E.A.** Apocynaceae (part 1). In : Beentje, H.J & Ghazanfar, S.A. (Editors). Flora of tropical. East Africa. A.A.Balkema, Rotterdam, Netherlands, 2002: 116 p.
- 64. OUDARD S.** Impact de la biologie cellulaire sur le ciblage thérapeutique dans les cancers. Cours de cancérologie médicale HEPG. Faculté N ecker, Paris V . Presse universitaire, 2005 : 98p.
- 65. Organisation Mondiale de la Santé** Main causes of death in Burkina Faso projected 2005 and 2030. Disponible sur « [http:// www.who.int/infobase/graphimages/2030\\_deaths\\_448943672\\_ESM\\_large.png](http://www.who.int/infobase/graphimages/2030_deaths_448943672_ESM_large.png) »; 1000'» (Consulté le 19/02/2009).

## Références

---

- 66. Organisation Mondiale de la Santé** New cancer cases in Burkina Faso projection for 2002. Disponible sur «[http://www.who.int/infobase/graphimages/2030Deaths\\_448943672\\_ESM\\_Large.png](http://www.who.int/infobase/graphimages/2030Deaths_448943672_ESM_Large.png)», '1024', '1'» (Consulté le 19/02/2009).
- 67. Organisation Mondiale de la Santé** Global Status Report on Alcohol, 2009.
- 68. PAIVA S.A., & RUSSEL R.M.** Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr*, 1999; 18: 426 – 433.
- 69. PALE E.** Etude des anthocyanes de plantes du Burkina Faso. Structure et activités antioxydantes. Thèse d'Etat, 2002 ; 40 : 145p.
- 70. PALE E., MARIE KOUDA –BONAFOS, MOUHOSSINE NACRO** Caractérisation d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso. *C.R. Chimie*, 2004 ; 7 : 973 – 980.
- 71. PETER BOYLE, BERNARD LEVIN.** World Cancer Report, IARC Press Lyon, 2008: 503p.
- 72. PORTES E.** Synthèse de Tétrahydrocurcuminoides : Propriétés photochimiques et antioxydantes, application à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse de Doctorat : Chimie organique. Ecole Doctorale de sciences chimiques ; Université de Bordeaux I, 2008 : 244p.
- 73. RASTOGI T., HILDESHEIM A., SINHA R.** "Opportunities for cancer epidemiology in developing countries" *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 909 - 917.
- 74. REDDY L., ODHAV B., BHOOLA K.D.** Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 2003 : 1-13.
- 75. RIBEREAU – GAYON P.** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 1968: 254p.

## Références

---

- 76. SEIFREID H. E.** Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention? *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007; 18: 168 – 171.
- 77. SMITH-WARNER SA, GIOVANNUCCI E.** Fruit and vegetable intake and cancer. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, editors. *Nutritional Oncology*. San Diego: Academic Press; 1999: 153-93.
- 78. SORG O.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes rendus Biologies*, 2004; 327: 649 – 662.
- 79. STAHL W., HEINRICH U., JUNGANN H. SIES H., & TRONNIER H.** Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr*, 2000; 71: 795 – 798.
- 80. STEINMETZ KA., POTTER JD.** Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*, 1996; 96: 1027 – 39.
- 81. STENKWIST B.** Cardenolides and cancer. *Anticancer Drugs* 2001: 635 – 636.
- 82. STEWARD B.W., KLEIHUES P.** *Le cancer dans le monde*, IARC Press Lyon, 2005; 354p.
- 83. THANGAPAZHAM RL, SHARMA A, MAHESHWARI RK.** Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.*, 2006; 8: 443-449.
- 84. VALKO M, RHODES C.J, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M.,** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer chemico – biological interactions, 2006; 160: 1-40.
- 85. VAN QUAQUEBEKE E, SIMON G, ANDRE A et al.** Identification of a novel cardenolide (2"-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the synthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance. Structure – activity relationship analyses. *J. Med.Chem*, 2005; 48: 849 – 856.

## Références

---

**86. VITARMO J, PIENTINEM P, HUTTUNEN JK, KORHONEN P, MALILA N, VITANEN MJ, ATBC study Group.**

Incidence of cancer mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a post intervention follow-up. *JAMA* 2003, 290: 476 – 485.

**87. WATZL B., BUB A., BRANDSTETTER B.R., & RECHKEMMER G.**

Modulation of human T-lymphocyte functions by the consumption of carotenoid-rich vegetables. *Int Rev Immunol*, 1999; 18: 527 – 546.

**88. WLODEK LOPACZYNSKI, STEVEN H. ZEISEL.** Antioxydants, programmed cell death and cancer. *Nutrition Research*, 2001; 21: 295 – 307.

**89. WU. AH, YU MC, TSENG CC, HANKIN J, PIKE MC.** Green tea and risk of breast cancer in Asian American. *Int J Cancer* 2003; 106: 574-9.

**90. YAMAUCHI T. & ABE F.** Cardiac glycosides and pregnanes from *Adenium obesum* (Studies on the constituents of *Adenium* 1). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1990; 38: 669 – 672.

**91. ZHANG M, BINNS CW, LEE AH.** Tea consumption and ovarian cancer risk: a case control study in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002; 11: 713-718.

**92. ZHENG S, YANG H, ZHANG S, WANG X, YU L, LU J, & LI J.** Initial study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl*, 1997; 27: 106 – 112.

**ANNEXES**



## Annexes

---

### **Préparation de quelques réactifs**

#### **Chlorure ferrique 1% (m/v)**

100 mg de chlorure ferrique sont dissous dans 10 mL d'eau distillée.

#### **Réactif de Dragendorff**

Une solution (solution 1) comportant 1,7 g de nitrate de bismuth, 20 g d'acide tartrique et 80 mL d'eau distillée est réalisée. Puis, 16 g d'iodure de potassium dissous dans 40 mL d'eau distillée constitue la solution 2. Un mélange à volume égaux des solutions 1 et 2 est réalisé. La préparation finale est conservée au réfrigérateur entre 2 et 8°C.

#### **Réactif de Meyer**

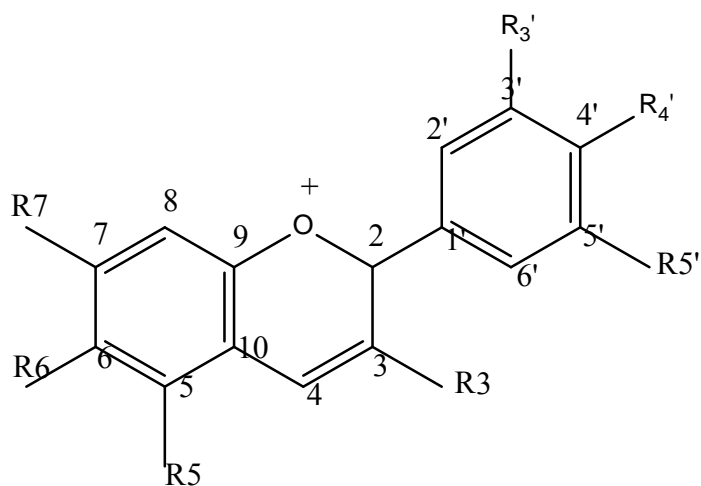
1,335 g de chlorure de mercure II et 49,8 g d'iodure de potassium sont dissous dans 20 mL d'eau distillée. Le volume du mélange est porté à 1L avec de l'eau distillée.

#### **Réactif de Shibatat**

Acide chlorhydrique + Quelques (2-3) grains de tournure de magnésium.

#### **Réactif de Kedde**

1-2 mL de solution alcoolique d'hydroxyde de sodium (NaOH) 2N + 3-4 gouttes d'une solution alcoolique (1%) d'acide 3-5 dinitrobenzoïque.

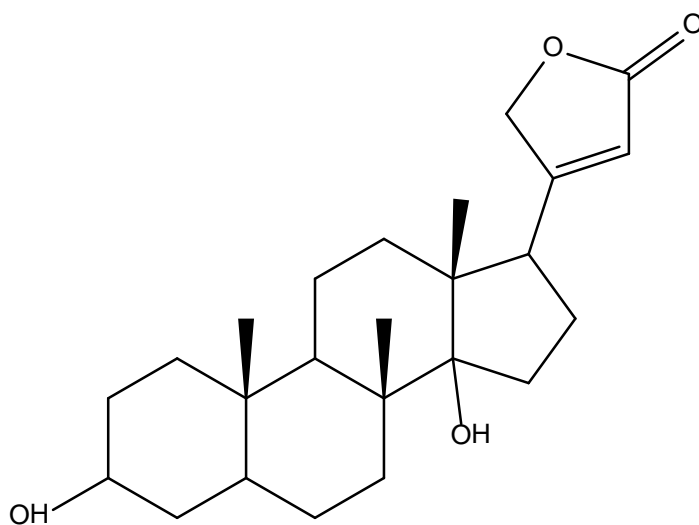


Anthocyanidines: R3, R5, R6, R7, R3', R4', R5' = H, OH, OCH3

Anthocyanosides : - R3 = H ou glycosyl

R5, R6, R7, R3', R4', R5' = H, OH, OCH3 ou glycosyl.

**Figure 26 : Structure générale des anthocyanes**



**Figure 27 : Structure générale des cardenolides**

---

## **SERMENT DE GALIEN**

**“Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l’Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :**

**D’honorer ceux qui m’ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;**

**D’exercer, dans l’intérêt de la santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l’honneur, de la probité et du désintéressement ;**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.**

**En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d’opprobre et méprisé de mes confrères si j’y manque.”**

## Résumé

---

### RESUME

*Adenium obesum* (Apocynacea) est une plante ornementale répandue dans le monde. La présence de composés phénoliques et de cardenolides dans les fleurs nous a amené à étudier les propriétés antiprolifératives et antiradicalaires de l'extrait des fleurs.

Une extraction par macération dans un mélange méthanol – acide chlorhydrique (99 : 1 v/v) a été réalisée sur la poudre des fleurs. Ensuite une étude phytochimique a permis de confirmer la présence d'anthocyanes, de cardenolides et de tanins en petite quantité dans l'extrait.

Cet extrait méthanolique obtenu, a montré un effet antiprolifératif sur les glioblastomes U373. En effet, l'extrait avec une  $IC_{50}$  de 4,570  $\mu$ g/ml induit une activité antiproliférative sensiblement égale à celle de l'etoposide et nettement moins active que le paclitaxel.

Le test de réduction du radical DPPH a montré une activité antiradicalaire de l'extrait avec une  $IC_{50}$  de 40,83  $\mu$ g/ml.

Par ailleurs, une chromatographie sur colonne a été réalisée afin d'isoler les polyphénols contenus dans l'extrait, responsables de cette activité antiradicalaire. Ainsi l'extrait purifié obtenu contenant les polyphénols (anthocyanes) a montré une réduction dose dépendante du DPPH avec une  $IC_{50}$  de 17,32  $\mu$ g/ml.

Ces résultats suggèrent que l'extrait méthanolique possède un réel potentiel antiprolifératif et antiradicalaire qui mérite d'être davantage exploré.

Cette étude pourrait être approfondie en réalisant des essais bio guidés de l'extrait et aussi en effectuant le test antiprolifératif sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses.

Mots-clés : *Adenium obesum* – cardenolides – anthocyanes – antiprolifératif – antiradicalaire

Auteur : KIHINDO Abdel Aziz

Email : kihindo@yahoo.fr

abdelkihindo@gmail.com