

Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae)

J. KOUAMÉ¹, C. GNOULA^{1,4*}, E. PALÉ², H. BASSOLÉ³, I. P. GUISSOU¹,
J. SIMPORÉ^{3,4}, J.-B. NIKIÉMA^{1,4}

Résumé

Guiera senegalensis J. F. Gmel (Combretaceae) est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle africaine pour ses propriétés thérapeutiques.

Dans la présente étude, nous évaluons l'activité antiproliférative sur trois lignées de cellules cancéreuses (cancer de la prostate, glioblastome et cancer du sein) et l'effet antiradicalaire d'extraits de feuilles et de galles de la dite plante.

Une extraction par épuisement successif des feuilles et de galles a été réalisée à l'aide de solvants de polarité croissante.

L'activité antiproliférative la plus élevée a été observée avec le décocté aqueux des galles sur la lignée de cellules de cancer du sein avec une CI50 de l'ordre 2,1 µg/ml. Cette activité est supérieure à celle de l'étoposide et comparable à celle du taxol sur la même lignée.

La présente étude a en outre indiqué à travers deux tests d'évaluation de l'activité antiradicalaire (le test au DPPH et la méthode de blanchissement de la β-carotène) que nos extraits de feuilles et de galles présentent une activité antiradicalaire. Toutefois, cette activité est nettement inférieure à celle des standards utilisés, la quercétine et le BHT. L'extrait méthanolique de galles présente une CI50 de l'ordre de 19,5 µg/ml et l'extrait au dichlorométhane des feuilles, une activité antiradicalaire relative de 0,60.

Mots clés : *Guiera senegalensis*, galle, cytotoxicité, activité antiradicalaire.

Study of cytotoxicity and anti-radical properties of leaves and galls extract from *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae)

Abstract

Guiera senegalensis is a plant widely used in African traditional medicine. In this study, we evaluate the antiproliferative activity on three cancer cell lines (prostate cancer, glioblastoma and breast cancer) and radical-scavenging effect of the leaves and gall extracts.

An extraction of leaves and galls were made using increasing polarity solvent systems.

¹ Unité de Formation et de Recherche en Sciences De la Santé - Université de Ouagadougou

² Unité de Formation et de Recherche en Sciences Exactes Appliquées Université de Ouagadougou

³ Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre, Université de Ouagadougou

⁴ Centre de Recherche en Bio-moléculaire Pietro Annigoni (CERBA).

* Auteur chargé de recevoir les correspondances : Dr Charlemagne GNOULA UFR/SDS Université de Ouagadougou BP 7021 Ouagadougou. E-mail : charliegn@hotmail.com

The higher antiproliferative activity was observed with the decoction of galls on the breast cancer cell line with an IC₅₀ of ± 2.1 mg / ml. This antiproliferative activity is higher than which observed with etoposide and comparable to the activity of taxol on the same cancer cell line.

This study has also shown through two tests used to evaluate the antiradical activity (DPPH test and the β -carotene bleaching test) that our extracts of leaves and galls have a radical-scavenging activity. However, this activity is significantly below the standards used, quercetin and BHT. The methanol extract of galls present an IC₅₀ of ± 19.5 μ g / ml and the dichloromethane extract of leaves an anti-radical activity estimated to 0.60.

Keywords: *Guiera senegalensis*, gall, cytotoxicity, antioxidant.

Introduction

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. En effet, sur un total de 58 millions de décès enregistrés en 2005 au niveau mondial, 13 % (soit 7.6 millions) étaient imputables au cancer, soit plus que la proportion de décès causés par le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme réunis (OMS, 2006). Dans les pays industrialisés, il constitue la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires (OMS, 2006). Selon des projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), d'ici à 2020 le nombre de décès dû au cancer va connaître une augmentation considérable dans les pays en développement, aussi bien en Asie, en Afrique qu'en Amérique Latine et ce, principalement en raison du vieillissement constant de la population humaine et de l'augmentation de la pollution (RASTOGI *et al.*, 2004).

Au Burkina Faso, l'OMS a estimé à environ 8 000, le nombre de cas de cancer en 2002 avec 3 % de décès.

Dans les pays en voie de développement et plus particulièrement en Afrique, la médecine traditionnelle est parfois la seule source de soins abordable et accessible, surtout pour les patients les plus pauvres. Cette médecine traditionnelle africaine utilise pour l'essentiel des thérapies à base de plantes. Or, plusieurs molécules anti-cancéreuses proviennent de plantes médicinales (par exemple : la vinblastine et la vincristine de *Catharantus roseus*, le paclitaxel de *Taxus braviifolia*) ont été développés par de grandes firmes pharmaceutiques ; mais seulement elles demeurent encore inaccessibles pour les populations africaines.

Aussi, pour contribuer à la valorisation de la médecine et pharmacopée traditionnelles, le ministère de la santé du Burkina Faso a-t-il initié et encouragé des travaux de recherche visant à évaluer d'un point de vue scientifique, des recettes de médecine traditionnelle utilisées pour le traitement de certaines maladies comme le cancer.

Nous nous proposons donc dans le présent travail, d'étudier *in vitro* les propriétés anti-tumorales et anti-oxydant d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis*.

Matériel et les Méthodes

Collecte et traitement du matériel végétal

Les feuilles et galles de *Guiera Senegalensis* ont été récoltées à Banfora, dans l'ouest du Burkina Faso en Février 2007. Après séchage à l'abri du soleil et broyage, la poudre obtenue a été utilisée pour une extraction par épuisement successif à l'aide de solvants de polarité croissante :

dichlorométhane, mélange dichlorométhane et méthanol 75 : 25 v/v, mélange dichlorométhane/méthanol : 50 : 50 v/v, méthanol 96 %. Enfin, le marc résiduel a été extrait par décoction avec de l'eau distillée pendant 30 minutes d'ébullition.

Le mélange après refroidissement a été filtré sur coton hydrophile. Le filtrat obtenu a été centrifugé 2 000 tours / minute pendant 5 minutes.

Les extraits organiques ont été évaporés à sec sous pression réduite au rotavapor et les extraits aqueux ont été concentrés au rotavapor puis séché dans une étuve ventilé à la température de 45-50 °C.

Caractérisation phytochimique

Pour la caractérisation et la mise en évidence des familles chimiques des extraits de feuilles et de galles de *Guiera Senegalensis*, nous avons utilisé la méthode décrite par (CIULEI, 1982). Cette méthode utilise les tests de caractérisation chimique suivants :

- 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 Liebermann-Burchard pour l'identification des aglycones triterpéniques et stéroïdiques ;
- les réactions d'identification des coumarines, des saponosides et des tanins.

Matériels d'étude biologique

Les produits utilisés

Les différents produits utilisés comme références sont : taxol (Paclitaxel® ; Sigma Aldrich, France), étoposide (VP16, Sigma Aldrich, France).

Les lignées cellulaires et les milieux de culture

Toutes les lignées cellulaires de cancers humains utilisées dans cette étude proviennent de la American Type Culture Collection (Manassas, Etats-Unis) et nous ont gracieusement été offertes par le professeur Roberts Kiss du laboratoire de toxicologie de l'institut de pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles (ULB). Il s'agit de cellules de glioblastome U373 (code ATCC, HTB-17), de cancer hormono-résistant de la prostate PC-3 (code ATCC, CRL-1435), de cancer du sein MCF-7 (code ATCC, HTB-22). Tous les milieux de culture ont été complétés avec un mélange de glutamine 0.6 mg/ml (GibcoBRL, Invitrogen, France), de pénicilline 200 IU/ml (GibcoBRL), 200 IU/ml de streptomycine (GibcoBRL) et de gentamicine 0.1mg/ml (GibcoBRL). Le Fœtal Bovin serum ou FBS (GibcoBRL) a été décomplémenté à 56 °C pendant 1 heure. Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans des flasques de culture cellulaire (Nunc, Invitrogen, France), dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

Test MTT pour l'évaluation de la croissance cellulaire globale

La croissance cellulaire globale a été évaluée au moyen du test colorimétrique MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2yl]-bromure de diphenyltétrazolium, Sigma Aldrich, France).

Le test colorimétrique MTT est un test *in vitro* mesurant la croissance globale d'une population cellulaire. Les trois lignées cellulaires utilisées dans cette étude ont été incubées pendant 24 h dans des plaques de 96 puits (de 10 000 à 40 000 cellules/ml de milieu de culture selon le type de cellules) avant le traitement avec la substance dont on souhaite mesurer l'effet sur la croissance cellulaire. Ce test d'évaluation de la prolifération cellulaire est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT, de couleur jaune, en son métabolite le bleu de formazan (de couleur violette). Le nombre de cellules vivantes après 72 h d'incubation en présence ou non des composés à tester ou de produits de référence est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée (figure 1), quantitativement par spectrophotométrie en utilisant un lecteur de microplaque ELx808 de marque Biotek à une longueur d'onde de 570 nm (avec une référence de 630 nm). Chaque condition expérimentale a été analysée en quadruplicat avec dix huit (18) concentration, de 500 $\mu\text{g/ml}$ à 0,0038 $\mu\text{g/ml}$.

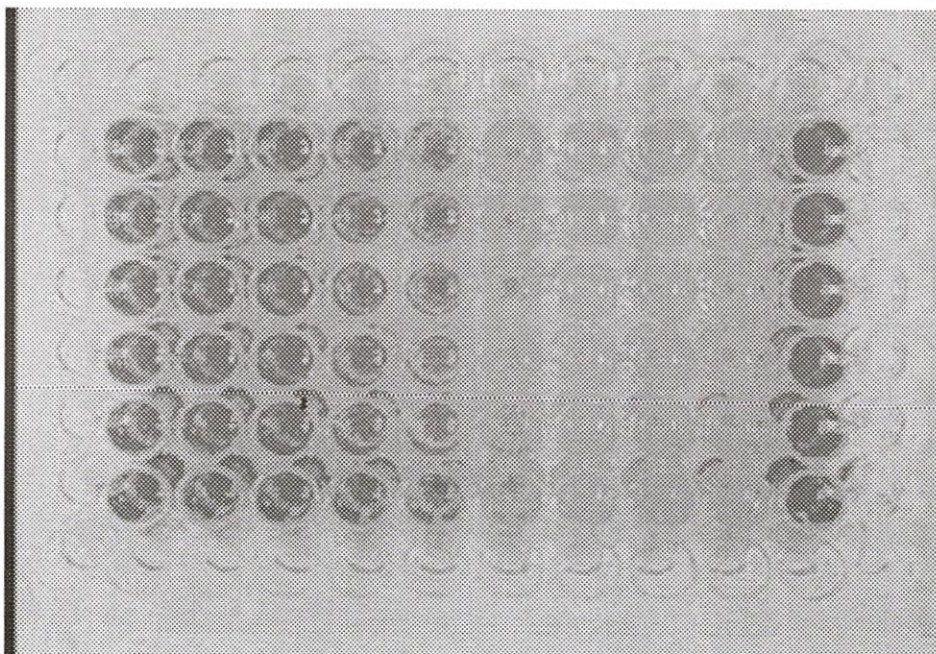


Figure 1. Illustration d'une plaque de 96 puits dans laquelle un test colorimétrique MTT a été réalisé. Les cellules sont ensemencées au J0 et mises en présence d'un agent cytotoxique au J1 pour une durée de 72 h. Au terme de ce traitement, les cellules vivantes produisent à partir du MTT mis en leur présence des cristaux de formazan. Ces cristaux dissous dans du DMSO produisent une solution violette qui est mesurée par spectrophotométrie. Son intensité est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Etude de l'activité anti-radicalaire

Solvants et réactifs des tests d'activité anti-radicalaire

Pour les tests anti-radicalaires, nous avons utilisés du 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) (VWR, France), Quercetine (VWR, France), β -carotène (VWR, France), Acide linoléique (Sigma Aldrich, France), Tween 40 (VWR, France), Butyl Hydroxyl Toluène (BHT) (VWR, France).

Tests de l'activité anti-radicalaire

Deux tests ont été utilisés pour évaluer l'activité antiradicalaire de nos extraits.

Méthode au DPPH

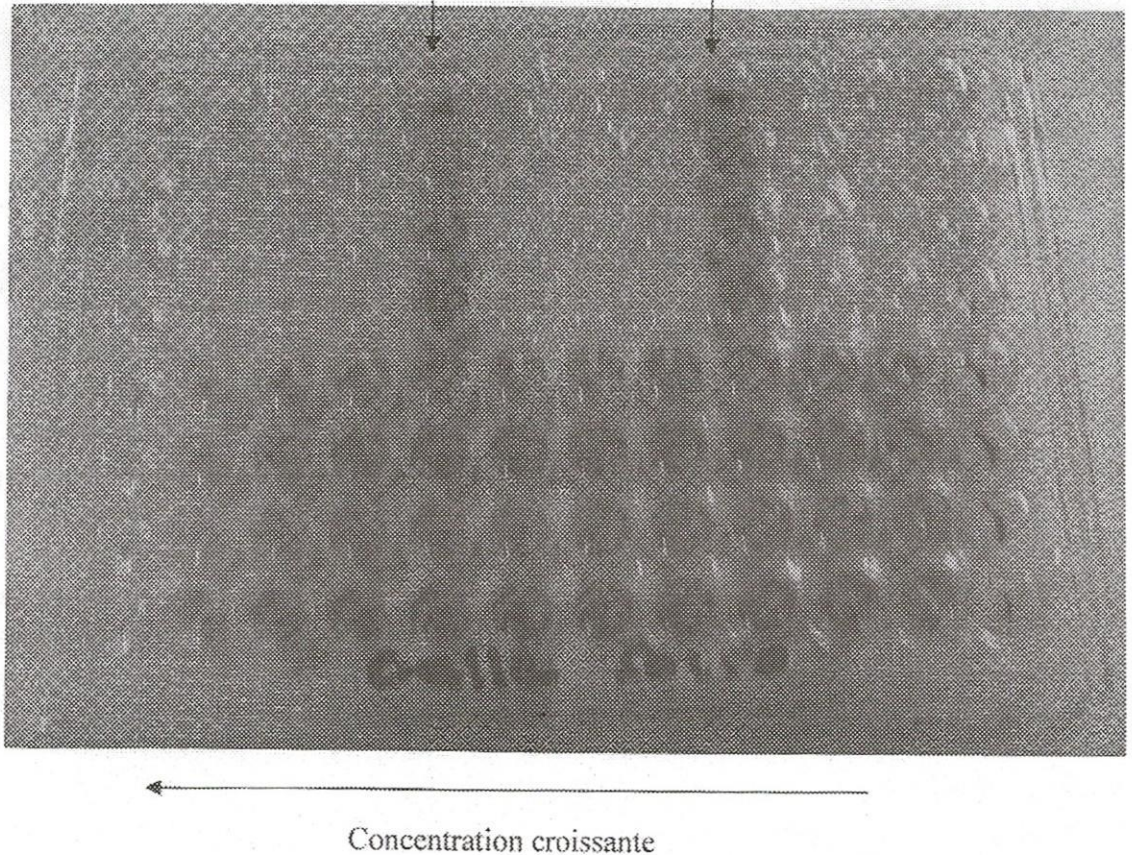
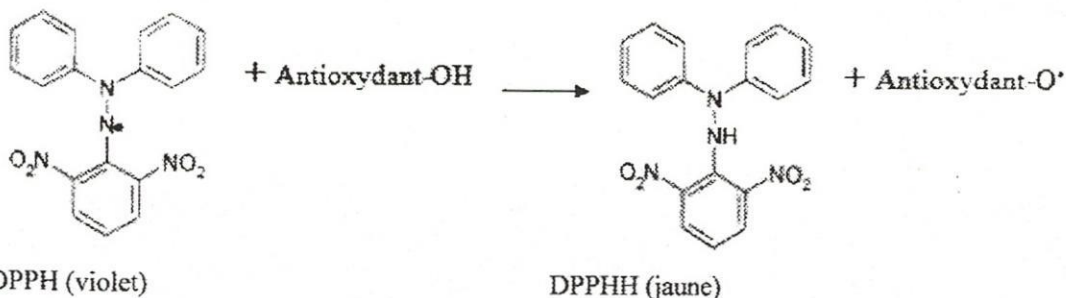


Figure 2: Illustration d'une plaque de 96 puits soumise au test antiradicalaire par la méthode au DPPH. Le DPPH est un radical libre très réactif qui, lorsque le test est positif passe de la coloration violette au jaune. Les flèches verticales indiquent les puits contrôles ne contenant pas d'extraits.

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits, nous avons utilisé le test au DPPH selon le protocole décrit par KIM et coll (2003). Le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité. Les conditions expérimentales ont été réalisées en quadruplicat avec dix huit concentrations.



Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test l'activité antiradicalaire des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par KARTAL et coll (2007).

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence ou non d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 25 μ l de méthanol) est mesurée à T0, à 24 h et à 48 heures.

Résultats

Le tableau I présente les rendements d'extraction obtenus après épuisement successif de feuilles et de galles de *Guiera Senegalensis* par des solvants de polarité croissante. Les extraits de feuilles présentent un meilleur rendement que ceux de galles. Le meilleur rendement a été obtenu avec les décoctés aussi bien pour les feuilles que pour les galles.

Les résultats obtenus après caractérisation des principales familles chimiques composant les extraits de galles et de feuilles de *Guiera Senegalensis* sont consignés dans le tableau II.

Tableau I. Rendement d'extraction en pourcentage par rapport à la poudre de drogue

Les extraits de feuilles présentent un meilleur rendement que ceux de galles. Le meilleur rendement a été obtenu avec les décoctés aussi bien pour les feuilles que pour les galles.

Solvants d'extraction	Poids drogues sèches (g)		Poids d'extraits secs (g)		Rendement (%)	
	Feuilles	Galles	Feuilles	Galles	Feuilles	Galles
CH ₂ Cl ₂	300	250	8,854	3,527	2,95	1,41
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 75 : 25	300	250	15,416	7,013	5,14	2,80
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 50 : 50	300	250	14,260	11,112	4,75	4,44
CH ₃ OH	300	250	50,03	19,520	16,67	7,81
Eau	300	250	34,650	16,813	11,55	6,72

Tableau II. Familles de composés chimiques mis en évidence dans les différents extraits
 -: Absence ; + : faible présence ; ++ : abondant ; +++ : très abondant

Solvants d'extraction	Groupes chimiques	Extraits	
		Feuilles	Galles
CH ₂ Cl ₂	Stérols et triterpènes	-	-
	Alcaloïdes bases	-	-
	Coumarines	++	+
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 75 : 25 (v/v)	Alcaloïdes sels	++	++
	Flavonoïdes	++	++
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 50 : 50 (v/v)	Alcaloïdes sels	++	++
	Flavonoïdes	++	++
CH ₃ OH	Saponosides	+	+
	Tanins	+++	+++
Eau	Saponosides	+++	+
	Tanins	+++	+++

On note au regard de ce tableau que les tanins sont très abondants dans les extraits de feuilles et de galles. Les flavonoïdes et les alcaloïdes sels sont abondants aussi bien dans les extraits de feuilles que dans les extraits de galles.

Les coumarines sont abondantes dans les feuilles et en faible teneur dans les galles. Les saponosides sont très abondants dans le décocté des feuilles mais en petite quantité dans celui des galles.

Les valeurs de CI50 (c'est-à-dire la concentration qui inhibe de 50 % le taux de croissance de la population cellulaire considérée après trois jours de culture en présence du composé d'intérêt) déterminées pour les extraits de feuilles et de galle de *Guiera Senegalensis* et des deux substances cytotoxiques de référence utilisées pour le traitement de divers types de cancers (l'étoposide et le taxol), contre trois lignées cellulaires (U373, PC-3 et MCF-7), sont indiquées dans les tableaux III et IV.

Ces résultats indiquent que les extraits de galles induisent une meilleure activité anti-proliférative que les extraits de feuilles. Tous les extraits de galles ont montré une activité cytotoxique sur les cellules de cancer du sein plus élevée que celle induite par l'étoposide. Toutefois, l'effet anti-prolifératif du décocté aqueux de galles (CI50 = 2,1 ± 0,5 µg/ml) est comparable à celui du taxol sur la même lignée cellulaire (CI50 = 1,27 ± 0,04 µg/ml) (GNOULA *et al.*, 2008)

Le tableau V présente les résultats des tests antiradicalaires au DPPH. L'extrait méthanolique des feuilles avec une CI50 d'environ 39,12 µg/ml a montré la meilleure activité anti-radicalaire. L'extrait méthanolique des galles était également le plus actif avec une CI50 de l'ordre de 19,5 µg/ml.

Tableau III. Valeurs des CI50 (en $\mu\text{g/ml}$) d'extraits de feuilles de *Guiera Senegalensis* et des molécules cytotoxiques de référence

Lignées cellulaires	Extrait CH_2Cl_2	Extrait $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 75 : 25	Extrait $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50 : 50	Extrait CH_3OH	Décocté aqueux	Taxol	Etoposide
PC-3	>500	313 $\pm 5,7$	>500	416,66 $\pm 11,2$	>500	>2000	1,78 $\pm 0,02$
U373	475 $\pm 15,2$	254 $\pm 17,5$	415 $\pm 13,1$	307,5 $\pm 23,4$	491 $\pm 9,7$	5,15 $\pm 0,03$	10,2 0,08
MCF-7	>500	>500	415 $\pm 23,4$	243,75 $\pm 12,1$	87,5 $\pm 6,05$	1,27 $\pm 0,04$	47,6 $\pm 0,06$

Tableau IV. Valeurs des CI50 (en $\mu\text{g/ml}$) d'extraits de galles de *Guiera Senegalensis* et des molécules cytotoxiques

Lignées cellulaires	Extrait CH_2Cl_2	Extrait $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 75 : 25	Extrait $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50 : 50	Extrait CH_3OH	Décocté aqueux	Taxol	Etoposide
PC-3	14,18	312,5	>500	>500	219,29	>2000	1,78
U373	47,5 $\pm 8,4$	23,66 $\pm 3,7$	18,1 $\pm 0,29$	310,33 $\pm 21,8$	258,18 $\pm 13,66$	5,15 $\pm 0,03$	10,2 0,08
MCF-7	9,8 $\pm 0,7$	32,7 $\pm 1,07$	13,45 $\pm 0,3$	6,25 $\pm 0,18$	2,1 $\pm 0,5$	1,27 $\pm 0,04$	47,6 $\pm 0,06$

Le test de blanchissement de la β -carotène a révélé que l'extrait le plus actif des feuilles était l'extrait au dichlorométhane avec une AAR (Activité Anti-radicalaire Relative) de 0,60 et l'extrait le plus actif des galles était l'extrait méthanolique avec une AAR de 0,53. Les composés polyphénoliques (flavonoïdes, tanins, etc...) présentent un fort potentiel antioxydant (figures 3 et 4).

Discussion

Notre étude avait pour but d'évaluer le potentiel antitumoral *in vitro* des feuilles et des galles de *Guiera senegalensis*.

Tableau V. Valeurs des CI50 après l'évaluation de l'activité anti-radicalaire d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* par la méthode au DPPH. Ces valeurs correspondent à la concentration pouvant piéger 50 % des radicaux libres présent dans la solution de DPPH, après 30 minutes d'incubation en présence des composés testés.

Type d'extrait	Extraits de feuilles	Extraits de galles
	IC50	IC50
Extrait CH ₂ Cl ₂	>1000	>1000
Extrait CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 75 :25	69,44 ± 0,7	39,12 ± 0,5
Extrait CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 50 :50	350 ± 3,5	39,12 ± 0,7
Extrait CH ₃ OH	39,12 ± 4,1	19,5 ± 0,2
Décocté	>1000	>1000
Quercé tinc	0,08 ± 0,004	

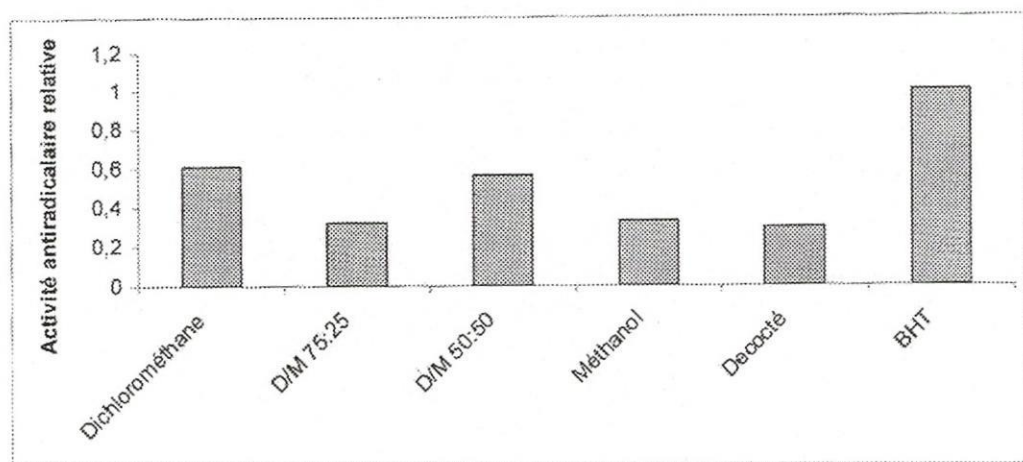


Figure 3. Activité anti-radicalaire relative des extraits de feuilles de *Guiera senegalensis*. Ces valeurs représentent la moyenne de quatre mesures différentes.

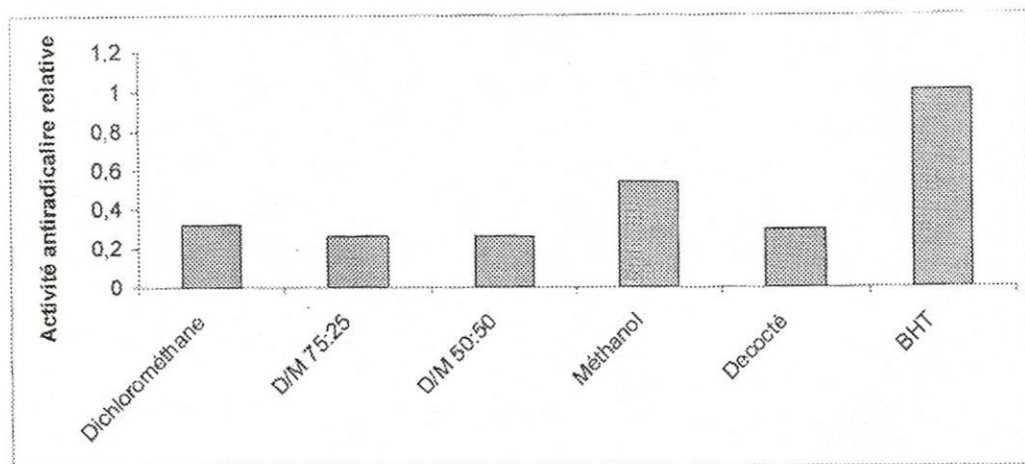


Figure 4. Activité antiradiculaire relative des extraits de galles de *Guiera senegalensis*. Ces valeurs représentent la moyenne de quatre mesures différentes.

Guiera senegalensis est une plante médicinale couramment utilisée en médecine traditionnelle africaine pour traiter divers maux (BOUCHET *et al.*, 1996 ; NACOULMA, 1996 ; BOUCHET *et al.*, 1998 ; SILVA et GOMES, 2003).

Nous avons ainsi entrepris de mettre en évidence les activités cytotoxique et antiradiculaire des extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis*.

Teneur et activité de nos extraits

La méthode d'extraction par épuisement successif à l'aide de solvants de polarité croissante a été adoptée. Nous avons ainsi obtenu cinq extraits totaux pour chacune des drogues végétales.

Des tests de caractérisation phytochimique ont été réalisés pour la mise en évidence des familles chimiques auxquelles appartiennent les composants des différents extraits. La connaissance de la nature de ces groupes chimiques a permis d'établir une relation entre l'activité cytotoxique et/ou anti-radicalaire des feuilles et des galles de *Guiera senegalensis* et leur composition chimique.

Les principaux composés chimiques mis en évidence dans les extraits de feuilles de *Guiera senegalensis* au cours de notre étude sont les alcaloïdes, les saponosides, les coumarines, les flavonoïdes et les tanins. Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet KOUMARÉ *et al.* ont mis en évidence des alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins dans les feuilles de *Guiera senegalensis*. NACOULMA/OUEDRAOGO en 1996 avaient également signalé la présence de ces mêmes éléments dans les tiges feuillées de la dite plante.

Les extraits de galles de *Guiera senegalensis* ont révélé la présence de tanins, de flavonoïdes et d'alcaloïdes. LAMIEN en 2005 a obtenu les mêmes résultats avec les extraits de galles. Cependant, contrairement à Lamien qui n'a détecté aucune trace de saponosides ni de coumarines, nos résultats indiquent des traces de saponosides et de coumarines. Une différence de l'hôte pathogène pourrait jouer sur la composition chimique des galles. De même, le temps de séjour de l'organisme pathogène au sein des galles pourrait également modifier leur composition chimique. La technique de

caractérisation et la méthode d'extraction utilisées peuvent également être incriminées. Certains composés sont présents dans les plantes à des concentrations très faibles d'où la nécessité de concentrer les extraits ou d'utiliser des méthodes sensibles pour leur caractérisation.

Il faut signaler que nos extraits de par les résultats des tests de caractérisation étaient riches en composés phénoliques (flavonoïdes, tanins, coumarine) qui ont des activités cytotoxique et anti-radicalaires prouvées (BOUCHET *et al.*, 1998).

Les galles ont montré une plus grande teneur en composés phénoliques. En effet, des études ont prouvées que la présence d'insectes dans les organes de certaines plantes hôtes augmente la teneur en flavonoïdes, tanins ou acides phénoliques de ces plantes (SOUCHON, 1965 ; SCUTANEAU et LINGEMAN, 1992).

De très nombreuses études sur les propriétés cytotoxiques et antitumorales d'extraits végétaux ont montré des résultats variables en fonction des lignées cellulaires utilisées.

Des travaux menés par FIOT *et al.* en 2005 ont montré une faible cytotoxicité de l'harmane et de la tetrahydroharmane (alcaloïdes des feuilles de *Guiera senegalensis*) sur les cellules HeLa et HCT-116.

Aucune étude ne fait cas de la cytotoxicité des galles de *Guiera senegalensis*.

Par contre, BOUCHET *et al.*, en 1998, ont démontré l'activité antioxydante de galles de *Guiera senegalensis*.

Etude *in vitro* de l'activité cytotoxique

Nous avons mis en évidence dans nos extraits des alcaloïdes, des tanins, des saponosides et des flavonoïdes. Plusieurs études ont montré que certains de ces composés notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes et les saponosides possèderaient des propriétés antitumorales (SPARG *et al.*, 2004 ; FIOT *et al.*, 2006).

L'étude de l'activité cytotoxique nous a clairement montré que les feuilles n'avaient pratiquement aucune activité sur la prolifération cellulaire globale des lignées cellulaires étudiées et ce, bien que contenant des saponosides, les flavonoïdes et des alcaloïdes. Ceci pourrait s'expliquer par deux hypothèses :

- la glycolisation des flavonoïdes bloquerait leur entrée dans les cellules cancéreuses, d'où l'inactivité de certains extraits. En effet les flavonoïdes sont généralement cytotoxiques, mais cette efficacité dépend d'une part de leur glycolisation éventuelle et d'autre part de leur degré de méthylation. La structure des flavonoïdes présents dans nos extraits de feuilles ne correspondrait vraisemblablement pas à celle des flavonoïdes à activité cytotoxique ;
- des saponosides sont décrits dans la littérature comme possédant une forte activité cytotoxique prouvée (PETTIT *et al.*, 1991). Les saponosides sont connues pour leur propriété tensioactive, leur action hémolytique et leur toxicité sur les animaux à sang froid. Ces saponosides pourraient agir en tant qu'agents anti-cancéreux potentiels en empêchant la carcinogenèse ou par des effets antiprolifératifs et/ou cytotoxiques directs contre des cellules cancéreuses tant *in vitro* qu'*in vivo* (PETTIT *et al.* ; 1991 ; LACAILLE-DUBOIS et WAGNER, 1996). L'extrait méthanolique et le décocté de galles riche en saponosides ont montré une activité cytotoxique sur les cellules de cancer du sein.

Hormis ces deux hypothèses, il ne faut pas exclure la nature de la lignée cellulaire. Il faut comprendre par cela que selon la lignée cellulaire utilisée pour les tests cytotoxiques le pouvoir cytotoxique peut varier.

La présence de flavonoïdes dans les extraits au dichlorométhane des galles pourrait expliquer au moins en partie l'activité cytotoxique mise en évidence. En effet, les flavones polyméthoxylées non glycosylées ainsi que des molécules voisines obtenues par des modifications chimiques simples, montrent une très forte capacité à bloquer la prolifération des cellules humaines issues de cancers du sein, de la prostate, du colon, du poumon et de la peau. Nous pouvons également souligner le fait que les galles de par leur capacité à lutter contre les insectes pathogènes qui les colonisent pourraient contenir des métabolites cytotoxiques.

Etude de l'activité-antiradicalaire

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé. De nombreuses études réalisées sur les produits naturels ont prouvé que ce sont particulièrement les composés phénoliques qui sont responsables de leur activité antioxydante. Nous avons donc évalué le pouvoir antioxydant de nos extraits qui se sont montrés riches en tanins et flavonoïdes. Pour ce faire, nous avons utilisé deux méthodes à savoir la méthode au DPPH et la méthode de blanchissement de la β -carotène.

Les résultats diffèrent sensiblement selon le test utilisé. Cela pourrait s'expliquer par la sensibilité propre à chaque test. L'utilisation de deux tests différents nous a permis d'avoir une meilleure lecture de l'activité anti-radicalaire de nos extraits.

Avec la méthode au DPPH, l'extrait le plus actif des feuilles était l'extrait méthanolique avec une CI50 de $\pm 39,12 \mu\text{g/ml}$. L'extrait méthanolique était également le plus actif des extraits de galles avec une CI50 de $\pm 19,5 \mu\text{g/ml}$. Le test de blanchissement de la β -carotène a révélé que l'extrait le plus actif des feuilles était l'extrait dichlorométhane avec une AAR de 0,60 et l'extrait le plus actif des galles était l'extrait méthanolique avec une AAR de 0,53. Les composés phénoliques présentent un fort potentiel antioxydant, composés qui ont été mis en évidence dans les extraits méthanolique et aqueux. BOUCHET et collaborateurs en 1998 avait également montré l'activité antioxydante des galles de *Guiera senegalensis*. Les décoctés aqueux n'ont montré aucune activité anti-radicalaire contrairement aux extraits méthanoliques. Les polyphénols des décoctés ont pu être détruits par la chaleur lors de l'ébullition. Les extraits au dichlorométhane se sont révélés inactifs et deux hypothèses pourraient être émises pour expliquer à leur inactivité : soit que ces extraits ne contiendraient pas de composés polyphénoliques du fait du caractère peu polaire du dichloro-méthane ; soit que les polyphénols présents ne correspondraient pas à ceux possédant des propriétés cytotoxiques.

Le test de blanchissement de la β -carotène nous a permis de déterminer l'activité antioxydante relative (AAR) de nos extraits que nous avons comparé à celle de la BHT (contrôle positif) qui est de 100 %.

Les extraits de feuilles ont montré une meilleure activité anti-radicalaire car plus riches en polyphénols.

L'extrait au dichlorométhane des feuilles a révélé une bonne activité anti-radicalaire. On peut expliquer l'activité des extraits apolaires par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs en 1994. Etant donné que le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, FRANKEL et MEYER (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène, alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

La relation entre nos expérimentations

Plusieurs études ont montré le lien entre la consommation d'aliments riches en antioxydants et l'incidence de certaines pathologies comme le cancer, les maladies cardiaques, le diabète et d'autres maladies liées au vieillissement. Néanmoins, il y a des avis encore controversés (ALBANES et HARTMAN, 1999). Les composés phénoliques pourraient empêcher le cancer par l'action antioxydante et/ou la modulation de plusieurs fonctions des protéines. Les composés phénoliques peuvent empêcher la carcinogenèse en affectant les événements moléculaires dans le déclenchement, la promotion et les étapes de progression (YANG *et al.*, 2001). Les composés phénoliques ont démontré l'agonisme et/ou l'antagonisme des récepteurs carcinogenèse-connexes tels que le récepteur d'arylhydrocarbène, le facteur de croissance épidermique et le récepteur H d'œstrogène. Ils modulent la sécrétion des protéines kinases intervenant dans la prolifération des cellules tumorales et induisent l'expression des enzymes anti-carcinogéniques ou empêchent l'induction des enzymes de cancer-promotion (HO *et al.*, 1994 ; OWEN *et al.*, 2000 ; SAKAKIBARA *et al.*, 2003). Quelques composés phénoliques (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les quinones, les coumarines) ont prouvé une activité antioxydante efficace et ont également eu des activités anticancéreuses/ anticarcinogénique/ antimutagénique (HO *et al.*, 1994 ; OWEN *et al.*, 2000 ; YANG *et al.*, 2001 ; TAPIERO *et al.*, 2002). De même, quelques molécules de tanin (par exemple, les polyphénols de thé) ont une activité anticancéreuse ou anticarcinogénique ou antimutagénique (CHUNG *et al.*, 1998).

CHUNG et collaborateurs (1998) ont précisé dans leur revue que le potentiel anticarcinogénique ou antimutagénique des tanins pourrait être lié à leur propriété antioxydante. Par conséquent, les composés phénoliques présents dans les plantes médicinales et leurs propriétés antioxydantes pourraient jouer un rôle important dans la prévention ou le traitement du cancer.

Les extraits de feuilles de *Guiera senegalis* n'inhibent pas la prolifération cellulaire globale des cellules cancéreuses utilisées. Nous avons même constaté qu'au bout des 48 heures de mise en contact des extraits avec les cellules, la population cellulaire de certains puits augmentait. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les extraits de feuilles de par leur pouvoir antioxydant pourraient « réparer » les cellules cancéreuses, ce qui expliquerait l'augmentation de la population cellulaire.

Les galls avaient montré une meilleure activité anti-proliférative. Leur pouvoir antioxydant prouvé dans cette étude et par Koumaré et collaborateurs en 1998, pourrait être avancé pour expliquer cette action anti-proliférative. En effet, l'action anticancéreuse des composés phénoliques impliquerait d'autres mécanismes comme l'activité antioxydante pouvant intervenir conjointement.

Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence par des tests validés l'activité antiproliférative et anti-radicalaire d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis*. L'étude phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes et de polyphénols (flavonoïdes, tanins et coumarines) dans les feuilles et les galles ; mais également la présence de saponosides majoritairement dans les feuilles. Ces composés chimiques ont fait l'objet de plusieurs études et ont montré une bonne activité cytotoxique et anti-radicalaire. Le décocté aqueux de galles a montré une activité antiproliférative bien supérieure à celle de l'étoposide et comparable à celle du taxol sur la lignée MCF-7. Les feuilles aussi bien que les galles, ont montré une activité anti-radicalaire. Néanmoins cette activité était inférieure à celle de la molécule de référence utilisée, la quercétine.

Les activités cytotoxique et anti-radicalaire sont impliquées dans la prévention et le traitement du cancer.

Ces résultats préliminaires pourraient constituer une base scientifique pour la recherche de nouveaux composés antitumoraux.

Du fait du potentiel thérapeutique des galles, on pourrait envisager de développer des phytomédicaments standardisés dont la production à partir de la poudre de galles de la plante ne nécessite pas d'équipements particuliers.

Des études complémentaires seront nécessaires pour rendre ce travail utilisable dans le cadre de la mise au point d'un phytomédicament.

Cette étude pourrait éventuellement être complétée par un bio-guidage de nos extraits. Cela va consister à fractionner le décocté aqueux de galles sur les cellules de cancer du sein (MCF-7), à purifier les fractions les plus actives et à déterminer la structure chimique du composé responsable de l'effet cytotoxique.

Références Bibliographiques

- ALBANES D., HARTMAN T.J., 1999. Antioxidants and cancer : evidence from human observational studies and intervention trials. Papas, A.M. (Ed.), Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. CRC Press, Boca Raton, Florida, 497-544.
- BOUCHET N., LEVESQUE J., BLOND A., BODO B., POUSSET J.L., 1996. 1,3-di-o-galloxyquinine acid from *Guiera senegalensis*. phytochemistry 42:189-190.
- BOUCHET N., BARRIER L., FAUCONNEAU B., 1998. Radical scavenging activity and antioxidant property of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). Phytotherapy research 12: 159-162.
- CHUNG K.T., WONG T.Y., HUANG Y.W., LIN Y., 1998. Tannins and human health : a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38 (6) : 421-464.
- CIULEI I., 1982. *Methodology for analysis of vegetable drugs*. Ministry of Chemical industry, Bucharest, p. 67.
- FIOT J., SANON S., AZAS N., MAHIOU V., JANSEN O., ANGENOT L., BALANSARD G., OLLIVIER E., 2006. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera Senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology 106 : 173-178.
- FRANKEL E.N., MEYER AS, 2000. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acids on human low-density lipoprotein oxidation. Methods Enzymol. 335 : 256-65.
- GNUOLA C., MÉGALIZZI V., DE NÈVE N., SAUVAGE S., RIBAUCCOUR F., GUISSOU P., DUEZ P., DUBOIS J., INGRASSIA L., LEFRANC F., KISS R. and MIJATOVIC T., 2008. Balanitin-6 and -7 : Diosgenyl

saponins isolated from *Balanites aegyptiaca* Del. display significant anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Oncology 32 : 5-15.

HO C.T., OSAWA T., HUANG M.T., ROSEN R.T., 1994. Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices, and Herbs. American Chemical Society, Washington, DC.

KARTAL N., SOKMEN M., TEPE B., DAFERERA D., POLISSIOU M., SOKMEN A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry 100 : 584-589.

KIM K.S., LEE S., LEE Y. S., JUNG S.H., PARK Y., SHIN K.H, KIM B-K., 2003. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea* Journal of Ethnopharmacology 85 : 69-72.

KOUMARÉ M., CROS J., PITET G., 1998. Recherches sur les constituants chimiques de *Guiera senegalensis*. Plantes Médicinales et Phytothérapie. 2 : 204-209.

LACAILLE-DUBOIS M. A., WAGNER H., 1996. « A review of the biological and pharmacological activities of saponins. » Phytomedicine 2(4) : 363-86.

LAMIEN C. E., MEDA A., MANS J., ROMITO M., NACOUUMA O. G., VILJOEN G. J., 2005. Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology 96 : 249-253.

NACOUUMA O., 1996. Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso : cas du plateau central. Institut des Sciences Naturelles. Université de Ouagadougou.

OMS, 2006. Le cancer. Aide-mémoire. W. H. Organisation, World Health Organisation. 297 : 1-4.

OWEN R.W., GIACOSA A., HULL W.E., HAUBNER R., SPIEGELHALDER B., BARTSCH H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. European Journal of Cancer 36 (10) : 1235-1247.

PETTIT G. R., DOUBEK D. L., HERALD D. L., 1991. « Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the african medicinal plant *Balanites aegyptiaca*. » Journal of Natural Products 54(6) : 1491-1502.

RASTOGI T., HILDESHEIM A., SINHA R., 2004. « Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. » Nat Rev Cancer 4(11) : 909-917.

SAKAKIBARA H., HONDA Y., NAKAGAWA S., ASHIDA H., KANAZAWA K., 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (3) : 571-581.

SCUTAREANU P. et LINGEMAN R., 1992. Natural defense of pedunculate Oak (*Quercus robur*) against the defoliating insect *Euproctis chryorrhoea*. Proceeding of the 8th international symposium on insect-plant relationship. Kluwer Academics Publishers, 74-76.

FRANKEL E.N., SCHNEEMAN B.O., PARKS E., KEIM N.L., BARBIERI T., WU M.M., FONG A.K., 1994. Effects of a coratene-deficient diet on mesure of oxidative susceptibility and superoxide dismutase activity in adult women. Free Radic Biol Med. 17(6) : 537-44.

FRANKEL E.N., MEYER A. S., 2000. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. J Agric Food Chem. 48(10) : 4874-82.

SILVA O., GOMES E. T., 2003. Guieranone A, a naphthyl butenone from the leaves of *Guiera senegalensis* with antifungal activity. Journal of Natural Product 66(3) : 447-9.

SOUCHON C., 1965. Les insectes et les plantes. Que sais-je? P.U.F, 1 (185) : 49-63.

SPARG S. G., LIGHT M.E., VAN STADEN J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology 94 : 219-243.

TAPIERO H., TEW K.D., BA N., MATHÉ G., 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomedicine and Pharmacotherapy 56 (4) : 200-207.

YANG C.S., LANDAU J.M., HUANG M.T., NEWMARK H.L., 2000. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annual Review Nutrition 21 : 381-406.