

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| ABREVIATIONS | 6 |
| RESUME | 8 |
| INTRODUCTION | 10 |
| A. La médecine traditionnelle africaine | 10 |
| I. Intérêt de la médecine traditionnelle africaine..... | 10 |
| II. Le diagnostic de la maladie en médecine traditionnelle africaine..... | 10 |
| III. Le traitement..... | 11 |
| B. Les helminthiases | 12 |
| I. La Problématique des helminthiases..... | 12 |
| II Les helminthiases..... | 13 |
| II.1 Classifications des helminthiases..... | 13 |
| II.1.1 Les cestodoses..... | 13 |
| II.1.2 Les trématodoses..... | 13 |
| II.1.3 Les nématodoses..... | 14 |
| II.2 Situation des helminthiases au Burkina Faso..... | 14 |
| II.3 Le Traitement des helminthiases..... | 15 |
| II.3.1 Les benzimidazoles..... | 15 |
| II.3.2 Praziquantel..... | 15 |
| II.3.3 Pipérazine..... | 16 |
| II.3.4 Pyrantel..... | 16 |
| II.3.5 Niclosamide..... | 17 |
| II.3.6 Diéthylcarbamazine..... | 17 |
| II.3.7 Levamisole..... | 17 |
| II.3.8 Ivermectine..... | 18 |
| II.4 Résistance aux anthelminthiques..... | 19 |
| II.5 Recherche de nouveaux anthelminthiques..... | 19 |
| II.6 Modèles expérimentaux pour la recherche d'anthelminthiques..... | 20 |
| C. <i>Balanites aegyptiaca</i> | 23 |
| I. Description botanique..... | 23 |
| II. Utilisations de <i>Balanites aegyptiaca</i> en médecine traditionnelle africaine..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| II.1 Les utilisations en médecine humaine..... | 24 |
| II.2 Les utilisations en médecine vétérinaire..... | 25 |
| III. Etudes pharmacologiques..... | 25 |
| IV. Etudes phytochimiques..... | 25 |
| V. Pourquoi avons-nous décidé d'étudier cette plante? | 28 |
| D. Le cancer et les traitements anti-tumoraux..... | 29 |
| I. Le cancer..... | 29 |
| I.1 Généralités..... | 29 |
| I.2 Epidémiologie..... | 30 |
| I.3 Traitements..... | 32 |
| I.3.1 Généralités..... | 32 |
| I.3.2 La chimiothérapie..... | 33 |
| I.3.2.1 Classification des agents anti-cancéreux utilisés en chimiothérapie..... | 34 |
| I.3.2.1.1 Les agents alkylants..... | 35 |
| I.3.2.1.2 Les agents intercalants..... | 35 |
| I.3.2.1.3 Les agents antimétabolites et les inhibiteurs des topoisomérases..... | 35 |
| I.3.2.1.4 Les poisons du fuseau mitotique..... | 35 |
| I.3.2.2 Médecine traditionnelle africaine et traitement du cancer..... | 36 |
| II. Transformation d'un tissu normal en tissu cancéreux..... | 37 |
| II.1 La théorie embryonnaire de Pierce..... | 37 |
| II.2 La théorie moléculaire de Nowell..... | 38 |
| II.3 La combinaison des deux théories permet d'expliquer l'émergence de clones cellulaires tumoraux résistant à la chimiothérapie..... | 39 |
| III. Quelles sont les propriétés biologiques qui différencient un tissu normal d'un tissu tumoral bénin d'un tissu cancéreux ?..... | 40 |
| III.1 Définitions..... | 40 |
| III.2 Le cycle cellulaire..... | 40 |
| III.2.1 Les différentes étapes du cycle cellulaire..... | 40 |
| III.2.2 Le système de contrôle du cycle cellulaire..... | 41 |
| III.3 Les principaux types de mort cellulaire..... | 42 |
| III.3.1 Généralités..... | 42 |
| III.3.2 L'apoptose: la mort cellulaire programmée de type I..... | 43 |
| III.3.2.1 Définition et généralités..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| III.3.2.2 Les mécanismes de régulation de l'apoptose..... | 43 |
| III.3.3 L'autophagie: la mort cellulaire programmée de type II..... | 45 |
| III.3.3.1 Généralités et mécanismes de régulation..... | 45 |
| III.3.3.2 Autophagie et thérapie anti-cancéreuse..... | 47 |
| III.3.4 La perméabilisation des membranes lysosomales..... | 48 |
| III.3.5 Les autres types de mort cellulaire..... | 49 |
| IV. Les mécanismes d'invasion des tissus normaux par les cellules cancéreuses..... | 49 |
| IV.1 Généralités..... | 49 |
| IV.2 La migration cellulaire..... | 50 |
| IV.2.1 L'adhésion..... | 50 |
| IV.2.2 La motilité..... | 50 |
| IV.2.3 L'invasion..... | 51 |
| IV.3 Les cellules cancéreuses migrantes sont résistantes à l'apoptose mais moins à l'autophagie..... | 52 |
| BUT DE L'ETUDE..... | 55 |
| MATERIEL ET METHODES..... | 56 |
| I. Etude de l'activité nématocide..... | 56 |
| I.1 Extraction et purification de substances nématocides des amandes de <i>Balanites</i> <i>aegyptiaca</i> | 56 |
| I.2 Mise au point et validation d'un test nématocide..... | 58 |
| I.2.1 Produits utilisés..... | 58 |
| I.2.2 Les organismes biologiques utilisés..... | 58 |
| I.2.3 Microscopie en fluorescence..... | 58 |
| I.2.4 Test pharmacologique d'évaluation d'effet nématocide <i>in vivo</i> | 59 |
| I.2.5 Test d'inhibition <i>in vitro</i> de l'acétylcholinestérase..... | 59 |
| II. Etude de l'activité anti-tumorale..... | 60 |
| II.1 Extraction de Bal-6/7..... | 60 |
| II.2 Caractérisation <i>in vitro</i> de l'activité anti-tumorale de Bal-6/7..... | 61 |
| II.2.1 Les produits utilisés..... | 61 |
| II.2.2 Les lignées cellulaires et les milieux de culture..... | 61 |
| II.2.3 Test MTT pour l'évaluation de la croissance cellulaire globale..... | 62 |
| II.2.4 Vidéo-microscopie quantitative..... | 62 |
| II.2.5 La microscopie en fluorescence..... | 63 |

| | |
|--|----|
| II.2.6 La cytométrie en flux..... | 64 |
| II.2.6.1 Caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur la cinétique du cycle cellulaire..... | 65 |
| II.2.6.2 Caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur l'induction de l'apoptose..... | 65 |
| II.2.6.3 Caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur la formation de compartiments cellulaires acides..... | 66 |
| II.2.7 Dosage de l'ATP intracellulaire par bioluminescence..... | 67 |
| II.2.8 Mesure <i>in vitro</i> de l'inhibition de la pompe à sodium par spectrophotométrie..... | 68 |
| II.2.9 Evaluation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) par cytométrie en flux..... | 68 |
| II.3 Mesure de l'activité anti-tumorale <i>in vivo</i> | 69 |
| II.3.1 Détermination de la dose maximale tolérée (DMT)..... | 69 |
| II.3.2 Evaluation de l'activité anti-tumorale <i>in vivo</i> sur le modèle de la leucémie murine L1210..... | 69 |

RESULTATS.....70

| | |
|--|-----------|
| I. Etude de l'activité nématocide <i>in vitro</i>..... | 70 |
| I.1 Validation d'un test <i>in vitro</i> d'évaluation d'activité nématocide..... | 70 |
| I.2 Criblage bio-guidé des amandes de <i>Balanites aegyptiaca</i> | 72 |
| I.3 Détermination du profil d'activité de Bal-7..... | 74 |
| II. Caractérisation de l'effet anti-tumoral de Bal-6/7..... | 76 |
| II.1 Inhibition de la prolifération de six lignées cellulaires de cancer humain..... | 77 |
| II.2 Effets de Bal-6/7 sur la morphologie des cellules A549 et U373..... | 77 |
| II.3 Détermination des effets de Bal-6/7 sur les paramètres de cinétique cellulaire et sur l'induction de la mort par apoptose dans les cellules cancéreuses A549 et U373..... | 78 |
| II.4 Caractérisation de l'effet de Bal-6/7 sur l'accumulation de vésicules acides..... | 80 |
| II.5 Etude de l'effet de Bal-6/7 sur la perméabilisation lysosomiale au sein des cellules cancéreuses A549 et U373..... | 81 |
| II.6 Caractérisation des effets induits par Bal-6/7 sur la concentration intracellulaire en ATP ([ATP] _i), sur la production intracellulaire de ROS et sur l'activité de la pompe à sodium (la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase)..... | 82 |
| II.7 Réduction des effets cytotoxiques du mélange Bal-6/7 par apport exogène de sucres ou de glycine..... | 83 |

| | |
|---|------------|
| II.8 Le mélange Bal-6/7 induit une désorganisation majeure du cytosquelette d'actine au sein des cellules cancéreuses A549 et U373..... | 84 |
| II.9 Effets anti-tumoraux <i>in vivo</i> de Bal-6/7..... | 85 |
| DISCUSSION..... | 86 |
| I. Caractérisation de l'effet nématocide de Bal-7..... | 87 |
| II. Caractérisation de l'effet anti-tumoral de Bal-6/7..... | 93 |
| III. Quels sont les liens entre nos expérimentations?..... | 97 |
| CONCLUSIONS..... | 98 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 100 |
| ANNEXES..... | 114 |

ABREVIATIONS:

AIF: *apoptosis inducing factor*
Akt: *Protein kinase B*
AMF: *autocrine motility factor*
APAF1: *apoptotic protease activating factor 1*
APC: *anaphase promoting complex*
Bad: *BCL-2- antagonist of cell death*
Bal-7: *balanitine-7*
Bal-6/7: *mélange de balanitines -6 et -7*
Bax: *BCL-2- associated X protein*
Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*
Cdk: *cyclin-dependent protein kinase*
CFDA: *5(6)- carboxyfluorescéine diacétate*
CKI: *cyclin dependent kinase inhibitors*
Cdc25: *cycle division control protein 25*
DAPK: *death associated protein kinase*
DISC: *death induced signalling complex*
DNA: *desoxyribonucleic acid*
DRP1: *death associated related protein kinase 1*
DR4: *death receptor 4*
DR5: *death receptor 5*
EGF: *epidermal growth factor*
EGFR: *epidermal growth factor receptor*
ERK: *extracellular signal-regulated kinase*
FAS: *TNF receptor superfamily, member 6*
FKHRL1: *forkhead transcription factor*
HER2: *human epidermal growth factor receptor*
HGF: *hepatocyte growth factor*
IGF: *insuline-like growth factor*
IKK: *inhibitor kappa B kinase*
LHRH: *luteinizing hormone- releasing hormone*
LMP: *lysosomal membrane permeabilization*

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MAP-LC3: *microtubule-associated protein light-chain 3*

MMP: *matrix metalloproteases*

mTOR: *mammalian rapamycin target*

PBS: *phosphate buffer solution*

PDGF: *platelet derived growth factor*

PDGFR: *platelet derived growth factor receptor*

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*

PI3P: *phosphatidylinositol 3-phosphate*

PIP2: *phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate*

PTEN: *phosphate and tensin homologue*

RNA: *ribonucleic acid*

ROS: *reactive oxygen species*

SCF: *skp1-cullin1-f-box*

TNF: *tumor necrosis factor*

TNFR: *TNF Receptor*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor*

TRAIL: *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TRAIL R1: *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*

TSA: *tryptone soy agar*

RESUME

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.

Le présent travail a été réalisé dans le but de rechercher les preuves scientifiques de l'activité anthelminthique des extraits d'amandes de *Balanites aegyptiaca* utilisés en médecine traditionnelle africaine et d'évaluer une activité potentiellement anti-tumorale du ou des principe(s) actif(s) responsable(s) de l'activité anthelminthique.

Pour caractériser l'activité nématocide des extraits des amandes de *Balanites aegyptiaca*, nous avons tout d'abord mis au point un test d'évaluation de l'activité toxique en tenant compte des limitations des tests existants. La validation pharmacologique (mesurant la sélectivité, la linéarité, l'exactitude et la précision) a consisté en la détermination de l'activité nématocide d'anthelminthiques couramment utilisés. Pour la caractérisation de l'activité nématocide des amandes de *Balanites aegyptiaca*, puis le fractionnement, l'isolement et la purification de(s) agent(s) nématocide(s) nous avons adopté la stratégie du fractionnement bio-guidé. Les résultats obtenus montrent que le produit isolé (déterminé comme étant la balanitine-7 ou Bal-7) induit une activité toxique plus élevée sur les vers adultes que sur les stades larvaires. Bal-7 s'est avéré moins toxique que le levamisole, le mébendazole et le thiabendazole, mais plus toxique que le pyrantel, le niclosamide et la pipérazine. La présente étude a donc permis de montrer que les amandes de *Balanites aegyptiaca*, utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso, pourraient être efficaces dans le traitement des parasitoses intestinales.

Certains anthelminthiques comme les benzimidazoles, du fait de leur activité d'inhibition de la polymérisation des tubulines, présentent une activité anti-tumorale. Aussi, faisant suite à la mise en évidence de l'activité nématocide de Bal-7 nous avons entrepris de caractériser l'activité anti-tumorale de balanitines. La méthode d'extraction que nous avons utilisé pour évaluer l'effet anti-tumoral de la Bal-7 est distincte de celle que nous avons utilisée pour évaluer l'effet anthelminthique de cette balanitine. Ainsi, alors que la méthode d'extraction que nous avons utilisée pour obtenir de la Bal-7 pour nos tests liés à l'activité anthelminthique semble avoir conduit à l'isolement de la balanitine-7 pure, la méthode d'extraction que nous avons utilisée pour observer les effets anti-tumoraux potentiels de cette balanitine-7 nous ont conduit à isoler un

mélange de balanitrine-6 et de balanitrine-7 dans des proportions de 28/72%. Nous avons dénommé ce mélange Bal-6/7. L'activité anti-tumorale a été évaluée sur deux lignées cancéreuses humaines (A549, cancer du poumon non-à-petites cellules et U373, glioblastome). Dans ce travail, nous avons montré que Bal-6/7 induit la mort des cellules tumorales par une déplétion marquée de l' $[ATP]_i$ et une désorganisation majeure du cytosquelette d'actine. *In vivo*, Bal-6/7 a montré une activité anti-tumorale modeste, mais néanmoins statistiquement significative. A ce jour, il n'existe pas sur le marché, d'anti-cancéreux dirigé contre les filaments d'actine. Etant donné le rôle de ces filaments d'actine dans la prolifération et la migration des cellules tumorales, le développement de médicaments ayant cette protéine pour cible constituerait une avancée majeure dans la recherche de nouvelles thérapies anti-tumorales. Le mélange Bal-6/7, isolé pour la caractérisation de l'activité anti-tumorale des balanitines, du fait de son potentiel anti-tumoral, présente donc un intérêt certain en thérapeutique anti-cancéreuse. Il serait donc envisageable de développer par synthèse ou hémisynthèse des dérivés de balanitines présentant un meilleur index thérapeutique que le mélange Bal-6/7.

INTRODUCTION

A. La médecine traditionnelle africaine.

I. Intérêt de la médecine traditionnelle africaine.

En Afrique, en Asie et en Amérique latine, de nombreux pays font appel à la médecine traditionnelle pour répondre à certains de leurs besoins en soins de santé primaire. En Afrique la médecine traditionnelle constitue le premier recours pour près de 80% de la population (OMS, 2002). La médecine traditionnelle africaine peut être définie comme un ensemble de savoirs, de connaissances, de pratiques explicables ou non, de techniques de préparation et d'utilisations de substances d'origine végétale, animale ou minérale (OMS, 2002). Ces savoirs et connaissances basés sur les fondements socio-culturels et religieux des communautés africaines s'appuient sur des expériences vécues et des observations transmises de génération en génération (OMS, 2002).

II. Le diagnostic de la maladie en médecine traditionnelle africaine.

En médecine traditionnelle africaine, le diagnostic présente plusieurs aspects :

- L'anamnèse : elle consiste à interroger le patient pour rechercher ses antécédents, ceux de sa famille et son contexte social (Sofowora, 1996).
- L'observation du patient : elle implique une observation de l'attitude et de la gestuelle du patient (en particulier en cas de maladie mentale) (Sofowora, 1996). Cette observation peut habilement être étendue aux parents pour déterminer si la maladie observée est un trait de famille (Sofowora, 1996).
- L'examen visuel : les yeux, la peau, l'urine et les selles sont aussi examinés en médecine traditionnelle en particulier dans le cas d'ictère (ou jaunisse en médecine traditionnelle africaine) ou d'éruptions cutanées (Sofowora, 1996).
- L'examen biologique: le tradithérapeute utilise ses propres organes sensoriels pour effectuer les examens biologiques : goûter les urines à la recherche de sucre, sentir les plaies à la recherche de signes de putréfaction (qui nécessitera l'emploi d'antimicrobiens puissants), observer la couleur des vomis, ... (Sofowora, 1996).

Certains insectes comme les fourmis peuvent être utilisés comme outils diagnostiques (Sofowora, 1996). En effet, quand un patient, chez qui l'on suspecte le diabète, urine dans le fond d'un jardin et que le site est infesté de fourmis moins d'une heure après la miction, le tradithérapeute conclut à la présence de sucre dans les urines de ce patient (Diabète) (Sofowora, 1996).

Certaines plantes sont également utilisées à des fins diagnostiques. Au Burkina Faso, *Dicliptera verticillata* (Forssk.) Acanthaceae est utilisé pour le diagnostic du paludisme chez l'enfant (Sawadogo, 2006a). Il consiste à frotter le corps de l'enfant avec des tiges portant des feuilles fraîches, puis à observer le changement de teinte du résidu. Le diagnostic est dit «positif» si le résidu prend une teinte jaune verdâtre à rouge violacée et négatif si la coloration du résidu reste inchangée (rose pâle) (Sawadogo, 2006a).

III. Le traitement.

En médecine traditionnelle africaine, le patient est considéré comme une « entité » et le traitement proposé a pour objet de rétablir son équilibre (Sofowora, 1996). Le genre de traitement proposé varie et est, dans une certaine mesure, indicatif de la spécialisation du tradipraticien.

Dans le cas d'un traitement médical, des végétaux (racines, tiges, écorces, feuilles, graines, latex, résine...) sont employés seuls ou en association. Des animaux entiers ou des parties d'animaux (caméléons, tortues, têtes de serpents,...) et des substances minérales (alun, argile ferrugineuse, kaolin, sel,...) sont aussi utilisés (Sofowora, 1996).

Bien que le traitement prescrit puisse ne contenir qu'un seul élément actif, il est souvent un mélange de composants. En effet, certains composants sont des agents conservateurs, d'autres des aromatisants et d'autres encore des agents colorants (Sofowora, 1996). Des préparations à composants multiples sont, de préférence, prescrites en médecine traditionnelle africaine, pour le traitement de plusieurs maux (Sofowora, 1996).

Des préparations de médecine traditionnelle sont prescrites sous plusieurs formes. Elles peuvent être liquides (décoctions, infusions, lotions, gargarismes,...), solides (poudres, kaolin, herbes séchées pulvérisées mélangées à de la purée de maïs ou à des boissons pour administration orale), semi solides (certains baumes bruts, résines, latex) ou gazeuse (inhalations, fumigations, encens,...) (Sofowora, 1996).

B. Les helminthiases.

I. La Problématique des helminthiases.

Selon leur localisation, on classe les parasites humains en endoparasites (parasites des cavités profondes et tissus) et en ectoparasites (parasites de la peau et des cavités accessibles).

En fonction du nombre de cellules constitutives, les parasites sont classés en:

- Protozoaires (unicellulaire),
- Métazoaires (pluricellulaire),
 - les helminthes qui sont classés en vers ronds (némathelminthes) et vers plats (plathelminthes).
 - les arthropodes.

Tous ces parasites suivent un cycle évolutif au cours duquel ils subissent des mutations passant par plusieurs stades larvaires avant de prendre la forme adulte. Ce cycle peut être monoxène ou hétéroxène selon qu'il se déroule respectivement chez un seul ou plusieurs hôtes successifs. Dans ce dernier cas, on distingue l'hôte définitif qui héberge la forme sexuée du parasite et l'hôte intermédiaire (forme asexuée).

Au cours de ce cycle évolutif, les parasites peuvent avoir différents types d'action sur l'organisme de l'hôte :

- **Spoliation** : par détournement des aliments ingérés, avec pour conséquence des problèmes de dénutrition chez l'hôte. C'est le cas par exemple des taeniasis (vit B12), ou des ankylostome (sang total).
- **Action traumatique** : la migration de certains parasites entraîne des lésions tissulaires chez l'hôte. Ainsi *Dracunculus medinensis* est à l'origine d'effractions de la peau, les amibes phagocytent les cellules, notamment les hématies.
- **Action toxique** : la plupart des parasites ont la faculté de libérer des substances toxiques.
- **Action immuno-dépressive** : elle accompagne notamment le paludisme et les schistosomiases.
- **Action allergique** : elle est le fait des infections aux acariens et aux filaires.
- **Action mécanique** : l'hyper parasitisme à *Ascaris* peut provoquer une occlusion intestinale.

II Les helminthiases.

Les helminthiases ou parasitoses intestinales semblent de nos jours susciter de moins en moins d'intérêt, probablement en raison de priorités plus récentes telles que le sida. Or, plus de 2 milliards de personnes sont affectées à travers le monde, dont 300 millions souffrent d'associations morbides sévères avec plus de 155 000 décès par an (OMS, 2004). Le paludisme mis à part, ces affections constituent 40% des maladies tropicales (OMS, 2004).

Les helminthiases (parasitoses causées par des helminthes) sont des maladies liées à la pauvreté. Ces infections accroissent encore la souffrance et la mortalité de ces populations; de plus elles contribuent à la perpétuation de la pauvreté en diminuant les performances cognitives, la croissance des enfants et en réduisant la capacité de travail et la productivité des adultes (OMS, 2004).

II.1 Classifications des helminthiases.

II.1.1 Les cestodoses.

Les cestodoses sont des parasitoses intestinales provoquées par des cestodes (vers plats segmentés). Il s'agit par exemple de *Taenia saginata*, *T. solium*, *Hymenolepis nana*, *Diphyllobotrium latum* (**Tableau 1**).

On estime qu'environ 82 millions de personnes sont infectées par l'un ou l'autre de ces vers. Ces cestodoses se transmettent par voie alimentaire.

Les hôtes intermédiaires usuels de *T. saginata* et *T. solium* sont respectivement le bœuf et le porc. L'homme s'infectera par consommation de viande non cuite de bœuf ou de porc infectée par *T. saginata* et *T. solium*.

II.1.2 Les trématodoses.

Les trématodoses sont des infections parasitaires provoquées par des vers plats segmentés, les trématodes (*Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*). Ces schistosomes sont responsables des bilharzioses urinaire (*S. haematobium*), intestinales (*S. mansoni*). Les vers adultes des deux sexes vivent et se reproduisent dans les vaisseaux intestinaux et de la vessie. La femelle pond des œufs qui passent dans la vessie ou l'intestin provoquant une inflammation de ces organes. Il en résulte une hématurie ou des selles sanguinolentes. Les œufs ainsi rejetés vont éclore chez l'hôte secondaire, la miracidie. Après la partie de développement chez cet hôte,

des cercaires libres seront rejetés dans les eaux des rivières. Ces cercaires pourront infecter l'homme par effraction de la peau.

II.1.3 Les nématodoses.

Les nématodoses sont des parasitoses intestinales causées par les nématodes. Il s'agit par exemple de *Ascaris lumbricoïdes*, *Enterobius vermicularis*, *Trichiuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Necator americanus*, *Ankylostoma duodenale*.

On estime que 1 milliard de personnes sont infectées par *A. lumbricoïdes*, 500 millions par *T. trichiura* et 500 millions par *E. vermicularis*.

Ces nématodoses, aussi appelées "*maladies du péril fécal*" se transmettent par la consommation d'eau ou d'aliments souillés.

II.2 Situation des helminthiases au Burkina Faso.

En Afrique, les parasitoses intestinales constituent les pathologies les plus importantes et peuvent être, dans certaines situations, un véritable problème de Santé Publique. En effet, les conditions climatiques (température constamment élevée toute l'année, associée à une humidité relative élevée) sont favorables à la prolifération des helminthes et protozoaires responsables de ces maladies. Des études ont montré que l'ankylostomiase à *Necator americanus*, la trichocéphalose et l'ascaridiase sont les helminthiases les plus fréquentes dans la population générale, alors que les kystes d'*Entamoeba coli* et d'*Endolimax nana* étaient les protozoaires les plus souvent rencontrés dans les selles (Penali et coll., 1993; Menan et coll., 1997). Les helminthiases sont des maladies liées à la pauvreté. Ces infections accroissent encore la souffrance et la mortalité; de plus elles contribuent à la perpétuation de la pauvreté en diminuant les performances cognitives, la croissance des enfants et en réduisant la capacité de travail et la productivité des adultes (OMS, 2004).

Au Burkina Faso, environ 18,6% de la population est porteur de diverses espèces d'helminthes dont les principales sont : *Necator americanus* (7,4%), *Trichuris trichiura* (5,3%), *Ascaris lumbricoïdes* (4,0%) et *Schistosoma mansoni* (3,0%) (Menan et coll. 1997). Le pourcentage de polyparasitisme est de 13,3% par rapport à l'ensemble des parasités. La différence de prévalence par sexe n'est pas significative. Les jeunes de 10 à 19 ans sont les plus affectés les enfants de 0 à 4 ans (Menan et coll. 1997), les

agriculteurs, les éleveurs, les ménagères et les domestiques sont également très affectés (27,2%), alors que les citadins et les personnes instruites le sont moins (9,5%) (Menan et coll. 1997).

La prévalence des helminthiases varie selon les régions. Dans la région rizicole du sourou (sud ouest du Burkina Faso), par exemple, on observe une prévalence générale des parasitoses intestinales de 46,5% dans la zone d'étude et des prévalences de 20,9% pour *Schistosoma mansoni*, 10,6% pour *Entamoeba histolytica* (kystes d'amibes), 10,2% pour *Hymenolepis nana* (ténia), 1,65% pour *Necator americanus* (ankylostomes), 1,1% pour *Giardia intestinalis* (kystes) et *Strongyloides stercoralis* (anguilules) (Menan et coll. 1997).

Ces résultats montrent la nécessité de la mise en oeuvre de mesures d'assainissement et de l'éducation sanitaire de la population. Puis suivront les campagnes de déparasitage qui seront alors plus efficaces.

II.3 Le Traitement des helminthiases (Rang et coll., 1999).

Pour être efficace, un anthelminthique doit être capable de pénétrer la cuticule ou d'accéder au tractus digestif du parasite.

Un médicament anthelminthique peut agir en paralysant le vers, ou en endommageant leur cuticule, ce qui conduit à une digestion partielle ou à un rejet par les mécanismes immunitaires. Les médicaments anthelminthiques peuvent également interférer avec le métabolisme du parasite cible.

II.3.1 Les benzimidazoles.

La famille des benzimidazoles comprend le mébendazole, l'albendazole et le thiabendazole. Ces médicaments anthelminthiques présentent un large spectre d'activité, développant leur activité par une inhibition de la polymérisation des β -tubulines. Ces composés présentent une affinité 250 à 400 fois plus élevée pour les microtubules d'helminthes que pour ceux des tissus de mammifères.

Ils sont indiqués dans le traitement des nématodoses. La dose usuelle pour l'adulte est de trois comprimés en prise unique.

Les effets secondaires communs aux médicaments de cette famille sont des troubles gastro-intestinaux. Le traitement au thiabendazole s'accompagne souvent de céphalées, de réactions allergiques.

II.3.2 Praziquantel.

C'est un anthelminthique à large spectre. C'est le médicament de choix pour le traitement de toutes les espèces de schistosomes; il est efficace contre les cysticerques.

Le praziquantel développe son activité par altération de l'homéostasie du calcium de l'helminthe, provoquant une contracture musculaire qui entraîne une paralysie puis la mort du vers.

A dose thérapeutique, le praziquantel n'a aucun effet sur l'homme. En effet, absorbé il est rapidement métabolisé dans le foie en métabolites inactifs.

Les effets secondaires qui accompagnent les traitements au Praziquantel sont généralement transitoires. Il s'agit le plus souvent de troubles gastro-intestinaux, d'éruptions cutanées et de fièvre au long court.

II.3.3 Pipérazine.

Elle est utilisée pour le traitement des helminthiases à *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*. La pipérazine développe son activité anthelminthique par une inhibition réversible de la transmission neuro-musculaire du vers probablement par un effet GABA agoniste. Ceci provoque la paralysie des vers qui sont alors expulsés vivants.

Des effets secondaires liés aux traitements à la pipérazine ont été rapportés. Il s'agit notamment de troubles gastro-intestinaux, d'urticaire, de paresthésies et parfois, de broncho-spasmes.

II.3.4 Pyrantele.

C'est un dérivé tétrahydropyrimidique, dont l'effet pourrait s'exercer par dépolarisation des jonctions neuro-musculaires des helminthes, entraînant des spasmes et une paralysie. Le pyrantele présente également une activité anticholinestérase.

Son absorption gastro-intestinale est faible, car 50% du médicament sont éliminés par les fecès.

Les effets secondaires du pyrantele sont transitoires et concernent essentiellement des troubles digestifs.

II.3.5 Niclosamide.

C'est l'anthelminthique de choix pour le traitement des cestodoses. Il endommage de façon irréversible le scolex du vers (la partie céphalique du vers portant des crochets ou des ventouses qui permettent au vers d'adhérer à la paroi intestinale de l'hôte). Le vers ainsi libéré de ses «attaches» est expulsé par administration d'un laxatif deux heures après la prise du niclosamide.

On a observé très peu d'effets secondaires qui, de plus sont transitoires. Il s'agit de nausées et de vomissements.

II.3.6 Diéthylcarbamazine.

C'est un dérivé de la pipérazine qui est utilisé dans le traitement des filarioses à *Wuchereria bancrofti* et à *Loa loa*. La diéthylcarbamazine développe son activité en interférant avec le métabolisme de l'acide arachidonique du vers. Elle expulse rapidement des filaires de la circulation sanguine, mais développe un effet limité sur les filaires lymphatiques.

La diéthylcarbamazine est administrée par voie orale, absorbée, distribuée dans les cellules et les tissus de l'hôte.

Les effets secondaires liés à un traitement à la Diéthylcarbamazine sont des troubles digestifs, des arthralgies et des céphalées, principalement.

II.3.7 Levamisole.

Il est utilisé pour le traitement des nématodoses et particulièrement des ascaridiases. Le levamisole développe une activité nicotinique, par stimulation entraînant un blocage des jonctions neuro-musculaires. Les vers paralysés sont alors expulsés.

C'est un médicament administré par voie orale, rapidement absorbé et qui se distribue largement.

Les effets secondaires liés au traitement au levamisole sont des troubles digestifs, éruptions cutanées.

II.3.8 Ivermectine.

C'est un médicament utilisé pour le traitement des filaires, qui développe son activité par ouverture des canaux chlorés.

L'ivermectine est le médicament de choix pour le traitement de l'onchocercose. On obtient également des résultats intéressants pour le traitement des filaires à *Wuchereria bancrofti*.

Les effets secondaires induits par un traitement à l'Ivermectine sont, des éruptions cutanées, des douleurs musculaires.

II.4 Résistance aux anthelminthiques.

Des études ont rapporté, ces dernières années, des résistances aux anthelminthiques utilisés dans le traitement des schistosomiasés et des nématodosés (Waller, 1997; Elard, 1999; Geerts et Gryseels, 2000; Taylor et coll., 2002). Mais l'ampleur, les facteurs favorisants et le mécanisme de ces résistances font encore largement polémique. En ce qui nous concerne, nous nous intéresserons tout particulièrement aux facteurs responsables de l'émergence des résistances aux anthelminthiques en Afrique. Parmi les facteurs qui peuvent contribuer au développement des résistances aux anthelminthiques, on peut citer :

- Les campagnes de chimio-prophylaxie de masse; bien qu'il n'existe pas de données solides relatives à l'implication de telles campagnes dans la survenue de résistance aux anthelminthiques plusieurs auteurs pensent qu'elles ont réellement contribué à l'apparition et à l'expansion des phénomènes de résistances (Geerts et Gryseels, 2000; Geary et Thompson, 2003). Soulignons que le choix des anthelminthiques utilisés pour ces campagnes est basé sur des données épidémiologiques et non sur des examens parasitologiques,
- Les traitements à prise unique, favoriseraient la sélection des formes résistantes des parasites. Pour contrôler leur efficacité, de tels traitements devraient être surveillés par des examens parasitologiques, ce qui est rarement le cas en pratique.
- Le poly-parasitisme favorise l'émergence de résistances croisées.
- La fréquence des traitements. On a montré l'existence d'une relation entre l'apparition de résistance et une fréquence élevée de traitements antiparasitaires. On pense cependant qu'une fréquence peu élevée de traitements peut également

favoriser l'émergence de résistances aux anthelminthiques, surtout lorsque ce traitement est réalisé avec le même médicament pendant une longue période (plusieurs années).

Le problème posé par les résistances aux anthelminthiques devient plus en plus préoccupant, surtout en médecine vétérinaire. En effet, il n'existe plus de traitements efficaces contre les strongles (Waller, 1997).

II.5 Recherche de nouveaux anthelminthiques.

Les médicaments utilisés pour le traitement de ces helminthiases sont relativement efficaces et peu coûteux. En effet, un traitement anthelminthique coûte en moyenne 0.15 € (pour trois comprimés de mébendazole) (OMS, 2004). Si ce traitement est abordable, il n'est pas toujours accessible aux populations rurales. D'autre part, bien que, comme nous l'avons souligné, les données épidémiologiques manquent, de nombreux cas de résistance aux trois principaux groupes d'anthelminthiques (benzimidazoles, imidazothiazoles et lactones macrocycliques) sont observés (Van Wyk et Van Schalkwyk, 1990; Maciel et coll., 1996; Waller, 1997). La recherche de nouvelles molécules anthelminthiques dotées de nouveaux mécanismes d'action est donc une nécessité. La pharmacopée traditionnelle africaine pourrait constituer une alternative intéressante qui contribuerait également à résoudre le problème d'accessibilité des populations rurales aux médicaments modernes. En effet, les populations africaines utilisent de nombreuses recettes pour le traitement des parasitoses intestinales. Ces traitements sont basés, pour la plupart, sur l'utilisation d'extraits de plantes provenant de diverses familles. Les amandes de *Balanites aegyptiaca*, par exemple, sont utilisées au Burkina Faso pour le traitement des parasitoses intestinales.

Partir de ces recettes traditionnelles pour rechercher de nouvelles molécules anthelminthiques pourrait constituer une bonne approche.

En entreprenant un travail de recherche afin d'identifier les principes actifs d'une plante, il est totalement illusoire de prétendre isoler tous les constituants de cette plante ou ne fut-ce que d'une partie de la plante. D'autant plus que, parmi les centaines ou les milliers de différentes substances présentes, un groupe restreint de constituants est généralement responsable de l'activité thérapeutique recherchée (ou de l'activité toxique, selon les cas) (Hostettmann et coll., 2000). Il est donc nécessaire de disposer

d'essais biologiques ou pharmacologiques relativement simples afin de caractériser l'activité des extraits ou des fractions résultant des différentes étapes de purification qui mèneront à l'isolement de constituants actifs purs (Hostettmann et coll., 2000). Ces essais doivent être très sensibles parce que les substances actives peuvent être présentes dans la plante à de très faibles concentrations (Hostettmann et coll., 2000).

II.6 Modèles expérimentaux pour la recherche d'anthelminthiques.

Dans le cas de la recherche d'un composé doté d'une activité antiparasitaire, le meilleur test serait celui qui permettrait d'évaluer l'activité de la substance à étudier sur le parasite cible directement chez son hôte normal. Mais ceci nécessite des essais expérimentaux *in vivo*, et par conséquent, de grandes quantités de produit et un élevage d'animaux, ce qui devient trop onéreux pour un processus de screening primaire.

Une autre approche consiste à utiliser des modèles de nématodes parasites pour le développement de tests *in vitro*. Les modèles parasites les plus couramment utilisés sont *Trichostrongylus colubriformis* (parasite du mouton), *Graphidium strigosum* (parasite du lapin), *Heligmosomoïdes polygyrus* (parasite de rongeurs), *Haemonchus contortus* (parasite du mouton et de la chèvre) et *Teladorsagia circumcincta* (parasite de petits ruminants), dont le maintien en laboratoire nécessite cependant l'entretien du cycle par des infestations expérimentales d'animaux (Mansir, 1998; Elard, 1999).

L'utilisation de *Caenorhabditis elegans*, un nématode libre proche d'*Ascaris suum* constitue une alternative intéressante (Burglin et coll., 1998; Geary et Thompson, 2001).

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) appartient à l'ordre des Rhabditida et à la famille des Rhabditidae (Hope, 1999). Les principales caractéristiques de *C. elegans* peuvent être reprises comme suit (Hope, 1999):

- Organisme de petite taille, maximum 1 mm pour les formes adultes,
- Corps translucide facilitant les observations au microscope (mise en évidence de différents organes par simple transparence),
- Conditions de culture relativement simples et peu coûteuses: température optimale 20°C, bactéries utilisées comme source de nutriment,
- Mouvements caractéristiques: vague sinusoïdale parcourant le plan dorso-ventral,

- Séparation des sexes: existence d'individus de sexe mâle et hermaphrodite, permettant l'étude de la transmission de caractères génétiques par autofécondation,
- Nombre fixe de cellules, 959 cellules au stade adulte permettant le suivi de cellules depuis le stade embryonnaire jusqu'au stade adulte ou l'étude de la mort cellulaire programmée,
- Système nerveux simple (102 neurones),
- Cycle vital court, 3.5 jours à 20°C et 6 jours à 15°C (**Figure 1**),
- Présence de 4 stades juvéniles L1, L2, L3, L4 (abusivement appelé "*stades larvaires*") qui suivent le développement embryonnaire et précèdent le stade adulte,
- Apparition d'un stade intermédiaire favorisant la survie lorsque les conditions environnementales deviennent extrêmes (dessiccation). Cette forme apparaît dès la deuxième mue et remplace L3. Le retour aux conditions normales permet la poursuite du développement larvaire avec l'apparition de L4.

De plus, les connaissances acquises sur la biologie et le génome de ce nématode permettent de caractériser avec précision l'effet des substances testées (Burglin et coll., 1998). C'est donc ce modèle que nous avons utilisé pour la mise au point d'un nouveau test nématocide.

Plusieurs types de tests pharmacologiques basés sur *C. elegans* sont décrits pour la mise en évidence de substances anthelminthiques :

- Le test d'inhibition du développement larvaire mesure la capacité d'une substance à inhiber le développement larvaire (Athanasidou et coll., 2000). Ce test consiste en un dénombrement au microscope des différents stades larvaires, après la mise en contact pendant 7 jours, de la substance à étudier avec des larves de premier stade (Athanasidou et coll., 2000);
- Le test d'inhibition de la migration larvaire détermine la capacité d'une substance à inhiber la migration de larves de troisième stade à travers de fines mailles de 70 µm (Athanasidou et coll., 2000). Ces larves sont incubées avec la substance à tester à diverses concentrations à 37°C pendant 2 heures (Athanasidou et al., 2000). On dénombre ensuite, au microscope le nombre de larves retenues par les mailles (Ld) et celles qui ont migré (Lm), puis on

détermine le pourcentage d'inhibition de la migration larvaire (LMI), avec $\%LMI = Lm/(Lm + Ld) \times 100$ (Athanasidou et coll., 2000);

- Le test d'inhibition de la nutrition larvaire mesure l'effet d'une substance sur la fonction de nutrition des larves de premier stade. Des larves de premier stade sont incubées avec la substance à tester pendant 2 heures à 22°C et nourries pendant 8 heures avec un lyophilisat de *Escherichia coli*, rendu fluorescent par un traitement à la fluorescéine-5-isothiocyanate; le nombre de vers ayant conservé leur fonction de nutrition est déterminé après observation de leur tube digestif en microscopie de fluorescence, à la recherche de nutriments fluorescents (Athanasidou et coll., 2000).
- Le test d'éclosion des œufs mesure la capacité d'une substance à inhiber l'éclosion des œufs d'helminthes. On incube à 22°C, un nombre connu d'œufs embryonnés avec la substance à tester pendant 24 heures, puis on dénombre les larves issues de l'éclosion des œufs incubés (Athanasidou et coll., 2000). On peut alors déterminer le pourcentage d'œufs éclos.
- Le test de mobilité/viabilité qui évalue la toxicité d'une substance sur un nématode parasite ou non. Ce test, également dénommé test d'efficacité nématocide, consiste à incuber une suspension de vers avec la substance à tester pendant un temps donné, puis à attribuer une cotation selon la proportion de la population de nématodes traités que l'expérimentateur considère comme morts parce qu'immobiles après stimulation à l'aide d'une aiguille (Simpkin et Coles, 1981; Athanasidou et coll., 2000; Fonseca-Salamanca et coll., 2003).

Devant les avantages du modèle *C. elegans*, nous avons décidé de l'étudier plus avant dans le cadre de notre travail; devant les limitations du test d'efficacité nématocide mentionné ci-dessus, nous avons entrepris de rechercher un moyen plus simple d'évaluer l'état de nos nématodes.

C. *Balanites aegyptiaca* (Zygophyllaceae).

I. Description botanique.

De la famille des Zygophyllaceae et de la super-famille des Balanitaceae, *Balanites aegyptiaca* est aussi connu sous divers synonymes scientifiques, *Ximenia aegyptiaca* L., *Agialida senegalensis* Van Tiegh, *Agialida tombouctensis* Van Tiegh, *Balanites ziziphoides* Mildbr et Schlechter (Fortin et Maynard, 1988). Plusieurs autres espèces du genre *Balanites* ont été décrites. Il s'agit de *Balanites glabra* (Wasonga et coll., 2003; Milewski et Madden, 2006) et de *Balanites wilsonia* Dawe et Sprague (Babweteera et coll., 2007) que l'on retrouve en Afrique orientale, de *Balanites maughamii* Sprague (Elgorashi et coll., 2002; Taylor et al., 2003) et de *Balanites pedicellaris* Mildbraed et Schlechter (Hardman et Wood, 1971) décrits en Afrique australe et de *Balanites roxburghii* Planch dans les régions semi-arides de l'Inde (Padmashali et coll., 2006).

Balanites aegyptiaca (**Figure 2**) est un arbuste de 8 à 9 m, à tronc droit, aux branches à extrémité légèrement retombante et à écorce foncée, profondément striée. Ses rameaux portent de longues épines robustes, droites, pouvant atteindre 8 cm de long. Les feuilles sont alternes, bifoliacées, subsessiles, ovales, orbiculaires, rhomboïdes et mesurent 2,5 à 3 cm. Les fruits sont des drupes sphériques, elliptiques, ovoïdes, anguleuses, légèrement arrondies à chaque extrémité et tomenteuses; d'abord verdâtres, ils sont jaunâtres à maturité. L'épicarpe est mince et entoure une pulpe douce, comestible, légèrement astringente; le noyau dur contient une amande riche en lipides (Adjanohoun et Aké, 1986).

Répartition géographique: L'espèce semble provenir des régions actuellement arides de l'Arabie, du Pakistan et de l'Afrique du nord (Eyog Matig et coll., 2000). Elle a colonisé le Sahel et la savane de l'Afrique occidentale et orientale. Les principaux centres de diversité se situeraient maintenant en Afrique occidentale entre le Niger et le Nigeria d'une part et en Afrique orientale entre le Soudan et la Tanzanie d'autre part (Eyog Matig et coll., 2000).

II. Utilisations de *Balanites aegyptiaca* en médecine traditionnelle africaine.

Balanites aegyptiaca (L.) Del. (Zygophyllaceae) est une plante largement utilisée, aussi bien en médecine traditionnelle humaine que vétérinaire. Toutes les parties de la plante sont utilisées (Adjanohoun et Aké, 1986; Fortin et Maynard, 1988).

II.1 Les utilisations en médecine humaine.

Les fruits, les racines et les écorces sont utilisés dans plusieurs régions d'Afrique comme un puissant purgatif, anthelminthique, pour le traitement des diarrhées et des coliques, ainsi que pour le traitement des schistosomiasis (parasitose causée par *Schistosoma haematobium* ou *S. mansoni*) au Soudan.

Dans certaines régions d'Afrique, la plante est utilisée aussi comme molluscicide dans la lutte contre la Dracunculose (parasitose causée par *Dracunculus medinensis*) (Adjanohoun et Aké, 1986; Fortin et Maynard, 1988). Le **Tableau 2** reprend les différentes utilisations de *Balanites aegyptiaca* en médecine traditionnelle africaine.

Les feuilles sont utilisées comme cataplasme dans le traitement des plaies et les jeunes rameaux, comme shampoing par les bédouins de l'Azawad (Fortin et Maynard, 1988). Le macéré aqueux de la poudre des feuilles sèches de *Balanites aegyptiaca* est utilisé en association avec *Ricinus communis* dans le traitement de la stérilité féminine. Chez les Bambara du Mali, la variole est traitée avec une solution à base de décocté de feuilles de *Balanites aegyptiaca* broyées (administration par voie orale et cutanée) (Imperato et Traoré, 1968).

Au Mali, le fruit est utilisé pour calmer les douleurs (Pousset, 1992). Au Soudan et en Egypte, le mésocarpe du fruit est utilisé dans le traitement du diabète (Fortin et Maynard, 1988). Au Burkina Faso, les helminthiasis sont traitées avec une mixture à base de poudre sèche de l'amande du fruit de *Balanites aegyptiaca* et de farine de sorgho alors que l'amande (**Figure 3**) est utilisée seule pour le traitement de la constipation (Nacoulma, 1996). Les macérés de la pulpe et du fruit, sont respectivement utilisés comme antipyrétique au Tchad et contre les maux d'estomac par les Haoussas du Niger (Fortin et Maynard, 1988).

Les écorces de *Balanites aegyptiaca* sont utilisées en association avec celles de *Securinega virosa* (Euphorbiaceae) et *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae) pour le traitement des maux d'estomac (Pousset, 1992). En Somalie, l'écorce est utilisée pour le traitement des plaies et l'écorce des racines dans le traitement de l'asthme (Pousset, 1992). Les écorces de racines

sont utilisées pour le traitement des maladies mentales et l'épilepsie (Fortin et Maynard, 1988). Au Tchad, l'écorce de *Balanites aegyptiaca* est utilisée en macéré dans le traitement des maladies vénériennes (syphilis), et en fumigations contre les maladies hépatiques (Creach, 1940). Au Soudan et en Egypte, l'écorce des racines est utilisée dans le traitement de l'ictère.

II.2 Les utilisations en médecine vétérinaire.

Les Haoussas d'Afrique occidentale, utilisent l'huile de l'amande (**Figure 4**) dans le traitement des douleurs chez les chameaux; en application sur la peau, elle permettrait aussi de traiter de nombreuses ectoparasitoses au Nigeria (Ba, 1994).

Les fruits, les racines et les tiges sont utilisés en Tanzanie pour traiter la constipation chez les bovins (Ba, 1994); le macéré de jeunes pousses, est utilisé au Burkina Faso dans le traitement du charbon bactérien des ovins (Ba, 1994).

III. Etudes pharmacologiques.

Plusieurs études pharmacologiques ont été réalisées sur base des différentes utilisations traditionnelles, précédemment décrites. Ainsi, l'extrait aqueux du mésocarpe du fruit de *Balanites aegyptiaca* a montré une activité hypoglycémiant sur le diabète induit par la streptozocine chez la souris (Kamel, 1998) et une activité helminthicide sur *Fasciola gigantica* (parasite de la chèvre) (Koko et coll., 2000).

L'extrait aqueux de l'écorce a montré une activité sur l'ictère expérimental obstructif induit chez le rat (Mohamed et Eltahir, 1999).

L'extrait aqueux des amandes a provoqué la mort de 45 à 100% d'une suspension de *Caenorhabditis elegans*, à la dose de 2.5 mg/ml (Ibrahim, 1992).

Des saponosides, les balanitines 4, 5, 6 et 7, possédant une activité cytostatique sur des cellules P388 (cellule de leucémie murine), ont été isolées à partir d'un extrait CH₂Cl₂/MeOH des amandes de *Balanites aegyptiaca* (Pettit et coll., 1991).

IV. Etudes phytochimiques de *Balanites aegyptiaca*.

Balanites aegyptiaca (L.) Del. a d'abord été étudié au point de vue alimentaire et son fruit a fait l'objet de nombreuses analyses diététiques mettant en évidence sa richesse en glucides (plus de 50%) et justifiant son nom de "dattier du désert".

Dans la composition du fruit, on retrouve des glucides, des protéines, des lipides et des vitamines (Vitamine C, Thiamine, Niacine et Riboflavine).

A ce jour, des molécules appartenant à quatre familles de composés chimiques ont été isolées: 4 coumarines, 12 saponosides, 5 flavonoïdes et 2 alcaloïdes (**Tableau 3**). Liu et Nakanishi isolèrent en 1982, trois saponosides, balanitines 1, 2, et 3 (**Figure 5**), d'un extrait méthanolique de racines et d'écorces. Il s'agit de tri et tétraglycosides, D-glucose, L-rhamnose, et xylose liés à la yamogénine (aglycone) (Liu et Nakanishi, 1982). Ces saponosides sont décrites comme possédant un effet molluscicide potentiel. En 1992, les balanitines 4, 5, 6 et 7 (**Figure 5**), isolées du fruit ont montré une activité cytotoxique sur la lignée de leucémie murine P388. La balanitoside, la 6-méthyldiosgénine (sapogénol), les balanines B1 et B2 et la balagyptine furent isolées du mésocarpe du fruit (Hosny et coll., 1992; Kamel et Koskinen, 1995; Kamel, 1998; Speroni et coll., 2005) Les balanines B1 et B2 ont montré une activité anti-inflammatoire sur des rats après administration par voie orale (Speroni et coll., 2005).

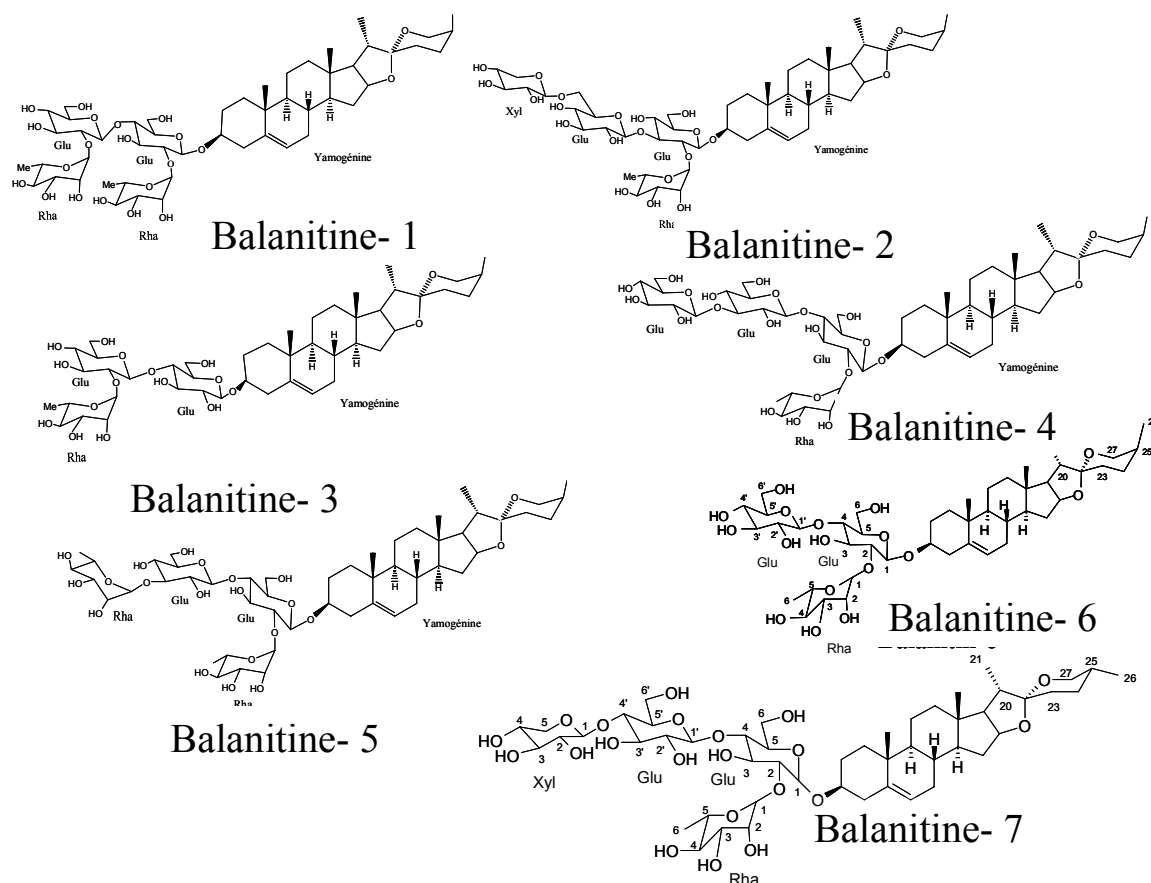


Figure 5: Structures des balanitines extraites de *Balanites aegyptiaca*: ces balanitines sont des saponosides caractérisées par, un aglycone stéroïdique (diosgénine pour la balanitine –7 et yamogénine pour les autres), le nombre et la nature des sucres qui sont liés à l'aglycone (Pettit et coll., 1991; Speroni et coll., 2005); (Liu et Nakanishi, 1982).

Deux flavonoïdes glycosides, l'isorhamnétine-3-rutinoside et l'isorhamnétine-3-rhamnogalactoside furent isolés du fruit, des feuilles et des rameaux (Maksoud et Hadidi, 1988). L'isorhamnétine a montré une activité antihémostatique (Ishida et Umino, 1989). De l'écorce du tronc d'un échantillon d'origine indienne, Seida et coll. isolèrent en 1981, deux coumarines, le bergaptène et la D-marmésine qui montrèrent respectivement des activités spasmolytiques sur l'intestin isolé de rat et utéro-relaxante chez la souris (Nikonov et al., 1971; Seida et al., 1981).

Deux alcaloïdes, les N-trans feruloyltyramine et N-cis feruloyltyramine ont été isolés de l'écorce de *Balanites aegyptiaca* (Sarker et coll., 2000).

V. Pourquoi avons-nous décidé d'étudier cette plante ?

Les parasitoses intestinales semblent de nos jours susciter de moins en moins d'intérêt, probablement en raison de priorités plus récentes telles que le sida. Or, plus de 2 milliards de personnes sont affectées à travers le monde, dont 300 millions souffrent d'associations morbides sévères avec plus de 155 000 décès par an (OMS, 2004). Le paludisme mis à part, ces affections constituent 40% des maladies tropicales (OMS, 2004).

Au Burkina Faso, les amandes de *Balanites aegyptiaca* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des parasitoses humaines et animales. Des études antérieures, réalisées au Burkina Faso à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), avaient permis de faire la preuve de l'efficacité de ce traitement aussi bien sur des lombrics que sur des parasites vétérinaires (Guissou et coll. 1998, Ouattara et coll. 2003).

La présente étude comporte deux objectifs principaux, d'une part caractériser l'activité nématocide mise en évidence par ces études préliminaires, d'autre part identifier les principes responsables de cette activité.

D. Le cancer et les traitements anti-tumoraux.

Certains anthelminthiques comme les benzimidazoles, du fait de leur capacité à inhiber la polymérisation des tubulines, présentent un potentiel anti-tumoral (Singh et Lown, 2000; Ji et coll., 2001; Boiani et Gonzalez, 2005; Nagy et coll., 2005).

Nous avons donc envisagé d'évaluer le potentiel anti-tumoral des principes nématocides qui seront isolés des amandes de *Balanites aegyptiaca*.

I. Le cancer.

I.1 Généralités.

Des cancers étaient déjà décrits dans des textes égyptiens vers 3500 ans avant notre ère (Wikipedia 2006). C'est Hippocrate qui donna la première définition de la maladie, appelée alors «carcinome» ou «squirre»: une tumeur (gonflement), dure non inflammatoire, ayant tendance à récidiver et à se généraliser jusqu'à la mort (Wikipedia 2006). Aujourd'hui, le terme cancer comprend une maladie qui est provoquée soit par des changements sous-jacents de l'information génétique, se traduisant par des modifications du comportement cellulaire (Gerald 1996; Hanahan et Weinberg 2000), soit par un comportement anormal de cellules souches (Neureiter et coll. 2006; Roskams 2006). Ces modifications entraînent une prolifération cellulaire incontrôlée dans certains tissus conduisant à la formation d'une masse tissulaire dénommée tumeur. Les tumeurs peuvent être bénignes (non cancéreuses) ou malignes (cancéreuses) (Alberts et coll. 2002). Les cellules formant des tumeurs bénignes demeurent localisées dans le tissu d'origine. Les cellules à l'origine des tumeurs malignes envahissent par définition les tissus qui les entourent (invasion loco-régionale) ou des organes à distance (métastases) comme le montre la **Figure 6**. La dénomination d'un cancer dépend (Alberts et coll. 2002):

- a) du type de cellule dont il est originaire (type histologique): les carcinomes sont issus de cellules épithéliales, les sarcomes sont des cancers du tissu conjonctif ou de cellules musculaires et les leucémies dérivent des cellules hématopoïétiques dans lesquelles on retrouve les lymphomes, etc... (Alberts et coll. 2002)
- b) de la plus ou moins grande ressemblance des cellules avec celles du tissu dont elles sont originaires (exemple: carcinome indifférencié, peu différencié ou différencié) (Alberts et coll. 2002).

Les carcinomes constituent environ 90% des cancers humains du fait d'un taux de prolifération cellulaire très élevé dans les tissus épithéliaux et de l'accumulation d'un

grand nombre d'accidents génomiques dans ces tissus en raison de leur rôle de «barrière» contre de nombreux agents exogènes, dont les carcinogènes (Alberts et coll. 2002).

I. 2 Epidémiologie.

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 dus au cancer va connaître une augmentation considérable dans les pays en développement, aussi bien en Asie, en Afrique qu'en Amérique Latine (**Figure 7**), et ce, principalement en raison du vieillissement constant de la population humaine et de l'augmentation de la pollution (Rastogi et coll. 2004). Selon le rapport 2005 du Centre International de Recherche sur le Cancer, l'Europe totalisait en 2004, 2.9 millions de nouveaux cas de cancer et plus de 1.7 millions de décès (Institut National du Cancer 2006).

Les premières observations épidémiologiques relatives aux cancers datent du début du 18^{ème} siècle (Héron 1998). En 1713, Ramazzini observa que le cancer du sein était particulièrement fréquent chez les religieuses et Pott constata une fréquence plus élevée du cancer de la peau du scrotum chez les ramoneurs (Héron 1998). Ces observations ont permis d'introduire la notion de facteurs pour lesquels une relation de causalité avec le cancer est probable (Héron 1998). Le risque de développer un cancer varie en effet, selon l'âge, le sexe, l'origine ethnique, la classe socio-économique ou encore le régime alimentaire, certains facteurs environnementaux, voire certaines pratiques sexuelles (Colditz et coll. 2006; Popkin 2007).

Par exemple, les gaz d'échappement des automobiles, du fait des particules d'hydrocarbures aromatiques polycycliques qu'ils contiennent, et le tabagisme constituent un facteur environnemental primordial dans la genèse des cancers du poumon (Rastogi et coll. 2004).

Le cancer de la prostate chez l'homme est de loin le plus fréquent, 33% des nouveaux cas, puis viennent en deuxième et troisième positions les cancers du poumon (13%) et du colon-rectum (10%). Chez la femme, le cancer du sein, avec 31% des nouveaux cas, est

le plus fréquent suivi des cancers du poumon (12%) et du colon-rectum (11%) (Jemal et coll. 2006). Le cancer est la principale cause de mortalité chez les femmes de 40 à 79 ans et les hommes de 60 à 79 ans.

Estimated Deaths



| | | | Males | Females | | | |
|----------------------------------|----------------|-------------|--|--|--------------------------------|--------|-----|
| Lung and Bronchus | 90,330 | 31% |  |  | Lung and Bronchus | 72,130 | 26% |
| Colon and Rectum | 27,870 | 10% | | | Breast | 40,970 | 15% |
| Prostate | 27,350 | 9% | | | Colon and Rectum | 27,300 | 10% |
| Pancreas | 16,090 | 6% | | | Pancreas | 16,210 | 6% |
| Leukemia | 12,470 | 4% | | | Ovary | 15,310 | 6% |
| Liver and Intrahepatic Bile Duct | 10,840 | 4% | | | Leukemia | 9,810 | 4% |
| Esophagus | 10,730 | 4% | | | Non-Hodgkin Lymphoma | 8,840 | 3% |
| Non-Hodgkin Lymphoma | 10,000 | 3% | | | Uterine Corpus | 7,350 | 3% |
| Urinary Bladder | 8,990 | 3% | | | Multiple Myeloma | 5,630 | 2% |
| Kidney and Renal Pelvis | 8,130 | 3% | | | Brain and Other Nervous System | 5,560 | 2% |
| All Sites | 291,270 | 100% | All Sites | 273,560 | 100% | | |

Tableau 4: Répartition de la mortalité estimée par sexe de 10 principaux types de cancer aux Etats-Unis en 2006 (Jemal et coll. 2006).

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité chez les malades du cancer, quel que soit le sexe, 31% chez les hommes et 26% chez les femmes (**Tableau 4**).

La connaissance de l'épidémiologie du cancer permet d'attirer l'attention sur l'imputabilité de nouveaux facteurs de risques ou d'étudier l'impact de mesures de prévention, de dépistage ou de traitement (Colditz et coll. 2006). Par exemple, la lutte contre les tabagismes primaire et secondaire, la promotion d'une alimentation saine, la limitation de l'exposition aux carcinogènes (amiante, pesticides, aflatoxines...) sont autant de moyens de prévention qui permettraient aujourd'hui d'éviter près d'un cinquième des cas de cancers (Colditz et coll. 2006). Un cancer détecté précocément permet d'augmenter considérablement les chances de survie. Remarquons cependant que la plupart des cancers en stades précoces sont asymptomatiques; c'est pourquoi 50% des patients atteints d'un cancer ne sont diagnostiqués qu'au stade métastatique de leur maladie. Enfin près de 90% des patients atteints d'un cancer décèdent de leurs métastases (Mehlen et Puisieux 2006).

I.3 Traitements.

I.3.1 Généralités.

Les traitements anti-tumoraux visent à ralentir la progression de la maladie, voire à la guérir comme c'est de plus en plus fréquemment le cas pour certains types de lymphomes, de leucémies ou encore pour les cancers du testicule même à un stade métastatique avancé au moment du diagnostic. Ces traitements peuvent être dirigés contre la cellule tumorale ou d'autres éléments impliqués dans la prolifération et l'invasion comme l'endothélium, la matrice extracellulaire et le système immunitaire. Au niveau de la cellule tumorale, la cible peut être l'ADN, l'ARN ou des protéines (Espinosa et coll. 2003). **Le Tableau 5** reprend de manière schématique certaines cibles des agents anti-tumoraux. L'arsenal thérapeutique dirigé contre le cancer comprend essentiellement:

- **la chirurgie** 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 radiothérapie** est le traitement adjuvant presque toujours utilisé en complément d'une chirurgie ablative. Elle consiste à irradier le site de résection tumorale (post-chirurgie) pour éliminer les cellules tumorales résiduelles en y induisant une mort de type pro-apoptotique. La radiothérapie est de plus en plus utilisée en association avec des chimiothérapies de nature «radio-sensibilisante» (Svensson et coll. 1992; Fu 1998; Merlano et Marchetti 2003). C'est le cas par exemple du témozolomide associé à la radiothérapie post-chirurgicale dans le cas des gliomes malins (Lefranc et coll. 2006). Dans certains cas, la radiothérapie remplace la chirurgie face à des localisations tumorales inaccessibles ou de lésions tumorales multiples, comme dans le cas de métastases cérébrales pouvant atteindre plusieurs dizaines de sites et pour lesquelles on utilise le « *gamma-knife* » (Massager et coll. 2004; Pirotte et coll. 2007);
- **la chimiothérapie** consiste en l'administration d'agents dénommés «anti-cancéreux». Cette thérapie sera détaillée au chapitre suivant (§ I.3.2 du chapitre D. de l'introduction) ;
- **l'hormonothérapie** consiste à antagoniser l'effet pro-tumoral de divers types d'hormones, dont les oestrogènes dans le cas du cancer du sein (Lewis et coll. 2004), les androgènes dans le cas du cancer de la prostate (Lieberman 2002) ou encore certains neuropeptides dans une forme particulière du cancer du poumon, le carcinome à petites cellules (Moody 2006),

- **l'immunothérapie** fait appel à deux mécanismes: l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. L'immunothérapie passive est représentée par la thérapie cellulaire qui consiste à injecter au malade des cellules T cytotoxiques isolées de la tumeur. Ces cellules sont multipliées *in vitro* afin d'en disposer en quantité suffisante pour leur administration au patient cancéreux (Old 1996). L'immunothérapie active est représentée par la vaccination. Pour exemple, le concept de la vaccination anti-mélanome vise, après identification des antigènes spécifiques de la tumeur donnée, à induire une réponse immunitaire spécifique en les injectant au malade et à aboutir ainsi (en théorie) au rejet des cellules tumorales (Carter 2001). L'immunothérapie, qu'elle soit passive ou active, n'a pas rencontré les succès cliniques que laissaient entrevoir de nombreux travaux de recherche (Bodey et coll. 2000; Mocellin et coll. 2004).
- **la thérapie génique** consiste à transférer du matériel génétique dans les cellules d'un malade pour corriger l'absence ou la déficience d'un ou de plusieurs gènes. Le transfert génique doit permettre de corriger les déficiences constatées ou de moduler certaines réponses biologiques de ces cellules (Relling et Dervieux 2001). A nouveau, la thérapie génique n'a pas rencontré les succès cliniques que laissaient également entrevoir de nombreux travaux de recherche (Gleave et Monia 2005).

I.3.2 La chimiothérapie.

La chimiothérapie consiste en une administration orale ou intraveineuse de molécules anti-cancéreuses qui pourraient atteindre la tumeur et les éventuelles cellules métastatiques, permettant ainsi de ralentir la prolifération et/ou d'induire la mort de cellules cancéreuses (l'induction de la mort cellulaire et les types de mort cellulaire seront détaillés dans la section **III.3** du chapitre D. de l'introduction). Dans certains cas, la molécule anti-cancéreuse est délivrée de manière massive dans un site précis pour atteindre le cancer. C'est le cas par exemple pour les métastases hépatiques (Cohen et Kemeny 2003) ou encore pour les tumeurs cérébrales où la chimiothérapie est placée dans un réservoir d'Ommaya implanté en sous-cutané chez le patient et dont le cathéter délivre directement la molécule dans le site de résection tumorale (Lefranc et coll. 2006).

I.3.2.1 Classification des agents anti-cancéreux utilisés en chimiothérapie.

Le **Tableau 6** reprend les principales molécules anti-cancéreuses classées selon leur mécanisme d'action. On peut ainsi, de manière très schématique, reconnaître 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. A ces grandes classes thérapeutiques, s'ajoutent notamment les thérapies ciblées sur lesquelles les oncologues fondent de plus en plus d'espoirs dans le combat contre le cancer (Kummar et coll. 2007; Monteith et coll. 2007).

I.3.2.1.1 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 coll. 2003). On classe dans ce groupe, des médicaments capables de se fixer de façon irréversible à l'ADN, comme les sels de platine. Les alkylants forment des adduits sur les atomes d'azote et d'oxygène des bases d'ADN (Espinosa et coll. 2003). Bi-fonctionnels, 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 coll. 2003). L'activité cytotoxique des agents alkylants, dits encore radio-mimétiques, ne dépend pas du cycle cellulaire (Espinosa et coll. 2003).

La position N-7 de la guanine est le site d'alkylation le plus courant, mais ce site varie selon le type de molécule utilisée (Espinosa et coll. 2003). Les agents alkylants appartiennent à plusieurs familles chimiques différentes. On peut citer comme exemple, les moutardes azotées (chlorambucil, busulfan, melphalan) les dérivés du Platine (Cisplatine, Carboplatine) (Espinosa et coll. 2003). Certains agents alkylants exercent un mécanisme d'action différent des agents alkylants «classiques». Il s'agit par exemple du témozolomide qui induit une mort cellulaire de type autophagique (mort cellulaire programmée de type II) plutôt qu'apoptotique (mort cellulaire programmée de type I) (Lefranc et Kiss 2006). Ceci explique en partie le bénéfice thérapeutique lié à cette molécule dans le cas du traitement des gliomes malins (Lefranc et Kiss 2006) qui sont résistants aux processus de mort pro-apoptotique, et donc à la plupart des agents utilisés en chimiothérapie conventionnelle (Lefranc et coll. 2005).

I.3.2.1.2 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 (**Figure 8**) (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). La plupart des agents intercalants sont toutefois des inhibiteurs de topoisomérases.

I.3.2.1.3 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.

I.3.2.1.4 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 coll. 2003). En effet, la vinblastine et la vincristine, des alcaloïdes extraits de *Catharanthus roseus*, contribuèrent pour la première fois à des rémissions à long terme dans le traitement de leucémies infantiles, du cancer du testicule et de la maladie de Hodgkin (Mann 2002).

I.3.2.2 Les limites de la chimiothérapie.

La chimiothérapie seule ne guérit pas encore la majorité des cancers. L'utilisation d'un seul agent en chimiothérapie est de plus en plus rare. La polychimiothérapie permet en effet, de combiner des molécules appartenant aux différentes familles citées ci-dessus (Neidle et Thurston 2005), c'est-à-dire d'attaquer l'hétérogénéité biologique d'un cancer donné (voir section §II.3 du chapitre C. de l'introduction) en combinant des molécules cytotoxiques ou cytostatiques dotées de mécanismes d'action différents.

Les limites de la chimiothérapie proviennent essentiellement:

- a) du faible niveau de sélectivité de certains agents entraînant d'importants effets secondaires qui limitent les doses administrables,
- b) de la capacité des tumeurs à développer une résistance aux agents anti-tumoraux.

L'association d'agents anti-tumoraux aux mécanismes d'action différents permet d'augmenter l'efficacité du traitement mais contribue aussi à la sommation des effets toxiques.

Les progrès des connaissances relatives aux bases moléculaires et génétiques du cancer permettent d'envisager de nouvelles thérapies qui ciblent les aberrations moléculaires spécifiques aux cellules tumorales et peuvent désactiver certaines voies de signalisation intracellulaires utilisées par ces cellules anti-cancéreuses (Neidle et Thurston 2005).

I.3.2.3 Médecine traditionnelle africaine et traitement du cancer.

Etant donné les techniques de diagnostic utilisées en médecine traditionnelle africaine, la mise en évidence du cancer semble quasi impossible. En effet, les termes attribués au cancer et à d'autres excroissances ont une signification différente en fonction des peuples et des époques (Duez 2006). La conception que les tradithérapeutes ont du cancer ne correspond pas à celle de la médecine moderne. Cette difficulté de diagnostic implique, d'une part, l'inclusion à tort de certaines affections bénignes dans le concept de cancer et, d'autre part, qu'en l'absence de moyens de diagnostic précoce, le malade ne consulte que très tard, pour une masse palpable, douloureuse ou gênante (Duez 2006).

En revanche, la littérature décrit des recettes utilisées dans le traitement de «tumeurs». Nous pouvons citer *Calotropis procera* faisant l'objet de multiples usages au Burkina Faso et dont l'activité anti-tumorale des extraits d'écorces de racines a été démontrée (VanQuaquebeke et coll. 2005; Mijatovic et coll. 2006a; Mijatovic et coll. 2006b; Mijatovic et coll. 2007a). D'autres plantes sont citées dans la littérature pour leur utilisation en médecine traditionnelle africaine sans toutefois préciser les moyens de diagnostics utilisés par les tradithérapeutes ou les résultats atteints.

II. Transformation d'un tissu normal en tissu cancéreux.

II.1 La théorie embryonnaire de Pierce.

La théorie de Pierce repose sur l'hypothèse selon laquelle le cancer serait d'origine embryonnaire (Pierce et Speers 1988). La cellule germinale primordiale (qui peut être considérée comme la cellule «souche» des êtres vivants) serait notamment la cellule originelle des tératocarcinomes testiculaires spontanés (Pierce et Speers 1988).

Dans un tissu normal, on distingue les cellules souches qui se divisent pour donner une nouvelle cellule souche qui lui est identique (prolifération sans modification de phénotype) ou une nouvelle cellule souche qui entre dans un processus de différenciation (nouveau phénotype) permettant la formation de tissus spécialisés (**Figure 9**) (Alberts et coll. 2002). Cette différenciation cellulaire assure le renouvellement des tissus comme par exemple pour les cellules sanguines et hépatiques. La différenciation cellulaire est sous le contrôle des oncoprotéines qui ne seront plus exprimées après la naissance ou à l'âge adulte, mais pourront à nouveau l'être en cas de développement de cancer (Pierce et Speers 1988). Les processus de contrôle de la différenciation cellulaire sont perturbés dans les cellules tumorales, car elles ne terminent pas leur différenciation (Pierce et Wallace 1971).

La plupart des tissus cancéreux sont constitués d'une population hétérogène de cellules dont une petite proportion de cellules indifférenciées qui seraient des cellules souches très malignes (Pierce et Wallace 1971). Les autres cellules sont moins malignes et plus différenciées (Pierce et Wallace 1971).

Dans le cadre de cette théorie, si les changements observés dans les cellules tumorales n'étaient pas irréversibles et, d'autre part, si ces cellules tumorales pouvaient spontanément se différencier dans certains cas en cellules bénignes, l'utilisation de médicaments qui favoriseraient la différenciation cellulaire pourrait être envisagée en thérapie anti-cancéreuse (Pierce et Speers 1988; Alberts et coll. 2002). Plusieurs molécules (acide rétinoïque, hexaméthylène bisacétamide, 5-azacytidine, 1- β -D-arabinofuranosylcytosine) ont été testées avec plus ou moins de succès chez des animaux, mais, jusqu'à présent, aucun résultat n'a été assez probant pour justifier une utilisation en clinique (Fibach et coll. 1977; Moore et coll. 1985; Pierce et Speers 1988).

II.2 La théorie moléculaire de Nowell.

La théorie de Nowell repose sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des tumeurs auraient une origine unicellulaire et un modèle de croissance clonale (Alberts et coll. 2002).

En effet, des études cytogénétiques ont démontré que, dans la majorité des tumeurs primaires, toutes les cellules présentent une même anomalie caryotypique, suggérant une origine unicellulaire (**Figure 10**) (Nowell 1976). Même lorsque le cancer est métastatique, son origine peut habituellement être rattachée à une tumeur primitive unique, provenant d'un organe identifié et, présumée provenir d'une cellule unique ayant subi une mutation transmissible lui permettant d'envahir les tissus voisins (Nowell 1976). L'hypothèse selon laquelle les tumeurs proviendraient d'une cellule n'exclut pas que les carcinogènes puissent affecter simultanément plusieurs cellules dans un tissu. Elle suggère que la tumeur macroscopique qui se développe provient habituellement d'une cellule ou tout au plus d'un petit nombre de cellules (Nowell 1976). Vraisemblablement, d'autres cellules cancéreuses ou pré-cancéreuses dans le tissu exposé ne prolifèrent jamais ou sont détruites avant la progression vers une tumeur (Nowell 1976).

Après l'initiation de la tumeur, la cellule tumorale échappe aux mécanismes de contrôle de la division cellulaire et acquiert un avantage prolifératif sur les cellules adjacentes. Cette initiation peut se traduire soit par des anomalies chromosomiques (aneuploïdie) ou des mutations génétiques affectant des proto-oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeur (Nowell 1976).

Les cellules tumorales vont se multiplier rapidement. La prolifération cellulaire incontrôlée ainsi que l'instabilité génétique des cellules tumorales vont favoriser l'apparition de sous-populations de cellules ayant subi des mutations (Nowell 1976). L'instabilité génétique des populations de cellules tumorales pourrait être liée à l'inactivation de gènes spécifiques dans la tumeur ou à une exposition continue aux carcinogènes (Nowell 1976).

Certaines de ces cellules présentant des déficiences métaboliques vont subir un processus d'apoptose et d'autres seront détruites par les mécanismes de défense immunologique (Nowell 1976). Mais quelques-unes de ces cellules mutantes peuvent échapper à ces mécanismes de destruction, proliférer rapidement pour devenir les précurseurs d'une nouvelle sous population cellulaire prédominante.

Ces cellules tumorales primaires sont très malignes. Seules ces cellules tumorales primaires, ayant un pouvoir prolifératif sont très malignes et échapperont aux mécanismes de destruction évoqués ci-dessus. Les autres cellules se différencient en cellules plus ou moins proches des cellules normales et généralement meurent par apoptose (**Figure 11**) (Alberts et coll. 2002). Cette différence a une grande importance en pratique. Les traitements qui réduisent le volume tumoral, ce qui correspond au concept de «réponse clinique», ne guérissent le malade que s'ils font disparaître toutes les cellules tumorales primaires (Nowell 1976).

L'apparition d'un «clone» cellulaire tumoral malin serait ainsi la conséquence d'une accumulation dans une seule cellule d'anomalies liées à des événements rares et pas nécessairement reliés entre eux. Cette nécessité d'une succession dans le temps de multiples altérations cellulaires se reflète bien dans l'augmentation de la fréquence des cancers en fonction de l'âge. On estime que 2 à 7 événements indépendants pas obligatoirement tous mutagènes sont nécessaires pour entraîner la transformation d'une cellule «normale» en cellule maligne (Alberts et coll. 2002).

II.3 La combinaison des deux théories permet d'expliquer l'émergence de clones cellulaires tumoraux résistants à la chimiothérapie.

En raison de l'instabilité génétique anormalement élevée des cellules cancéreuses, les populations de cellules tumorales malignes sont souvent hétérogènes et capables d'évoluer vers un clone de cellules tumorales particulièrement agressives (Alberts et coll. 2002). Les cellules de ce clone seront particulièrement difficiles à éradiquer. De plus, du fait de leur instabilité génétique, ces cellules malignes auront tendance à subir des mutations qui leur permettront de résister à l'effet des médicaments anti-tumoraux. Cela augmente les difficultés de traitement du cancer. Il est possible d'utiliser des traitements répétés avec des drogues qui sont sélectivement toxiques pour les cellules en cours de division afin d'éliminer la majorité de cellules tumorales, mais il est rarement possible de les éliminer toutes. En effet, la majorité des agents anti-tumoraux utilisés en chimiothérapie classique induisent des altérations cellulaires plus ou moins marquées (ADN pour les alkylants et les intercalants par exemple) qui conduiront à l'initiation d'un processus de mort cellulaire. Il arrive que les mécanismes de réparation cellulaire rétablissent la fonctionnalité de l'ADN, permettant à la cellule de survivre au traitement. Les cellules « survivantes » continueront à se multiplier et, la progression de la tumeur peut être favorisée par la sélection de cellules

malignes chimiorésistantes qui formeront un nouveau clone résistant au traitement (Alberts et coll. 2002). D'où la nécessité d'une poly-chimiothérapie combinant plusieurs médicaments avec des mécanismes d'action différents.

III. Quelles sont les propriétés biologiques qui différencient un tissu normal d'un tissu tumoral bénin d'un tissu cancéreux ?

III.1 Définitions.

Une tumeur peut être définie comme toute formation de masse (masse tumorale) visible ou palpable qui déforme, comprime ou infiltre les tissus normaux. Les tumeurs sont généralement classées en bénignes ou malignes (Alberts et coll. 2002). Les tumeurs bénignes se distinguent des tumeurs malignes par une croissance lente et limitée dans le temps. La majorité des tumeurs bénignes développent une capsule fibreuse qui constitue une barrière de séparation entre la tumeur et les tissus normaux (**Figure 12**) (Alberts et coll. 2002). D'autre part, les tumeurs bénignes n'induisent pas la formation de métastases. Les tumeurs malignes se caractérisent par une croissance rapide, une tendance à l'invasion des tissus environnants et à la formation de métastases (Alberts et coll. 2002).

III.2 Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire a pour fonction de produire deux cellules filles le plus souvent génétiquement identiques à la cellule mère. Les cellules se multiplient en dupliquant leurs composants et en se divisant en deux. Ce cycle de division cellulaire est le moyen fondamental par lequel les êtres vivants se multiplient. Chez l'organisme adulte, la division cellulaire est nécessaire au remplacement des cellules perdues par mort accidentelle ou programmée (Alberts et coll. 2002).

III.2.1 Les différentes étapes du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire commence par la duplication du contenu des cellules, suivie de la distribution de ce contenu dans deux cellules filles (**Figure 13**).

Classiquement, le cycle cellulaire peut être divisé en deux phases, l'interphase (comprenant les phases G_1 , S et G_2) et la mitose:

- *la phase G_1* au cours de laquelle la cellule croît et augmente de volume. Les cellules filles, issues de la mitose précédente (et donc plus petites) prennent leur taille finale,

- la phase *S* au cours de laquelle le matériel chromosomique est doublé par réplication de chacun des chromosomes,
- la phase *G₂* où la cellule va croître et augmenter de volume. A l'issue de cette phase qui précède la mitose, chaque chromosome est parfaitement identique (morphologie et génétique) à son homologue,
- la phase *M* qui correspond à la phase de division cellulaire proprement dite.

Les cellules en phase *G₁* peuvent, quand les circonstances environnementales sont défavorables (carence nutritionnelle,...) arrêter leur progression dans le cycle et entrer dans un état quiescent, souvent appelé *G₀* dans lequel elles peuvent rester pendant un temps plus ou moins long (de quelques jours à plusieurs années) avant de reprendre leur prolifération.

III.2.2 Le système de contrôle du cycle cellulaire.

Le système de contrôle du cycle cellulaire est formé par un ensemble de protéines interactives qui induisent et coordonnent de façon cyclique les processus de duplication de l'ADN et de division de la cellule (Alberts et coll. 2002). Dans le cycle cellulaire normal, le système de contrôle est régulé par des «freins» qui peuvent arrêter le cycle au niveau de points de contrôle (*checkpoints*) spécifiques (**Figure 14**). Les signaux rendant compte du bon déroulement ou non des processus en amont de la division cellulaire (transcription et duplication de l'ADN) peuvent entraîner la suspension temporaire ou définitive du cycle cellulaire. En effet, lorsqu'une anomalie est détectée, le système de contrôle empêche l'entrée en mitose tant que les processus de réplication de l'ADN ne sont pas terminés (Alberts et coll. 2002).

Le système de contrôle du cycle cellulaire est basé sur deux familles de protéines:

- la famille des protéines kinases cycline-dépendantes (ou *Cdk*) qui induisent les processus en amont de la division cellulaire en phosphorylant des protéines spécifiques (Alberts et coll. 2002),
- la famille des cyclines qui se lient aux *Cdk* et contrôlent leur capacité à phosphoryler des protéines cibles appropriées. Par exemple, l'induction de la mitose dépend de l'interaction entre la protéine *Cdc2* et la cycline B.

L'assemblage cyclique, l'activation et le désassemblage des complexes cycline-Cdk sont les principaux événements sur lesquels reposent le cycle cellulaire (**Figure 15**) (Alberts et coll. 2002).

Les complexes cycline-Cdk peuvent également être régulés par la liaison avec des protéines inhibitrices de *Cdk* (*CKIs*). Ces *CKIs* interviennent dans le contrôle des phases G_1 et S du cycle cellulaire. Les complexes *cycline-Cdk* peuvent être inactivés par une protéolyse contrôlée des cyclines à des stades précis du cycle cellulaire. Cette protéolyse est régulée par un mécanisme ubiquitine-dépendant (**Figure 16**). Un complexe enzymatique activé reconnaît des séquences spécifiques d'acides aminés de la cycline et la lie à plusieurs molécules d'ubiquitine. Ce transfert de l'ubiquitine sur la cycline inactive cette dernière et entraîne sa destruction. Les complexes enzymatiques responsables de la réaction d'ubiquitinylation de la cycline sont différents selon la phase du cycle cellulaire:

- le complexe enzymatique *SCF* qui, pendant les phases G_1 et S, est responsable de l'inhibition de *G₁/S-cyclines* et de certaines protéines *CKIs*.
- le complexe *APC* (*Anaphase Promoting Complex*) est responsable de la protéolyse des M-cyclines et des autres régulateurs de la mitose (Alberts et coll. 2002).

III.3 Les principaux types de mort cellulaire.

III.3.1 Généralités.

La mort cellulaire joue un rôle central dans le contrôle de la taille des tissus et dans l'élimination des cellules infectées ou endommagées. Les défauts de régulation de la mort cellulaire sont en effet à l'origine de nombreuses pathologies. Une activation anormale est à l'origine des maladies neuro-dégénératives (Alzheimer et Parkinson), et de la gravité de certaines maladies hépatiques (Alberts et coll. 2002).

Inversément, une inhibition du programme de mort cellulaire est responsable de certaines maladies auto-immunes et de l'apparition de cancers. Le contrôle de la taille des populations cellulaires (tissu) repose sur l'existence d'une balance entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaires (Alberts et coll. 2002).

Ainsi, l'apparition d'une mutation entraîne souvent l'activation d'un programme de mort cellulaire permettant l'élimination de la cellule anormale (**Figure 17**). Aussi, la combinaison d'une mutation oncogénique et d'un défaut dans l'induction d'un processus de réparation et/ou de mort constituera un élément important de la progression tumorale (Alberts et coll. 2002).

Les différentes formes de mort cellulaire peuvent être classées en «mort» programmée et «mort» accidentelle (nécrotique). Les formes de mort cellulaire physiologique (programmée) sont subdivisées en mort cellulaire programmée de type I (apoptose), de type II (autophagie) ou autres (sénescence, catastrophe mitotique,...) (Okada et Mak 2004).

III.3.2. L'apoptose: la mort cellulaire programmée de type I.

III.3.2.1. Définition et généralités.

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée de type I ou suicide cellulaire) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, essentielle au développement embryonnaire, aux fonctions du système immunitaire, au développement du système nerveux et à la maintenance de l'homéostasie chez les organismes pluricellulaires. Elle est censée être en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Chez les mammifères, l'apoptose est contrôlée génétiquement par deux classes de gènes: les gènes pro-apoptotiques (*Bax*, *Bad*, etc...) et les gènes anti-apoptotiques (*Bcl-2*, *Bcl-xl*, etc...)(Reed 2003).

La cellule qui déclenche son suicide commence tout d'abord par couper tout contact avec son environnement; la cellule se détache et s'écarte des cellules voisines puis se morcelle de manière ordonnée: elle se condense, puis fragmente son noyau, le corps cellulaire se condense, lui aussi et se fragmente en petits ballonnets, «les corps apoptotiques» (Ameisen 1996). La membrane externe de la cellule se modifie, prend un aspect bouillonnant, mais reste intacte, empêchant la libération à l'extérieur des enzymes qu'elle contient, évitant la destruction des cellules environnantes (Ameisen 1996). Cette mort discrète n'entraîne ni lésion, ni cicatrisation, ni inflammation. A titre comparatif, les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont reprises dans le **tableau 7** (voir verso page 45).

III.3.2.2. Les mécanismes de régulation de l'apoptose.

L'entrée en apoptose des cellules de mammifères est régulée par une famille de cystéine protéases connues sous le nom de caspases. Au nombre de dix, ces caspases sont exprimées dans les cellules sous forme de pro-caspases inactives. Suite à un stimulus, les caspases initiatrices que sont les caspases 8 et 9 sont activées et

hydrolysent les caspases 3, 6 et 7 qui sont les précurseurs de caspases effectrices. Les caspases effectrices activées hydrolysent à leur tour un ensemble de substrats cellulaires, entraînant une cascade de changements biochimiques et morphologiques qui permettent une amplification du signal apoptotique (Kondo et coll. 2005).

L'activation des caspases se fait suivant deux voies distinctes:

- La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est la principale voie d'activation des caspases. Lorsque la cellule subit un stress important (déplétion en facteurs de croissance, hypoxie, dégâts de l'ADN,...), la transduction des signaux en réponse à ce stress converge principalement vers les mitochondries et entraîne l'induction d'une série d'événements biochimiques qui a pour conséquence la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. La perméabilisation de la membrane mitochondriale conduit à:
 - la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial,
 - la libération du cytochrome C et d'autres molécules pro-apoptotiques,
 - la formation de l'apoptosome (un complexe protéique contenant le cytochrome C, l'*APAF1* et la caspase 9),
 - l'activation des caspases (**Figure 18**).

Le contrôle de la perméabilité mitochondriale dépend principalement des protéines de la famille *Bcl-2*.

- La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, active les caspases 8 et 10. Cette voie est activée par la liaison des ligands *FAS* (gène de la superfamille des récepteurs du *TNF*) ou *TNF* (Tumor Necrosis Factor) sur des récepteurs de la surface membranaire (**Figure 18**).

L'inhibition anormale du suicide cellulaire est une étape essentielle de la formation et de la progression du cancer (Reed 2003). Les oncogènes n'entraînent, en effet, une prolifération cellulaire anormale qu'à condition que d'autres gènes soient aussi exprimés pour empêcher le suicide cellulaire. Par exemple, des mutations entraînant une répression de *Bcl-2* favoriseront le développement d'une tumeur (Reed 2003).

L'inhibition de l'apoptose favorise aussi la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme. En effet, une cellule saine migrant dans un organe autre que le sien entraînera normalement le déclenchement d'un mécanisme de défense immunitaire provoquant l'induction dans la cellule d'un processus de mort cellulaire (Ameisen 1996). La protéine *p53* est un facteur de transcription dont le rôle est de contrôler l'intégrité du génome avant la réplication de l'ADN (Okada et Mak 2004). *p53* induit l'expression de *p21* (un inhibiteur du cycle cellulaire) ou de gènes pro-apoptotiques comme *Bax* et *Fas*. C'est ainsi que lorsque les dommages causés à l'ADN sont importants, l'activation prolongée de *p53* induit l'accumulation de protéines pro-apoptotiques et déclenche la mort cellulaire (Okada et Mak 2004).

La plupart des agents anti-cancéreux, parmi lesquels on peut citer les inhibiteurs des topoisomérases (Etoposide, Irinotécan), les dérivés du platine (Cisplatine, Carboplatine) et bien d'autres, agissent en induisant l'apoptose. Toutefois, l'accumulation d'altérations géniques qui inhibent la mort cellulaire diminue la sensibilité des cellules tumorales aux agents pro-apoptotiques et favorise de ce fait la résistance à certains traitements anti-cancéreux (Okada et Mak 2004).

III.3.3. L'autophagie: la mort cellulaire programmée de type II.

III.3.3.1 Généralités et mécanismes de régulation.

L'autophagie ou mort cellulaire programmée de type II est un processus physiologique qui englobe un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires dans les lysosomes (Kondo et coll. 2005). Le processus commence par la formation d'une double membrane (dont l'origine reste encore inconnue) qui enveloppe les éléments à éliminer dans des vacuoles appelées autophagosomes (Kondo et coll. 2005). Ces autophagosomes fusionnent ensuite avec des lysosomes et forment alors des autolysosomes dans lesquels les matières à éliminer seront dégradées (Kondo et coll. 2005) (**Figure 19**). Le rôle de l'autophagie serait le maintien de la survie par le catabolisme de composants intracellulaires.

Un excès de ce processus entraîne une mort cellulaire dont les caractéristiques sont différentes de celles de l'apoptose (**Tableau 7**).

L'autophagie est sous contrôle génétique et implique des voies de signalisation dont certaines peuvent être communes à l'apoptose (Okada et Mak 2004). D'un point de vue moléculaire, les voies de signalisation qui régissent l'autophagie impliquent au moins l'activation de la *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)* et de la *kinase target of rapamycin (TOR)*. L'activité des *PI3K* de classe III est particulièrement importante dans les phases précoces de l'autophagie car elle induit la formation de l'autophagosome (Okada et Mak 2004). Par contre, *mTOR* inhibe la formation des vésicules autophagiques. En conséquence, l'inhibition de *mTOR* par la rapamycine entraîne le blocage du cycle cellulaire et éventuellement une mort cellulaire par autophagie (Okada et Mak 2004).

Le *Phosphate and Tensin Homologue (PTEN)*, un gène suppresseur de tumeur, est aussi impliqué dans la régulation de la mort cellulaire par autophagie. *PTEN* inhibe les *PI3K* de classe I, entraînant l'inactivation de *AKT* (une sérine thréonine kinase située en aval de *PI3K* de classe I et qui active *mTOR*) et donc l'initiation de la mort cellulaire par autophagie (Kondo et coll. 2005). D'autres molécules impliquées dans la régulation de la mort cellulaire par autophagie ont été décrites telles que la *DAPK (Death Associated Protein Kinase)*, la *DRP1 (Death Associated Related Protein Kinase 1)*, *Bcl2* et *Beclin1* (Kondo et coll. 2005).

La fonction précise de la mort cellulaire par autophagie chez les mammifères n'est pas complètement élucidée. La dégradation par les lysosomes des organites cellulaires est requise pour la survie au stress ou aux dommages causés à la cellule (Okada et Mak 2004).

L'autophagie n'est pas seulement un processus de mort cellulaire, elle joue d'abord un rôle de défense en protégeant les cellules contre diverses agressions biologiques, physiques et chimiques (Massey et coll. 2004). Cette défense peut être soit directe, quand des agents toxiques sont dirigés contre les lysosomes ou indirecte, lorsque le processus autophagique permet d'éliminer des structures intracellulaires endommagées. D'autre part, dans les états de carence nutritionnelle, la dégradation des lipides membranaires et des protéines par l'autolysosome produit des acides gras libres et des acides aminés qui peuvent être réutilisés comme «combustible» pour la production d'ATP et pour maintenir la synthèse protéique.

Vraisemblablement, cette fonction de recyclage de l'autophagie permet la survie cellulaire. Enfin l'autophagie est également essentielle pour la morphogenèse, la différenciation cellulaire et la transformation tissulaire (Massey et coll. 2004).

De récents travaux ont mis en évidence l'implication des dysfonctionnements de l'autophagie dans le développement de maladies telles que les maladies neurodégénératives, la cardiomyopathie, la myopathie, les maladies infectieuses et le cancer (Okada et Mak 2004).

III.3.3.2 Autophagie et thérapie anti-cancéreuse.

Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mort cellulaire par autophagie sont altérées dans les cellules cancéreuses et, de ce fait, constituent des cibles thérapeutiques potentielles (Kondo et coll. 2005). Les cellules cancéreuses étant très souvent résistantes à l'apoptose, de nombreuses stratégies thérapeutiques visent à sensibiliser les cellules tumorales aux traitements inducteurs d'autres types de mort cellulaire. Aussi, l'induction de la mort cellulaire par autophagie de cellules cancéreuses apoptose-résistantes pourrait être une approche thérapeutique efficace (Kondo et coll. 2005). La mort cellulaire par autophagie est négativement régulée par la voie de signalisation de *PI3K*, *AKT* et *mTOR*. Comme cette voie de signalisation est souvent activée dans les cellules tumorales, elle pourrait être inactivée de sorte à induire leur mort par autophagie (Kondo et coll. 2005). Par exemple, le traitement de cellules tumorales par des inhibiteurs de *PI3K*, *AKT* et *mTOR* les rendent plus sensibles à la rapamycine, un inducteur de la mort cellulaire par autophagie (Kondo et coll. 2005). Plusieurs médicaments, comme le Témazolomide[®] et le Tamoxifène[®], induisant un processus de mort cellulaire par autophagie sont utilisés en clinique.

Le **Tableau 8** reprend quelques exemples de traitements qui induisent la mort cellulaire par autophagie ainsi que leurs cibles.

Bien qu'on ait observé l'élimination de cellules tumorales par apoptose et/ou par autophagie en réponse à une thérapie anti-cancéreuse, on dispose de peu d'éléments sur les liens entre l'apoptose et l'autophagie.

Dans de nombreux cas, l'inhibition de l'apoptose entraîne l'autophagie, et inversement (**Figure 20**) (Kondo et coll. 2005; Kroemer et Jaattela 2005). Le processus de mort cellulaire par autophagie peut se terminer par une apoptose.

III.3.4 La perméabilisation des membranes lysosomales.

Les lysosomes sont responsables du recyclage des organites cellulaires et des macromolécules (Fehrenbacher et Jaattela 2005). Les éléments autophagiques sont détruits dans les lysosomes par plusieurs processus hydrolytiques (Fehrenbacher et Jaattela 2005). Les lysosomes contiennent des hydrolases cataboliques qui participent à la digestion du matériel autophagique, au processus aigu de mort cellulaire ou à l'invasion de tissu (après leur relargage dans l'espace extracellulaire) (Kroemer et Jaattela 2005). L'induction d'une perturbation de l'intégrité de la membrane lysosomale (par exemple une perméabilisation de la membrane lysosomale, LMP) peut déclencher la mort cellulaire (Kroemer et Jaattela 2005). Une libération limitée du contenu lysosomal dans le cytoplasme déclenche la mort cellulaire par apoptose alors qu'une rupture généralisée de la membrane lysosomale avec un relargage massif du contenu lysosomal a pour conséquence le déclenchement d'un processus de mort cellulaire par nécrose (Kroemer et Jaattela 2005). Cependant, l'induction de la LMP peut également se terminer par une mort non-apoptotique (Nylandsted et coll. 2004). La LMP peut être induite par les stimuli apoptotiques classiques, par certains messagers intracellulaires secondaires tels que les ROS (*Reactive Oxygen Species*) ou la sphingosine (Kroemer et Jaattela 2005).

Les protéases de la famille des cathepsines sont les hydrolases lysosomales qui ont été les plus étudiées. Ces cathepsines peuvent être divisées en trois sous-groupes selon l'acide aminé constituant le site actif: la cystéine pour les cathepsines *B, C, H, F, K, L, O, S, V, W* et *X/Z*; l'aspartate pour les cathepsines *D* et *E*; et la sérine pour la cathepsine *G* (Fehrenbacher et Jaattela 2005). Les cathepsines *B, L* et *D* sont des médiateurs de la mort cellulaire induite par l'activité lysosomale. Plusieurs stimuli de mort cellulaire tels que l'activation des récepteurs de mort, l'activation de *p53*, les agents stabilisateurs des microtubules, le stress oxydatif, le manque de facteurs de croissance peuvent induire une perméabilisation partielle de la membrane lysosomale et la libération de cathepsines dans le cytosol (Fehrenbacher et Jaattela 2005).

En fonction du degré de perméabilisation de la membrane lysosomale et de la quantité de cathepsines actives libérées, on peut observer plusieurs formes de mort cellulaire allant de l'apoptose à la nécrose (**Figure 21**) (Fehrenbacher et Jaattela 2005).

III.3.5 Les autres types de morts cellulaires.

Les cellules tumorales qui échappent à l'apoptose peuvent mourir par d'autres mécanismes de mort cellulaire dits «non-apoptotiques». Il en existe différents types, dont le mécanisme semble être indépendant des caspases (Okada et Mak 2004). Le **Tableau 7** (voir verso page 45) en reprend différentes caractéristiques ainsi que les techniques permettant leur mise en évidence. Nous retiendrons dans la présente section la sénescence qui peut représenter une nouvelle forme de combat contre le cancer.

L'entrée en sénescence de cellules fait suite à une période de prolifération rapide, les télomères de leurs chromosomes devenant alors sensiblement plus courts. Par la suite, la croissance ralentit et les cellules entrent dans une forme de quiescence correspondant à un arrêt permanent du cycle cellulaire qui est connue sous le nom de «sénescence répllicative». Une cellule sénescence présente certaines caractéristiques morphologiques: un aplatissement du cytoplasme et une augmentation de sa granulosité. Au niveau biochimique, l'induction de la sénescence est associée à l'activité de β -galactosidases (Okada et Mak 2004).

L'initiation du processus de mort cellulaire par sénescence induit l'activation de divers inhibiteurs du cycle cellulaire et nécessite l'intégrité fonctionnelle de *p53*, du gène *CDKN1A* un produit de *INK4A* (également appelé p16) et la protéine *Rp* (*Retinoblastoma protein*). L'implication de ces suppresseurs de tumeur dans le processus de sénescence signifie que le rôle du processus de mort cellulaire par sénescence est de supprimer la tumorigenèse. Cette hypothèse a été confirmée sur des modèles animaux (Okada et Mak 2004).

IV. Les mécanismes d'invasion des tissus normaux par les cellules cancéreuses.

IV.1 Généralités.

L'invasion locale et à distance (les métastases) sont deux caractéristiques essentielles des cancers et sont responsables de leur morbidité et de leur mortalité (Li et coll. 2005).

L'invasion tumorale implique plusieurs mécanismes, une modification de l'adhésion cellulaire, une dégradation des tissus environnants, la mobilisation des cellules tumorales, l'hypoxie et la nécrose tumorale.

Le tissu cancéreux comporte deux composantes: les cellules cancéreuses et le stroma. Le stroma est un tissu non tumoral provenant de l'hôte. Il est le tissu nourricier et de soutien des cellules tumorales. Il existe de nombreuses interactions entre les cellules cancéreuses et le stroma, jouant un rôle important dans les phénomènes d'invasion et de dissémination tumorale (Li et coll. 2005).

La plupart des cancers épithéliaux (carcinomes) passent par une phase de prolifération purement intra-épithéliale (carcinome in situ). Le franchissement de la membrane basale par les cellules carcinomateuses définit un carcinome invasif. Les cancers non épithéliaux sont d'emblée invasifs (à l'exception des mélanomes qui peuvent présenter une phase initiale intra-épidermique et des séminomes testiculaires qui font le plus souvent suite à une néoplasie germinale intra-tubulaire) (Li et coll. 2005).

IV.2 La migration cellulaire.

IV.2.1 L'adhésion.

Les cellules tumorales sont liées entre elles et à la matrice extracellulaire par des systèmes de jonction et par des molécules d'adhésion (Small et Kaverina 2003).

La matrice extracellulaire est un réseau complexe de protéines et de protéoglycanes, dont le rôle est d'assurer la cohésion, la migration et la différenciation cellulaires (Small et Kaverina 2003). La matrice extracellulaire comporte deux composantes: la matrice interstitielle et la membrane basale. La régulation physiologique de la matrice extracellulaire se fait par un équilibre entre un système de protéases et d'inhibiteurs de protéases (Small et Kaverina 2003).

Il existe de nombreuses familles de molécules d'adhésion dont les quatre principales sont les intégrines, les lectines (les sélectines et les galectines, par exemple), les cadhérines et les immunoglobulines. La modulation de l'expression des molécules d'adhésion et la modification des jonctions intercellulaires entre les cellules tumorales participent à l'invasion tumorale par l'inhibition des contacts intercellulaires (Small et Kaverina 2003).

Le complexe d'adhésion (**Figure 22**) est un groupement macromoléculaire comprenant une partie transmembranaire constituée d'un ensemble de molécules d'intégrines liées à la matrice extracellulaire et d'une partie intracellulaire composée par les protéines *FAK* (*focal adhesion kinase*), paxilline, taline, zyxine, vinculine et tensine; ces protéines intracellulaires les plus importantes et les mieux caractérisées régulent de façon dynamique les complexes d'adhésion (Carragher et Frame 2004).

IV.2.2 La motilité.

La **Figure 23** illustre les différentes étapes de la migration cellulaire. La régulation de la migration cellulaire est un processus complexe, impliquant l'adhésion des cellules aux protéines de la matrice extracellulaire et les concentrations en facteurs de croissance dans l'environnement extracellulaire, ce qui permet d'orienter le déplacement de la cellule à travers des tissus complexes (Li et coll. 2005). Le cytosquelette d'actine et les systèmes d'adhésion de la matrice extracellulaire sont les composantes moléculaires majeures impliquées dans la migration cellulaire (Yamazaki et coll. 2005). Trois types de cytosquelette (les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules) contribuent à la migration cellulaire (Li et coll. 2005). La migration des cellules tumorales passe par l'accumulation de microfilaments sous la membrane plasmique, permettant les déplacements par pseudopodes. Elle fait aussi intervenir des facteurs autocrines de mobilité (*AMF* ou *Autocrine Motility Factor*, *HGF* ou *Hepatocyte growth factor*), des facteurs chimiotactiques (chémokines), des cytokines (*TNF*, *IGF* ou *Insuline-like Growth Factor*) et des facteurs de croissance (*EGF*, *Epithelial Growth Factor*).

IV.2.3 L'invasion.

La progression tumorale dépend du pouvoir prolifératif et du pouvoir métastasant de la tumeur (Blasi et Stoppelli 1999). Les métastases sont des foyers cancéreux secondaires, développés à distance de la tumeur primitive, et dont la croissance est autonome, indépendante de celle de la tumeur primitive (Vasiliev 2004). Les principales voies de migration sont sanguine ou lymphatique. Que ce soit par voie sanguine ou lymphatique, les cellules cancéreuses qui quittent le foyer tumoral initial doivent franchir des étapes successives: le détachement de la cellule de la tumeur primitive, l'invasion de la matrice extracellulaire, le passage dans la circulation par intravasation, la survie dans la circulation, l'extravasation, la survie et la prolifération dans un site étranger (Condeelis et Segall 2003).

Pour se détacher de la tumeur primaire et envahir le tissu adjacent, la cellule cancéreuse dégrade la membrane basale et la matrice extracellulaire. Ce processus complexe impliquant de multiples protéases extracellulaires, nécessite une interaction de la cellule cancéreuse avec le micro-environnement tumoral (Carragher et Frame 2004).

Il existe plusieurs cascades protéolytiques agissant sur la matrice extracellulaire :

- Les métalloprotéinases (MMP) et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) agissent sur les divers composants de la matrice extracellulaire (collagénases, gélatinases, stromélysines,...), ils ont également une action croisée sur les autres voies (**Figure 24**).
- Le système urokinase (uPA) et son récepteur, facteur clé de l'activation du plasminogène en plasmine. Il s'agit d'un système complexe qui participe de manière directe à la dégradation de la matrice extracellulaire et qui interagit avec d'autres cascades protéolytiques.
- Les cathepsines, cystéine protéases de localisation lysosomale, mais également secrétées pour participer au processus de dégradation de la matrice extracellulaire. La cathepsine B participerait à l'activation de l'uPA, montrant l'étroite interconnexion de ces différentes cascades.

IV.3 Les cellules cancéreuses migrantes sont résistantes à l'apoptose mais moins à l'autophagie.

La formation de métastases résulte d'une succession d'étapes multiples et complexes conduisant à l'implantation et à la croissance de cellules malignes dans un nouvel environnement organique (Mehlen et Puisieux 2006). Pendant ce processus, les cellules cancéreuses doivent surmonter de nombreux obstacles, tels que la pression hémodynamique; la perte d'adhésion cellulaire, la dénutrition ou l'hypoxie, qui pourraient induire la mort cellulaire (Mehlen et Puisieux 2006). Cependant, l'utilisation de modèles expérimentaux a montré que l'apoptose est un facteur modulateur de métastase, déterminant pour chacune des étapes cruciales du processus métastatique (Mehlen et Puisieux 2006).

Les deux premières étapes de l'invasion tumorale (détachement des cellules de la tumeur primaire et désorganisation de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire) devraient induire un processus de mort cellulaire par apoptose (Mehlen et Puisieux 2006). L'inhibition de ce processus apoptotique est médiée par plusieurs facteurs dont la matrice extracellulaire (Mehlen et Puisieux 2006). Les voies de signalisation activées par les intégrines modulent l'activité des gènes régulateurs de l'apoptose tels que les gènes de la famille de *BCL2* et les caspases. Après le détachement de la cellule de la tumeur primaire, des protéines pro-apoptotiques de la famille de *Bcl2* tels que *BIM* (*Bcl-2*

Interacting Mediator of cell death) et *BMF* (*Bcl-2 –Modifying Factor*) sont libérés du cytosquelette et déclenchent la voie apoptotique mitochondriale (Mehlen et Puisieux 2006).

En effet, dans les cellules normales, les protéines *BIM* et *BMF* sont liées au cytosquelette, mais après le détachement des cellules de la matrice extracellulaire, ces protéines sont libérées et inhibent la protéine anti-apoptotique *BCL2* avec pour conséquence une induction de l'anoïkose (Frisch et Screaton 2001; Attwell et coll. 2002). Le défaut d'adhésion des cellules épithéliales normales à la matrice extracellulaire entraîne l'induction d'un type d'apoptose appelé anoïkose (Frisch et coll. 1996; Frisch et Screaton 2001; Attwell et coll. 2002; Stupack et Cheresch 2002; Liotta et Kohn 2004; Valentijn et coll. 2004). Il s'agit de l'induction d'un processus de mort cellulaire par apoptose consécutif à la perte de contact de la cellule avec la matrice extracellulaire (Attwell et al. 2002). La réduction de la sensibilité à l'anoïkose est un élément important de la progression tumorale et plus particulièrement dans le processus de formation de métastases. En effet, l'anoïkose protège contre la prolifération cellulaire ectopique (altération de l'architecture tissulaire) et prévient la migration cellulaire (étape initiatrice de l'invasion et de la métastase) (Frisch et coll. 1996; Frisch et Screaton 2001; Attwell et coll. 2002). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la résistance des cellules tumorales migrantes à l'anoïkose, dont la voie de survie Akt/PKB et l'inhibition des voies de signalisation FADD/caspase-8 et Jun kinase. Cependant, les événements initiateurs demeurent inconnus. PKB/Akt inhibe l'apoptose en phosphorylant et inactivant les facteurs pro-apoptotiques tels que *Bad* et la caspase-9. En effet, PKB/Akt module l'activité des facteurs de transcription, par activation de *NF-κB*, phosphorylation et inhibition de *FKHRL1* (*Forkhead transcription factor*), ce qui permet d'éviter la transcription du ligand *Fas* (Attwell, Roskelley et al. 2002).

Une autre voie de signalisation de la résistance des cellules tumorales migrantes à l'apoptose impliquant la protéine *TrkB* a été mise en évidence. La protéine *TrkB*, un récepteur tyrosine kinase ayant *BDNF* (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) comme un de ses ligands primaires, joue un rôle essentiel dans le développement et le fonctionnement du système neuronal, y compris la promotion de la survie neuronale.

Une étude récente a démontré que l'activation de la protéine *TrkB*, stimulée par *BDNF* (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), induit une résistance à l'anoïkose par activation de *PI3K* et inhibition des caspases (Attwell et coll. 2002) (**Figure 25**).

Sur le plan clinique, cette résistance des cellules tumorales migrantes à l'anoïkose (apoptose) les rend peu ou pas sensibles aux médicaments anti-cancéreux présentant un mécanisme d'action pro-apoptotique. L'échec de la thérapie anti-cancéreuse qui en résulte entraîne un accroissement de l'agressivité de la tumeur car ces cellules migrantes vont former des métastases à distance.

Les gliomes malins, parmi lesquels les glioblastomes constituent un groupe important, sont caractérisés par une infiltration diffuse dans le parenchyme cérébral avec pour conséquence, le fait qu'aucun patient avec un glioblastome multiforme n'ait été guéri à ce jour (Lefranc et Kiss 2006). Les cellules migrantes de glioblastome multiforme sont résistantes à l'apoptose, et de ce fait à la radiothérapie et à la chimiothérapie (**Figure 26**) conventionnelle, de par l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaire, parmi lesquelles les plus importantes identifiées à ce jour sont les voies de signalisation contrôlées par *PI3K*, *Akt* et *mTOR* (Lefranc et Kiss 2006). Les cellules migrantes de glioblastome multiforme semblent cependant moins résistantes à la mort cellulaire par autophagie. En effet, la perturbation des voies de signalisation contrôlées par *mTOR* induit un processus autophagique marqué dans les cellules de glioblastome multiforme (Lefranc et Kiss 2006). Les composés qui induisent l'autophagie pourraient donc être actifs sur les cancers résistants aux médicaments anti-tumoraux présentant un mécanisme d'action pro-apoptotique.

BUT DU TRAVAIL

Balanites aegyptiaca (L.) Del. (Zygophyllaceae) est une plante largement utilisée, aussi bien en médecine traditionnelle humaine que vétérinaire. Parmi les utilisations on notera surtout différentes parasitoses (traitements des schistosomiasés, de Dracunculose, de nématodosés).

Les médicaments utilisés pour le traitement des helminthiases ne sont pas toujours accessibles aux populations rurales, notamment en Afrique. D'autre part, de nombreux cas de résistance aux principaux anthelminthiques sont observés. De nos jours, il n'existe pratiquement pas de molécules efficaces contre les strongles digestifs. La recherche de nouvelles molécules anthelminthiques est donc une nécessité.

Nous avons entrepris de rechercher et d'identifier les principes actifs responsables de l'activité nématocide de *Balanites aegyptiaca* dont les amandes sont utilisées au Burkina Faso pour le traitement des parasitoses intestinales. Il est nécessaire de disposer d'essais biologiques ou pharmacologiques relativement simples afin de caractériser l'activité des extraits ou des fractions résultant des différentes étapes de purification qui mèneront à l'isolement de constituants actifs purs (Hostettmann et coll. 2000). Ces essais doivent être très sensibles parce que les substances actives peuvent être présentes dans la plante à de très faibles concentrations (Hostettmann et coll. 2000).

Notre travail comporte deux objectifs principaux, le premier visant à rechercher les preuves scientifiques d'un traitement traditionnel basé sur l'utilisation d'extraits d'amandes de *Balanites aegyptiaca* (L.), et le second étant l'évaluation d'une activité potentiellement anti-tumorale du ou des principe(s) actif(s) responsable(s) de l'activité anthelminthique.

MATERIEL ET METHODES

I. Etude de l'activité nématocide.

Pour la caractérisation *in vitro* de l'effet nématocide des amandes de *Balanites aegyptiaca* et de balanitines, nous avons utilisé *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) comme modèle et la 5(6)- carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) comme indicateur de viabilité. Sydney Brenner (prix Nobel de médecine et de physiologie 2002) fut le premier à utiliser *Caenorhabditis elegans* comme modèle biologique en 1961 (Hope 1999). *Caenorhabditis elegans* est un vers rond non segmenté avec un long corps cylindrique et transparent (Hope 1999). Sur le plan phylogénétique, *Caenorhabditis elegans*, est un nématode libre très proche de *Strongyloïdes* (parasite humain et animal) et *d'Ascaris suum* (Geary et Thompson 2001). En outre *C. elegans* est sensible à la majorité des anthelminthiques commercialisés (Simpkin et Coles 1981). Toutefois, le décryptage total du génome de *C. elegans* permet de développer des souches transgéniques en fonction de l'étude que l'on souhaite réaliser (par exemple des souches résistantes à des anthelminthiques courants). Le test d'évaluation de l'effet nématocide utilisé dans cette étude, est inspiré de celui décrit par Simpkin et Coles en 1981 (Simpkin et Coles 1981).

L'utilisation de la CFDA comme indicateur de viabilité de *C. elegans* permet de distinguer les vers morts (immobiles et fluorescents) des vers vivants (mobiles et non fluorescents) et des vers paralysés (immobiles et non fluorescents) (Gnoula et coll. 2007a). On peut ainsi distinguer les composés qui induisent une paralysie du nématode de ceux présentant un effet nématocide direct. D'autre part, la culture synchrone permet de disposer d'une population homogène de nématodes et donc de déterminer le stade de développement du nématode qui est le plus sensible à la substance étudiée. Ces informations permettent d'établir au moins partiellement le profil anthelminthique (*in vitro*) de la substance étudiée.

I.1 Extraction et purification de substances nématocides des amandes de *Balanites aegyptiaca*.

Les fruits de *Balanites aegyptiaca* ont été collectés d'octobre à novembre 2002 près de Ouagadougou au Burkina Faso et un herbier a été déposé auprès du BRLU (Herbarium, Université Libre de Bruxelles) herbarium de Belgique.

La méthode d'extraction utilisée est inspirée de celles décrites par Ibrahim A. en 1992 (Ibrahim 1992) et Dinan et coll. en 2001 (Dinan et coll. 2001).

La poudre des amandes (1.5 kg) a été dégraissée (étape permettant d'éliminer les matières grasses et les substances lipophiles) avec de l'éther de pétrole, séchée et épuisée successivement avec du chloroforme, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle, du méthanol et de l'eau. 3 g de l'extrait aqueux sec ont été fractionnés par chromatographie sur colonne de gel de silice G60 (300 g, dimension particulière: 0.063-0.200 millimètres) et élués successivement avec du chloroforme, des mélanges chloroforme/méthanol dans des proportions croissantes de méthanol, 90:10 à 10:90 et du méthanol (Gnoula et coll. 2007b). Nous avons obtenu 70 fractions qui ont été rassemblées selon leurs profils chromatographiques (valeurs de Rf et coloration après révélation par une solution d'anisaldéhyde sulfurique) sur couche mince (le solvant d'éluion est un mélange chloroforme/méthanol/eau dans les proportions 65:30:5) (Dinan et coll. 2001) (révélation par l'anisaldéhyde) en 10 fractions. Nous avons rassemblé dans la F4, les fractions qui contenaient des produits à Rapport frontal = 0.4 de couleur verdâtre après révélation à l'anisaldéhyde. Toutes les fractions ont ensuite été testées pour évaluer leurs propriétés nématocides. La fraction la plus active F4 a été purifiée par chromatographie de partage centrifuge (CPC) sur un Kromaton Hydrostatic- Proto équipé d'un rotor de 200 ml (Angers, France), en utilisant un mélange de solvants chloroforme/méthanol/butanol/eau (35:30:15:20, v/v), le surnageant étant la phase stationnaire et la phase la plus lourde, la phase mobile (Gnoula et coll. 2007b). 1.4 g de la fraction F4 ont été dissous dans 10 ml de phase stationnaire et soumis à la chromatographie à contre-courant (900 tours/min, 4.5 ml.min⁻¹, mode descendant, les fractions sont collectées toutes les 2 minutes pendant 80 minutes et mode ascendant pendant 40 minutes) (Gnoula et coll. 2007b). Nous avons collecté 60 sous-fractions dont un composé pur dont la structure a été déterminée par spectrométrie de masse et RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).

Les spectres ¹H et ¹³C RMN ont été relevés sur un Bruker Avance 300 à 300 et 75 Mhz, respectivement, avec le TMS comme standard interne; les spectres RMN 2-D dont COSY, HMQC et HMBC ont été enregistrés dans du DMSO sur une unité Varian 600 à 25°C, HRESI-MS ont été réalisés sur un spectromètre de masse de type Micromass QTOF II à une tension de capillaire et de cône de 2.8 kilovolts et 80 kilovolts, respectivement, et à une résolution de masse approximative de 10.000. Les sucres ont

été identifiés par HPTLC après hydrolyse avec de l'acide trifluoroacétique 1M. (Gnoula et coll. 2007b).

I.2 Mise au point et validation d'un test nématocide.

I.2.1 Produits utilisés.

Le TSA (Tryptone Soy Agar) et le TSB (Tryptone Soy Broth) proviennent de chez Oxoid (Angleterre). Le cholestérol, le méthanol et l'hydroxyde de sodium nous ont été fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne), la nystatine par Alpha Pharma (Braine-l'Alleud, Belgique), le peroxyde d'hydrogène par UCB (Belgique), le thiabendazole par Ludeco (Bruxelles, Belgique), le mébendazole par Certa (Braine-l'Alleud, Belgique), le levamisole et le pyrantel par Riedel-De Haën (Allemagne), et la 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) par Acros (Geel, Belgique). La niclosamide nous a été offerte par Bayer (Allemagne). Le PBS était de chez Invitrogen (Merelbeke, Belgique), les boîtes de culture T25 de chez VWR (Leuven, Belgique), les plaques multi-puits de chez Greiner Bio-one (Frickenhausen, l'Allemagne) et des boîtes de Pétri de chez Sarstedt (Nuremberg, Allemagne).

I.2.2 Les organismes biologiques utilisés.

Les souches sauvages de *C. elegans* et OP50 de *Escherichia coli* nous ont été gracieusement offertes par Devgen (Ghent, Belgique).

I.2.3 Microscopie en fluorescence.

Le microscope utilisé pour ces expériences était du type Axiovert S100TV (Zeiss, Allemagne) équipé en épifluorescence (lampe xénon); une roue de filtre lambda 10-2 (Sutter, Etats-Unis), équipée d'un obturateur rapide permettant le choix du filtre d'excitation ($\lambda_{\text{excitation}}$ 480 nm, $\lambda_{\text{émission}}$ 560 nm, $\lambda_{\text{dichroïques}}$ 505 nm). L'objectif est un A-Plan 10x/0.25 Ph1 (Zeiss, Allemagne) et les images sont acquises à l'aide d'une camera Hamamatsu Orca-2, sous le contrôle du logiciel AQM (Kinetic Imaging, United Kingdom).

I.2.4 Test pharmacologique d'évaluation d'effet nématocide *in vitro*.

En laboratoire, *C. elegans* est cultivé sur milieu TSA, Tryptone Soy Agar (sur lequel on a fait pousser au préalable, des bactéries en «nappe», *Escherichia coli* OP50) ou en milieu liquide (PBS: Phosphate Buffered Solution) et maintenu dans une armoire thermostatée à 20°C. Les vers sont maintenus en laboratoire en déposant (face contre face) une portion de gélose, d'environ 1 cm², provenant d'une culture de 7 jours, sur un nouveau milieu TSA recouvert d'une nappe de *Escherichia coli* OP50 (Hope 1999).

Le test nématocide commence par l'incubation d'œufs de *C. elegans* à 18- 20°C pendant 16 à 18 heures. Les œufs sont obtenus en vortexant toutes les 2 minutes pendant 10 minutes une suspension de vers gravides, à laquelle on a ajouté une solution de lyse (1 volume de NaOH 5N pour 2 volumes d'hypochlorite de sodium).

On obtient une population homogène de vers constituée de larves de 3^{ème} génération. Les œufs, les larves et les vers adultes sont cultivés dans du PBS enrichi par un bouillon de *E. coli* pendant la durée du test.

En pratique, à 5 ml d'une suspension de larves de 3^{ème} génération (environ 6250 à 7500 vers) on ajoute plusieurs concentrations différentes de la molécule à tester (solution dans du DMSO, le volume total de DMSO n'excède pas 1 %). Les vers ainsi traités sont incubés à 20°C pendant 7 jours. A chaque temps de mesure, un aliquote de 500 µl de cette suspension de vers est traité avec 200 µl d'une solution de CFDA (dilution 1/25 dans du PBS d'une solution obtenue par dissolution de 3 mg de CFDA dans 1 ml d'acétone) et incubé à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Après rinçage, le culot est à nouveau mis en suspension dans 1 ml de PBS, puis des aliquotes de 200 µl (250- 300 vers) sont distribués dans des plaques multipuits (24 puits). Le décompte des vers fluorescents (vers morts) au microscope à fluorescence permet de déterminer le pourcentage quotidien de vers morts (Gnoula et coll. 2007a). L'effet global du composé testé est établi en cumulant le pourcentage de vers morts observés pendant 7 jours et comparé à celui observé dans le contrôle.

I.2.5 Test d'inhibition *in vitro* de l'acétylcholinestérase.

Nous avons utilisé comme réactifs, le Tris obtenu de Jansen, l'iodure d'acétylthiocholine, la galantamine, l'acétyl-cholinestérase, l'acide 5, 5'-dithiobis [2-nitrobenzoïque] (DTNB) et la BSA (Bovine serum albumine) de Sigma, le MgCl₂.6H₂O, le NaCl de Merck.

Le protocole utilisé est décrit par Ingkaninan et coll. en 2003 (Ingkaninan et coll. 2003). Le principe du test est basé sur l'utilisation du DTNB comme indicateur coloré de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'acétylcholinestérase. L'intensité de la coloration mesurée par spectrophotométrie après les 1 minute 30 de réaction est proportionnelle à l'activité de l'acétylcholinestérase, exprimée en pourcentage d'inhibition. La galantamine a été utilisée comme contrôle positif; une inhibition totale de l'activité de l'enzyme est induite par la galantamine à une concentration de 21.6µM.

II. Etude de l'activité anti-tumorale.

II.1 Extraction de Bal-6/7.

Le mélange de Balanitines -6 et -7 a été isolé de *Balanites aegyptiaca* en utilisant le protocole décrit par Pettit et coll en 1991. Pour la caractérisation de l'activité anti-tumorale, effectuée dans le Laboratoire du Professeur Kiss, nous avons utilisé une méthode d'extraction qui est celle utilisée chez Unibioscreen qui, dispose d'une certaine expertise dans la recherche de substances anti-cancéreuses d'origine végétale.

La poudre des amandes de *Balanites aegyptiaca* (504 g) a été macérée dans de l'eau distillée (4 fois avec 1.5 l) pendant 3 heures à température ambiante et les extraits rassemblés ont été filtrés, puis évaporés pour obtenir un concentré (500 ml). Le concentré a été alors extrait au moyen d'un volume égal de n-butanol qui après évaporation a donné 39 g de matière sèche. Cet extrait sec a été dissout dans du méthanol (125 ml), puis chromatographié sur une colonne LH-20 (2.5 kg; 105 x 10cm) avec le méthanol (25 l) comme éluant. Des fractions éluées ont été caractérisées par chromatographie sur couche mince en utilisant CH₂Cl₂/MeOH (v/v : 8/2) comme éluant. Toutes les fractions contenant un composant avec un rf (rapport frontal) de 0.27 ont été rassemblées et évaporées à sec pour donner un extrait sec de 24 g. Ce résidu a été à son tour dissous dans 75 ml de CH₂Cl₂/MeOH (v/v: 2/3) et re-chromatographié sur une colonne de Sephadex LH-20 avec CH₂Cl₂/MeOH (v/v: 2/3) utilisé comme éluant. Des fractions éluées ont été de nouveau analysées par la chromatographie sur couche mince, comme indiqué ci-dessus et celles contenant le composant de rf 0.27 ont été rassemblées et évaporées à sec pour donner 19 g d'extrait. Ce dernier extrait était caractérisé par une «flash» chromatographie sur une colonne de gel de silice et éluée avec CHCl₃/MeOH (v/v : 9/1) pour donner deux fractions (0.186 g et 1.9 g après évaporation). La première fraction (contenant 0.186 g du produit avec une chromatographie sur couche mince rf de 0.27) était soumise à une

chromatographie sur colonne C18 en phase inversée (50 x 3cm) et éluée avec MeOH/H₂O (v/v: 9/1). Nous avons alors obtenu une fraction contenant 37 mg d'un mélange de balanitines -6 et -7 (chromatographie sur couche mince rf de 0.27 condition décrite ci-dessus). Les structures de balanitines -6 et -7 ont été confirmées par spectrométrie de masse ESI à l'aide d'un spectromètre Micromass ZQ et par RMN ¹H et ¹³C à l'aide d'un appareil Varian 300 en comparaison avec des données de littérature (Pettit et coll 1991). Des analyses par HPLC ont été réalisées sur une chaîne HPLC alliance.

II.2 Caractérisation *in vitro* de l'activité anti-tumorale de Bal-6/7.

II.2.1 Les produits utilisés.

Les différents produits utilisés ont été obtenus comme suit: taxol (Paclitaxel[®]; SA Bristol-Myers Squibb, Bruxelles, Belgique), SN38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin ; Aventis, Bruxelles, la Belgique), oxaliplatine (Inter-Produit chimique Ltd, ShenZhen, Chine), étoposide (VP16, Bristol-Myers Squibb, Bruxelles, Belgique) et doxorubicine (Adriamycin[®], Pfizer Pharmacia, Puurs, Belgique). La glycine, le L-fructose et le d-glucose ont été fournis par Sigma (Bornem, Belgique).

II.2.2 Les lignées cellulaires et les milieux de culture.

Toutes les lignées cellulaires de cancers humains utilisées dans cette étude ont été obtenues à la *American Type Culture Collection* (Manassas, Etats-Unis) dont les cellules de cancer du poumon non-à-petites cellules (NSCLC) A549 (code ATCC, CCL-185), de glioblastome U373 (code ATCC, HTB-17), de cancer hormono-résistant de la prostate PC-3 (code ATCC, CRL-1435), de cancer du pancréas Bx-PC3 (code ATCC, CRL-1687), de cancer du colon LoVo (code ATCC, CCL-229) et les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 (code ATCC, HTB-22). Tous les milieux de culture ont été complétés avec un mélange de glutamine 0.6mg/mL (GibcoBRL, Invitrogen, Merelbeke, Belgique), de pénicilline 200 IU/mL (GibcoBRL), 200 IU/mL de streptomycine (GibcoBRL) et de gentamicine 0.1mg/mL (GibcoBRL). Le FCS (GibcoBRL) était décomplémenté à 56°C pendant 1 heure. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans les flasques de culture cellulaire (Nunc, Invitrogen SA, Merelbeke, Belgique), dans une atmosphère de 5% de CO₂.

II.2.3 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, Bornem, Belgique). Le test colorimétrique MTT est un test *in vitro* mesurant la croissance globale d'une population cellulaire. Les 6 lignées cellulaires utilisées dans cette étude ont été incubées pendant 24h 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 72h 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 27**), quantitativement par spectrophotométrie en utilisant un lecteur de microplaque de type DIAS (laboratoires de Dynatech) à une longueur d'onde de 570 nm (avec une référence de 630 nm). Chaque condition expérimentale a été analysée en sextuplicat, avec neuf concentrations, de 10^{-5} à 10^{-9} M pour chaque composé testé.

II.2.4 Vidéo-microscopie quantitative.

La vidéo-microscopie quantitative est un procédé de microscopie à contraste de phases assistée par ordinateur, mis au point dans le laboratoire du Pr Robert Kiss (De Hauwer et coll. 1998; Debeir et coll. 2004; Debeir et coll. 2005). Cette technique permet de visualiser les effets d'une substance sur la morphologie, la prolifération et la migration cellulaire (**Figure 28**). Elle consiste à incuber des cellules en présence de la substance dont on veut étudier l'effet, puis à les observer à l'aide d'un microscope à contraste de phases surmonté d'une caméra. Les cellules sont filmées pendant toute la durée de l'étude et des images sont prises toutes les 4 minutes. Chaque fois qu'une image est enregistrée, le logiciel intégré au système la numérise.

En pratique, les cellules sur lesquelles on désire tester la substance étudiée sont préalablementensemencées 24 heures dans des boîtes de culture cellulaire T25 à raison de 75000 à 100000 cellules par boîte. Le composé dont on veut tester l'activité est ajouté, à la dose d'étude, 30 minutes avant le début du test. Les cellules ainsi traitées sont incubées dans le dispositif expérimental (thermostaté à 37°C). Le nombre de cellules par champ microscopique est de 20 à 30. Les images obtenues sont ensuite

numérisées, puis juxtaposées de sorte à obtenir un film d'une minute par condition expérimentale.

II.2.5 La microscopie en fluorescence.

La microscopie en fluorescence permet de visualiser des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes en les marquant avec des fluorochromes. On peut lier ces fluorochromes à des anticorps qui vont se fixer de façon spécifique sur les antigènes correspondants (immunofluorescence).

Dans notre étude, nous avons caractérisé par immunofluorescence l'effet de Bal-6/7 sur l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que sur l'expression de la protéine Hsp70. En pratique, pour la caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur l'organisation du cytosquelette d'actine, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles en verre déposées au fond de boîtes à 6-puits. Suite aux traitements, les cellules ont été rincées deux fois dans du PBS froid, fixées par du formol 4% pendant 20 minutes à 4°C et puis rincées à nouveau deux fois dans du PBS froid. La Phalloïdine conjuguée avec un fluorochrome, Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes Inc, Eugene, Etats-Unis) a été utilisée pour marquer en vert l'actine fibrillaire et la DNaseI conjuguée à l'Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes Inc) pour le marquage de l'actine globulaire en rouge (Knowles et McCulloch 1992). Les cellules ont été cultivées pendant 30 min, 2 et 6h en présence ou non de Bal-6/7 à la concentration IC₇₅ (470 nM pour A549 et 830 nM pour U373) sur des lamelles de verre avant le marquage. La fluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope Olympus AX70 connecté à un ordinateur (Omnilabo, Anvers, Belgique) équipé d'un appareil photo numérique Megaview2 et d'un logiciel analySIS® (Soft Imaging System, Munster, Allemagne).

La protéine Hsp70 est une protéine dont la production est augmentée en réponse à un stress cellulaire. Elle stabilise la membrane des lysosomes et protège les cellules d'une mort cellulaire par LMP (Lysosomal Membrane Permeabilization). D'où l'intérêt d'évaluer l'effet de Bal-6/7 sur l'expression de cette protéine.

En pratique, pour la caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur l'expression de la protéine Hsp70, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles en verre, déposées au fond de boîtes à 6-puits (3 cm de diamètre). Suite aux traitements, les cellules ont été rincées deux fois dans du PBS froid, fixées par du formol 4% pendant 20 minutes à 4°C et puis rincées à nouveau deux fois dans du PBS froid.

Le marquage se fait pendant deux heures avec l'anticorps primaire anti-Hsp70 (Cell signaling Brok , Leiden, Netherlands) et une heure à l'anticorps secondaire (red mouse diluée 1/400 dans une solution PBS, BSA 1%). Enfin, on procède au montage des lamelles dans du Moviol[®].

Les cellules ont été cultivées pendant 6h en présence ou non de Bal-6/7 à la concentration IC₇₅ (470 nM pour A549 et 830 nM pour U373) sur des lamelles de verre avant le marquage.

II.2.6 La cytométrie en flux.

La cytométrie en flux permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules défilent à grande vitesse devant une source lumineuse, le plus souvent un laser. La diffusion lumineuse, soit dans l'axe du laser, soit à 90  donne respectivement une information sur la taille et la structure de chacune des cellules. La source lumineuse permet en outre l'excitation de molécules fluorescentes présentées par la cellule et préalablement marquées. En effet, le passage des cellules dans un cytomètre est donc précédé d'un marquage par des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire. Ces molécules émettent une fluorescence après leur illumination.

Les signaux de diffusion et de fluorescence (photons) sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques, traités par un système informatique. Chaque cellule est ainsi transformée en un "  v nement électrique " avec plusieurs coordonnées (taille, granulométrie, fluorescence 1, fluorescence 2,...). Ces  v nements électriques forment des nuages de points (sur des cytogrammes) autour desquels on dessine des fenêtres électroniques. Au sein de chaque fenêtre, il est possible de préciser la distribution de la fluorescence. Les paramètres biologiques sont évalués sur des sous-populations cellulaires, et sont exprimés en pourcentages.

Nous avons à l'aide de cette technique mis en évidence l'effet des balanitines sur la cinétique du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, l'induction de processus liés à l'autophagie et l'induction de la production de ROS (Reactive Oxygen Species).

II.2.6.1 Caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur la cinétique du cycle cellulaire.

La cinétique du cycle cellulaire a été étudiée sur les lignées U373 et A549 par cytométrie en flux grâce à un appareil de type Beckman Coulter «XL système II» (Miami, FL.). Elle consiste à mesurer la fluorescence émise par des cellules mises en suspension et marquées par l'iodure de propidium, un puissant agent intercalant dont la fixation aux acides nucléiques est proportionnelle à la quantité de ceux ci dans la cellule. En présence d'ARNase (enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'ARN) pour dégrader toute forme d'ARN, la quantité d'iodure de propidium intercalé sera proportionnelle à la quantité d'ADN de la cellule.

L'iodure de propidium excité entre 450 et 570 nm va émettre une fluorescence entre 570 et 700 nm. L'intensité de la fluorescence émise étant proportionnelle à la quantité de matériel génétique, on pourra déterminer la distribution des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire sur un total de 10000 cellules analysées par condition expérimentale. Ce test permet donc une analyse de l'évolution de la cinétique du cycle cellulaire (**Figure 29**).

En pratique, après le traitement avec Bal-6/7, les cellules sont décollées par la trypsine puis lavées au PBS avant d'être fixées et perméabilisées avec de l'éthanol 70% pendant une nuit à - 20°C. Les cellules sont lavées à nouveau, puis incubées avec une solution d'iodure de propidium à 0.08 mg/ml en présence de ARNase pendant 30 minutes à 37°C.

La fluorescence émise à 620 nm, est ensuite mesurée grâce au cytomètre de flux. Les paramètres mesurés sont le nombre d'évènements d'une part et l'intensité de la fluorescence d'autre part (**Figure 29**).

II.2.6.2 Caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur l'induction de l'apoptose.

La mise en évidence de la mort cellulaire par apoptose versus non apoptotique par cytométrie en flux, a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par Darzynkiewicz et coll. en 1997. Ce protocole permet la mise en évidence d'un phénomène précoce de l'apoptose au cours duquel on observe une inversion de l'exposition des phosphatidyl sérines de l'intérieur de la membrane plasmique de la

cellule vers l'extérieur. L'annexine V est une protéine calcium-dépendante de haute affinité pour les phosphatidyl sérines.

La cellule en début d'apoptose va donc exposer ses phosphatidyl sérines à l'extérieur, alors que sa membrane plasmique reste imperméable contrairement aux phases plus avancées (**Figure 30**). Un double marquage à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium de cellules non fixées et non perméabilisées conduira à 4 cas de figure: les cellules non marquées ni à l'annexine V ni à l'iodure de propidium correspondent aux cellules qui ne sont pas en apoptose et sont donc vivantes, les cellules marquées uniquement à l'annexine V correspondant aux cellules en apoptose précoce, les cellules marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium sont des cellules en apoptose avancée ou nécrotiques et enfin les éléments uniquement marqués à l'iodure de propidium correspondent à des débris d'acides nucléiques (**Figure 31**).

Après les traitements indiqués avec Bal-6/7, les cellules sont incubées dans l'obscurité avec une solution d'annexine V-FITC en présence d'iodure de propidium pendant 15 minutes à 4°C (kit d'APO-AF, Sigma, Bornem, Belgique). Des données d'environ 10.000 cellules ont été enregistrées pour chaque échantillon. Un appareil Beckman Coulter a été utilisé pour donner une définition précise des pourcentages des cellules dans les deux compartiments apoptotique et/ou non apoptotique et le pourcentage de cellules qui n'ont apparemment pas été affectées par le traitement avec Bal-6/7.

Les cellules qui apparaissent normales sont non marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium, alors que les cellules en apoptose précoce sont marquées à l'annexine V mais pas à l'iodure de propidium. Les cellules en apoptose avancée (dont les membranes cellulaires sont altérées) sont positives à l'iodure de propidium et à l'annexine V. Chaque expérience a été effectuée en triplicat. Les cellules humaines du cancer du sein MCF-7 traitées ou non avec la doxorubicine (5µM pendant 36h) ont été utilisées comme contrôles positif et négatif (Czeczuga-Semeninck et coll. 2004).

II.2.6.3 Caractérisation de l'activité de Bal-6/7 sur la formation de compartiments cellulaires acides.

Nous avons utilisé le marquage par l'acridine orange pour mettre en évidence les compartiments vésiculaires acides (Nyslander et coll., 2004). Ce composé est caractérisé par l'émission d'une fluorescence verte en milieu basique et rouge en milieu acide. Ainsi, dans les cellules marquées, le cytoplasme et le noyau fluorescent en vert

tandis que l'intensité de la fluorescence rouge sera proportionnelle au degré et au volume des compartiments acides, incluant les lysosomes et autophagolysosomes. Ces derniers sont caractéristiques de l'autophagie ou mort cellulaire de type II et donc induits lors de ce processus. Les phénomènes autophagiques seront donc caractérisés par une augmentation de la fluorescence rouge. Par contre, la perméabilisation des membranes des lysosomes est associée à une augmentation de la fluorescence verte cytoplasmique (Nylansted et coll., 2004).

En pratique, cette technique consiste à incuber, pendant 15 minutes, les cellules préalablement traitées ou non à diverses concentrations de Bal-6/7, avec 1 µg/ml d'acridine orange (Sigma) diluée dans du milieu de culture.

Après incubation, les cellules sont collectées par trypsinisation, puis remises en suspension dans du milieu de culture sans rouge de phénol pour analyse par cytométrie de flux dans les deux longueurs d'onde émises. L'acridine orange étant un colorant peu spécifique, car également utilisé pour la mise en évidence des acides nucléiques, nous avons utilisé d'autres techniques complémentaires comme l'immunofluorescence.

II.2.7 Dosage de l'ATP intracellulaire par bioluminescence.

Le test de vidéo-microscopie quantitative ayant montré une perturbation de la migration cellulaire, il nous a donc semblé important d'étudier l'activité de Bal-6/7 sur la [ATP] intracellulaire. Nous avons mesuré l'ATP intracellulaire en utilisant, un test de bioluminescence (Invitrogen, Merelbeke, Belgique). Les cellules NSCLC A549 et les glioblastomes U373 ont été cultivées en présence ou non de Bal-6/7 aux concentrations IC₇₅ (470 nM et 830 nM, respectivement) pendant 24 à 72h.

Pour effectuer ce type de dosage, on va mesurer la lumière émise par la réaction enzymatique de bioluminescence utilisant la luciférine et la luciférase, ainsi que de l'ATP. L'ATP intervient dans l'étape d'activation du complexe luciférase-luciférine, dont l'oxydation est à l'origine d'une émission lumineuse.



Le dosage de l'ATP repose sur la mesure de l'intensité de l'émission lumineuse (grâce à l'utilisation d'un luminomètre, TD-20/20, Promega) qui se produit dans un milieu mis

en présence de luciférine et de luciférase. Trois réplicats ont été réalisés par condition expérimentale pour chaque lignée cellulaire.

II.2.8 Mesure *in vitro* de l'inhibition de la pompe à sodium par spectrophotométrie.

Certains hétérosides comme les hétérosides cardiotoniques perturbent fortement la pompe à sodium (Na^+/K^+ -ATPase). Nous avons comparé dans notre étude, les effets de Bal-6/7, de l'ouabaïne, de la digitoxine et UNBS1450 sur la pompe à sodium. La pompe à sodium/potassium ou Na^+/K^+ -ATPase est une enzyme transmembranaire dont l'activité enzymatique utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP. La pompe à sodium appartient à la famille des ATPases de type P qui sont caractérisées par leur capacité à transporter des ions à travers la membrane en utilisant l'énergie de la dégradation d'un ATP. Sur le plan pratique la mesure de l'activité *in vitro* de la pompe à sodium peut se faire par spectrophotométrie en utilisant l'enzyme extraite du cortex cérébral porcine et disponible sur le marché (Sigma).

La dégradation de l'ATP va générer du phosphate qui va interagir avec le biolumogreen[®] par une réaction de coloration. L'intensité de cette coloration, mesurée au spectrophotomètre est proportionnelle à la quantité de phosphate dans le milieu. Une diminution de la coloration verte indique un effet inhibiteur sur la pompe à sodium.

II.2.9 Evaluation de la production de ROS par cytométrie de flux.

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), a été caractérisée en utilisant comme réactif la 2', 7' - dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCFH-DA; Fluka-Sigma, Bornem, Belgique). Après le traitement des cellules A549 et U373 avec des concentrations de Bal-6/7 IC_{75} (470nM et 830nM, respectivement) pendant 24-72h, elles sont marquées pendant 1h avec DCFH-DA (20 μM) dans le milieu de culture RPMI 1640 sans rouge de phénol. Le groupe acetoxyméthyl de la DCFH-DA est hydrolysé par des estérases non spécifiques dans la cellule, ayant pour résultat une molécule chargée non fluorescente qui ne traverse pas la membrane des cellules. Les ROS intracellulaires oxydent irréversiblement la DCFH en dichlorofluorescéine (DCF), qui est un composé fluorescent. Différents points de mesure ont été établis par un cytomètre de flux de type Becton Dickinson FACScan (excitation 488 nm/émission 535 nm), traduisant la quantité de ROS produite en fonction de la fluorescence émise. Chaque condition expérimentale a été évaluée en triplicat. Des cellules humaines de

cancer du sein MCF-7 non traitées ou traitées avec du H₂O₂ (4 mM pendant 1h), ont été employées comme contrôle positif de l'expérience.

II.3 Mesure de l'activité antitumorale *in vivo*.

Pour établir le profil pharmacologique d'une substance ayant un potentiel antitumoral, il est essentiel de compléter les données des expériences *in vitro* par une approche *in vivo* (Darro et coll. 2005).

II.3.1. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT).

Elle est déterminée sur des souris saines et correspond à la dose de substance active, immédiatement en dessous de celle qui entraîne des effets indésirables irréversibles chez 50% des animaux traités. Elle est dite aiguë quand elle est déterminée après une administration unique et chronique après des administrations répétées.

II.3.2 Evaluation de l'activité anti-tumorale *in vivo* sur le modèle de la leucémie murine L1210.

Le modèle de la leucémie murine L1210 est obtenu par inoculation d'environ 10⁶ cellules dans la cavité péritonéale de la souris. Sans traitement, ces animaux mourront 12 à 16 jours après la greffe (Darro et coll. 2005).

Les cellules sont maintenues en laboratoire par des transplantations tous les 10 à 12 jours de 10⁶ cellules dans des souris femelles B6D2F1 âgées de 5 à 6 semaines (Darro et coll. 2005).

Le paramètre mesuré est l'index T/C (cet index correspond au taux de survie du groupe de souris traitées par rapport à un groupe de souris contrôles) (Darro et coll. 2005).

L'évaluation classique de l'effet anti-tumoral d'une substance sur le modèle de la leucémie murine consiste en l'administration intra-péritonéale de cette substance à quatre doses, DMT/2, DMT/4, DMT/8 et DMT/16 (Darro et coll. 2005). Le protocole expérimental comprend au total huit administrations par voie intrapéritonéale, à raison d'une injection journalière, de J1 à J4 et de J8 à J11 post-greffe (J0 étant le premier jour de la greffe tumorale) (Darro et coll. 2005).

Les animaux sont maintenus dans des cages en plastique, gardées dans une logette maintenue à température contrôlée (22 ±2°C), éclairée (de 06h à 18h) et dont l'humidité relative varie de 40 à 70%. L'eau et l'alimentation sont fournies à volonté.

RESULTATS

I. Etude de l'activité nématocide *in vitro*.

Pour caractériser l'activité nématocide des extraits des amandes de *Balanites aegyptiaca*, nous avons tout d'abord mis au point un test d'évaluation de l'activité toxique sur *C. elegans*. En effet, les tests décrits dans la littérature (Simpkin et Coles 1981; Athanasiadou et coll. 2000; Fonseca-Salamanca et coll. 2003) attribuent une cotation selon la proportion de la population de nématodes traités que l'expérimentateur considère comme morts parce qu'immobiles après stimulation à l'aide d'une aiguille. Sachant que la paralysie induite par certains anthelminthiques (pyrantel, pipérazine, ivermectine) peut être transitoire, il nous a semblé que la marge d'erreur de ces tests pouvait être assez élevée. En outre, le nombre de vers par condition expérimentale 10 à 20 (contre 250 à 300 pour le nouveau test que nous avons mis au point) rend difficile l'interprétation statistique des résultats. Tenant compte des limitations des tests existants, nous avons entrepris la mise au point d'une nouvelle technique. Ce nouveau test est basé sur le traitement des vers par la 5(6)- carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) (qui rend les vers morts sélectivement fluorescents), comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes.

I.1 Validation d'un test *in vitro* d'évaluation d'activité nématocide.

Pour la validation de ce test, nous avons mesuré certains paramètres comme la sélectivité (**Figure 32**), la linéarité (**Tableau 9**), l'exactitude (**Tableau 10**), la précision (**Tableau 11**) du nouveau test. La validation pharmacologique a consisté en la détermination de l'activité nématocide d'anthelminthiques couramment utilisé (**Tableau 12**).

La sélectivité du test a été évaluée en traitant, comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, deux suspensions de vers, l'une constituée presque exclusivement de vers vivants et l'autre de vers préalablement tués (après un traitement par H₂O₂ 30% et exposition aux UV pendant 1 heure, (Gnoula et coll. 2007a).

Nous avons constaté, comme le montre la **Figure 32** (qui est une superposition d'images en contraste de phases de la suspension de vers vivants et en fluorescence de la suspension de vers morts), que le traitement de *C. elegans* avec la CFDA (les vers sont incubés en présence d'une solution de CFDA 4.2% à température ambiante et à

l'abris de la lumière, pendant 30 minutes) permet la distinction entre vers morts et vivants.

Nous avons ensuite évalué, la capacité du nouveau test à déterminer la proportion de vers morts dans une suspension constituée de vers morts et de vers vivants. Pour ce faire, nous avons déterminé la linéarité, l'exactitude et la précision de notre test. Les **Tableaux 9, 10 et 11** reprennent les résultats de ces tests. Enfin, nous avons procédé à la validation pharmacologique du test en déterminant l'activité d'anthelminthiques de référence sur notre modèle biologique. Ces résultats sont présentés dans le **Tableau 12**. Des anthelminthiques testés, le lévamisole avec 96.4% \pm 1.3 de morts à la dose de 10 μ g/ml est le plus toxique alors que le pyrantel, qui appartient à la même famille chimique (tétrahydropyrimidines) est moyennement toxique (53.4% \pm 1.3 à 100 μ g/ml). Les anthelminthiques de la famille des benzimidazoles sont également très toxiques sur *C. elegans*. En effet, testé à la dose de 10 μ g/ml, le mébendazole et le thiabendazole ont provoqué respectivement la mort de 89.9 \pm 1.3 et de 82.5% \pm 1.3 des vers traités. La pipérazine et le niclosamide sont les moins toxiques avec respectivement 15.5 \pm 1.3 et 17.5% \pm 1.3 de vers morts à la dose de 100 μ g/ml.

| Composés testés | Dose (μ g/ml) | % de vers morts après 7 jours d'incubation (Moyenne de 2 mesures; RSD: 1.3 %) |
|-----------------|--------------------|--|
| Contrôle | ---- | 2.4 |
| Mébendazole | 1 | 24.1 |
| | 10 | 89.9 |
| Thiabendazole | 5 | 58.5 |
| | 10 | 82.5 |
| Lévamisole | 5 | 74.5 |
| | 10 | 96.4 |
| Pipérazine | 50 | 13.1 |
| | 100 | 15.5 |
| Niclosamide | 50 | 15.7 |
| | 100 | 17.5 |
| Pyrantel | 50 | 41.0 |
| | 100 | 53.4 |

Tableau 12: Effets de divers anthelminthiques de référence sur *Caenorhabditis elegans*

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue scientifique *Talanta* (2007) 71: 1886-92 (voir annexe 1).

I.2 Criblage bio-guidé des amandes de *Balanites aegyptiaca*.

Pour la caractérisation de l'activité nématocide des amandes de *Balanites aegyptiaca*, puis le fractionnement, l'isolement et la purification de(s) agent(s) nématocide(s), nous avons adopté la stratégie du fractionnement bio-guidé (**Figure 33**). Nous avons évalué sur *C. elegans* l'activité toxique de plusieurs extraits obtenus par épuisement successif de la poudre d'amande de *Balanites aegyptiaca* avec des solvants de polarité croissante, puis fractionné l'extrait le plus toxique (**Figure 33**). L'activité nématocide des fractions obtenues a été évaluée, suite à quoi la fraction la plus toxique pour *C. elegans* a été purifiée.

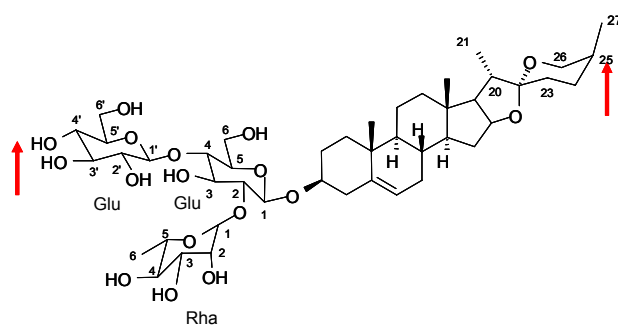
La toxicité des différents extraits obtenus par épuisement successif de la poudre d'amandes de *Balanites aegyptiaca*, a été évaluée sur *C. elegans*. Les extraits aqueux et méthanoliques sont les plus toxiques. Toutefois, l'extrait aqueux ($IC_{50} = 1.0$ mg/ml) est beaucoup plus toxique sur *C. elegans* que l'extrait méthanolique ($IC_{50} = 25.3$ mg/ml) (**Tableau 13**).

Cet extrait aqueux a ensuite, été fractionné par chromatographie sur colonne et les fractions contenant des produits de rapport frontal (R_f) = 0.4 ont été regroupées dans la fraction F4. Le **Tableau 14** qui récapitule l'activité toxique de ces différentes fractions montre que la fraction F4 (IC_{50} : la concentration qui provoque la mort de 50% de la population larvaire) = 110 μ g/ml) est la fraction la plus toxique. Cette fraction a ensuite été purifiée par chromatographie par contre-courant. Nous avons obtenu un produit pur et différentes fractions contenant divers autres produits. Le produit pur obtenu a montré une activité nématocide très élevée ($IC_{50} = 0.1$ μ g/ml, exprimée en équivalent d'extrait aqueux).

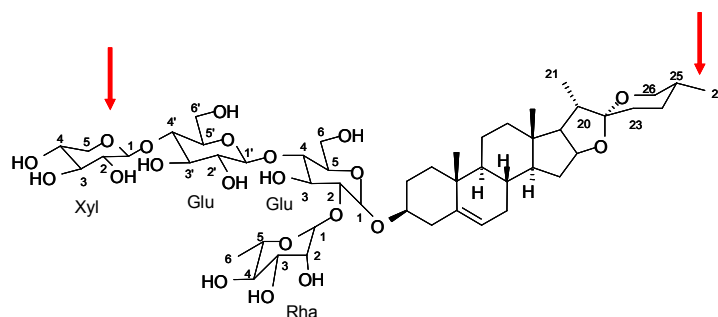
L'activité toxique de ce produit a été testée selon le protocole standard défini dans le chapitre Matériel et Méthodes (c'est-à-dire sur des larves L3 pendant 7 jours) et selon un protocole modifié également décrit dans le Matériel et Méthodes (c'est-à-dire sur des vers adultes pendant 7 heures). Les résultats qui sont répertoriés dans le **Tableau 15** montrent que le produit isolé développe une activité toxique plus élevée sur les vers adultes que sur les stades larvaires.

Pour l'identification et la détermination de la structure chimique de ce composé, nous avons comparé les déplacements chimiques (relevés par spectrométrie RMN) avec des données publiées dans la littérature. Le **Tableau 16** qui, récapitule ces données, montre que le produit isolé est la balanitine-7.

Sur base des résultats qui précèdent, nous avons émis l'hypothèse que, le principal agent nématocide présent au sein des amandes de *Balanites aegyptiaca* pourrait être la balanitine-7 (Bal-7), un hétéroside de la famille des diosgényle saponosides (**Figure 34**).



Balanitin-6



Balanitin-7

Figure 34: Structures chimiques de balanitine-6 et balanitine-7. Les flèches mettent en exergue les différences dans les structures de balanitine-6 et balanitine-7: la comparaison des structures des deux molécules montre l'absence de xylose dans la structure de balanitine-6 et en C26 un méthyle en position axiale pour balanitine-6 (Yamagénine) et équatoriale pour balanitine-7 (diosgénine).

Cette hypothèse repose sur le fait que :

- d'une part, cette famille de molécules est décrite comme possédant des propriétés anthelminthiques (Lacaille-Dubois et Wagner 1996; Hostettmann et coll. 2000),
- d'autre part la sous-fraction contenant Bal-7 était la plus toxique de celles provenant de la fraction active (c'est-à-dire la fraction ayant montré le plus d'activité toxique sur *C. elegans*).

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans la revue scientifique *International Journal of Pharmacology* (2007) 3(3) : 280-4 (voir annexe 2).

I.3. Détermination du profil d'activité de Bal-7.

Les anthelminthiques actuellement commercialisés peuvent être classés en trois grandes familles, les benzimidazoles, les imidazothiazoles et les lactones macrocycliques. Les benzimidazoles inhibent la formation des microtubules en se liant sélectivement aux β -tubulines alors que les imidazothiazoles, par un effet anti-acétylcholinestérase, induisent une paralysie des helminthes. Enfin, les lactones macrocycliques paralysent les muscles du pharynx des helminthes par hyperpolarisation des membranes cellulaires, induisant une incapacité du nématode à se nourrir.

Différentes expériences de mise en contact des anthelminthiques avec les nématodes gastro-intestinaux à différents stades de développement ont montré des variations du degré d'efficacité de ces composés (Kirsch et Schleich 1982).

Aussi, pour la détermination du profil d'activité de Bal-7, il a été testé à différents stades de développement de *C. elegans*. Des larves L3 ont été incubées pendant une semaine en présence de Bal-7 à différentes doses et les pourcentages de vers morts déterminés quotidiennement. Le **Tableau 15** présente les pourcentages cumulés de vers morts observés pendant la durée du test. De même, nous avons déterminé les pourcentages cumulés de vers morts observés après 7 heures d'incubation de vers adultes en présence de Bal-7 (**Tableau 15**).

Nous avons observé que Bal-7 est beaucoup plus toxique lorsqu'il est testé directement sur des vers adultes pendant 7 heures que lorsqu'il est incubé pendant une semaine avec des larves L3. En effet, les pourcentages cumulés de vers morts à la dose de 52 μ g/ml sont de 74.3% \pm 1.3 quand Bal-7 est incubé 7 jours avec des larves L3 et 97.6% \pm 1.3 quand la toxicité est évaluée sur des vers adultes pendant 7 heures.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des anthelminthiques de référence. Bal-7 est moins toxique que le lévamisole, le mébendazole et le thiabendazole, mais plus toxique que le pyrantel, la niclosamide et la pipérazine.

Enfin, nous avons évalué l'activité de Bal-7 sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase. En effet, de nombreux agents anthelminthiques (les imidazothiazoles) développent leur activité par inhibition de l'acétylcholinestérase. Ces inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont surtout actifs sur les vers adultes, or Bal-7 a montré une activité toxique plus élevée sur les vers adultes que sur les larves. Pour caractériser l'activité nématocide de Bal-7, nous avons évalué son activité anti-acétylcholinestérase. Nous n'avons observé aucune activité de Bal-7 sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (**Figure 35**). L'activité toxique de Bal-7 sur *C. elegans* ne semble pas être due à une inhibition de l'acétylcholinestérase.

II. Caractérisation de l'effet anti-tumoral de Bal-6/7.

Certains anthelminthiques comme les benzimidazoles, du fait de leur activité d'inhibition de la polymérisation des tubulines, présentent une activité anti-tumorale (Singh et Lown 2000; Ji et coll. 2001; Boiani et Gonzalez 2005; Nagy et coll. 2005). Le mébendazole a montré une forte activité cytotoxique sur A549 *in vitro* et les cellules du modèle de mélanome murin B16 (Ji et coll. 2001). Mais les études pré-cliniques ayant révélés une toxicité neurologique, cette molécule a été abandonnée. Une autre molécule de cette famille, l'albendazole a montré une activité prometteuse sur le cancer humain du colon-rectum (Nagy et coll. 2005).

Aussi, faisant suite à la mise en évidence de l'activité nématocide de Bal-7, nous avons entrepris de caractériser l'activité anti-tumorale de balanitines.

La méthode d'extraction que nous avons utilisé pour évaluer l'effet anti-tumoral de Bal-7 est distincte de celle que nous avons utilisé pour évaluer l'effet anthelminthique de cette balanitrine. Ainsi, alors que la méthode d'extraction que nous avons utilisée pour obtenir de la Bal-7 pour nos tests liés à l'activité anthelminthique semble avoir conduit à l'isolement de la balanitrine-7 pure, la méthode d'extraction que nous avons utilisée pour observer les effets anti-tumoraux potentiels de cette balanitrine-7 nous ont conduit à isoler un mélange de balanitrine-6 et de balanitrine-7 dans des proportions de 28/72%. Nous avons dénommé ce mélange Bal-6/7. La méthode que nous avons utilisée pour l'obtention de ce mélange Bal-6/7 est inspirée de celle de Pettit et coll 1991. Cette extraction a été réalisée sous la supervision du Dr. Laurent Ingrassia au sein de la société Unibioscreen SA. La **Figure 36** montre les chromatogrammes et spectres RMN qui ont permis l'identification et la détermination de la structure des différents composants de ce mélange Bal-6/7, ainsi que leurs structures chimiques. Du fait de la quasi-homologie de structure de ces composants (présence de xylose en plus chez balanitrine-7 par rapport à la balanitrine-6 et d'un groupement $-CH_3$ en position équatoriale chez la balanitrine-7 alors qu'il est en position axiale chez balanitrine-6), leur séparation est très difficile. Nous avons donc décidé de poursuivre nos investigations en utilisant ce mélange Bal-6/7, et ce sur les conseils du Professeur Robert Kiss.

Nous avons commencé nos investigations en évaluant l'effet de Bal-6/7 sur la croissance de diverses populations de cellules cancéreuses et nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes d'action liés à l'activité anti-tumorale de ce mélange Bal-6/7. La **Figure 37** reprend les différentes étapes de la démarche que nous avons adoptée pour la caractérisation de l'effet anti-tumoral *in vitro* de Bal-6/7.

II.1 Inhibition de la prolifération de six lignées cellulaires de cancer humain.

Les valeurs IC_{50} (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 de la molécule d'intérêt) et IC_{75} (voir la définition ci-dessus pour la définition de la valeur IC_{50}) déterminées pour Bal-6/7 et quatre substances cytotoxiques de référence utilisées comme agents anti-tumoraux pour le traitement de divers types de cancers (l'oxaliplatine (OXA), l'étoposide (VP16), la molécule SN38 qui est le métabolite actif de l'irinotecan et le taxol), obtenus sur six lignées cellulaires (A549, U373, PC-3, Bx-PC3, LoVo et MCF-7), sont indiquées dans le **Tableau 17**. Ces résultats indiquent que Bal-6/7 induit une activité anti-proliférative plus élevée que l'étoposide et l'oxaliplatine, bien que sensiblement moins actif que SN38 et moins que le taxol (en considérant l' IC_{50}). A la dose équivalente à l' IC_{75} , Bal-6/7 a montré une activité supérieure à celle de tous les composés testés. L'activité la plus élevée de Bal-6/7 a été observé sur les lignées cellulaires A549 (IC_{50} : 0.3 μ M) et U373 (IC_{50} : 0.5 μ M). Pour la suite de ce travail, la caractérisation de l'activité anti-tumorale *in vitro* de Bal-6/7 se fera sur ces deux lignées cellulaires.

II.2 Effets de Bal-6/7 sur la morphologie des cellules A549 et U373.

Les effets de Bal-6/7 sur la morphologie des cellules A549 et U373 ont été évalués par une technique dite de vidéo-microscopie quantitative qui consiste à incuber des cellules en présence de la substance dont on veut étudier l'effet, puis à les observer à l'aide d'un microscope à contraste de phase surmonté d'une caméra. Les cellules sont filmées pendant toute la durée de l'étude (72 heures) et des images sont prises toutes les 4 minutes. Chaque fois qu'une image est enregistrée, le logiciel intégré au système la numérise. Cette technique nous a permis de visualiser les effets de Bal-6/7 sur la prolifération des cellules tumorales A549 (cancer humain du poumon non-à-petites cellules) et U373 (glioblastome humain).

La **Figure 38A** illustre la morphologie des cellules A549 non traitées ($t = 0$ minute), en début d'acquisition des images numériques, alors que la **Figure 38B** illustre la situation 72h plus tard. Les **Figures 38C** et **38D** montrent des cellules A549 traitées avec Bal-6/7 à des doses correspondant à l' IC_{75} , à $t = 0$ minute (début de l'observation) et après 72h de traitement.

Les modifications morphologiques des cellules cancéreuses A549 consécutives au traitement avec Bal-6/7 sont compatibles avec des modifications de l'organisation du cytosquelette d'actine, un aspect que nous avons également étudié. Le film que nous avons réalisé à partir des images acquises indique clairement que Bal-6/7 n'induit pas un effet tensioactif, caractéristique principale de certaines saponosides (classe chimique à laquelle appartient Bal-6/7), car nous n'avons pas observé d'«explosion» des cellules.

Les **Figures 38E et 38H** montrent que les effets induits par Bal-6/7 sur les cellules cancéreuses U373 sont identiques à ceux décrits pour les cellules A549.

En conclusion de ces premières expériences nous pouvons donc retenir que le mélange Bal-6/7 inhibe fortement la prolifération des cellules cancéreuses A549 et U373 selon un processus que nous nous sommes intéressés de caractériser.

II.3 Détermination des effets de Bal-6/7 sur les paramètres de cinétique cellulaire et sur l'induction de la mort par apoptose dans les cellules cancéreuses A549 et U373.

La première approche expérimentale consiste à mesurer la fluorescence émise par des cellules mises en suspension et marquées à l'iodure de propidium, un puissant agent intercalant dont la fixation aux acides nucléiques est proportionnelle à la quantité de ceux-ci dans la cellule. L'intensité de la fluorescence émise étant proportionnelle à la quantité de matériel génétique, on pourra déterminer la distribution des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire. Ce test permet donc une analyse de l'évolution de la cinétique du cycle cellulaire.

L'étude de l'activité de Bal-6/7 sur la cinétique du cycle cellulaire est une étape importante de la caractérisation de l'activité anti-tumorale de Bal-6/7. En effet, certains agents anti-tumoraux développent leur activité anti-tumorale par blocage de la cinétique du cycle cellulaire, aboutissant à plus ou moins court terme à l'induction d'une mort cellulaire, le plus souvent de nature apoptotique.

Les **Figures 39A et 39B** montrent que Bal-6/7 ne modifie pas significativement les paramètres de cinétique cellulaire au sein des populations cellulaires A549 ou U373, c'est à dire la répartition de ces cellules cancéreuses au sein des phases G₀/G₁, S et G₂/M du cycle cellulaire, et ce même après un traitement à des concentrations aussi élevées que les valeurs d'IC₅₀ ou d'IC₇₅ pendant 72h. De même, Bal-6/7 à la concentration d'IC₅₀ n'induit ni d'apoptose précoce (cellules positives à l'annexine V mais négatives à l'iodure de propidium) ni d'apoptose à un stade avancé (cellules positives à l'annexine V et à l'iodure de propidium) dans les cellules cancéreuses A549 ou U373 à la différence de la doxorubicine (utilisé comme contrôle positif de la validité du test) au sein des cellules humaines du cancer du sein MCF-7 (**Figure 40**).

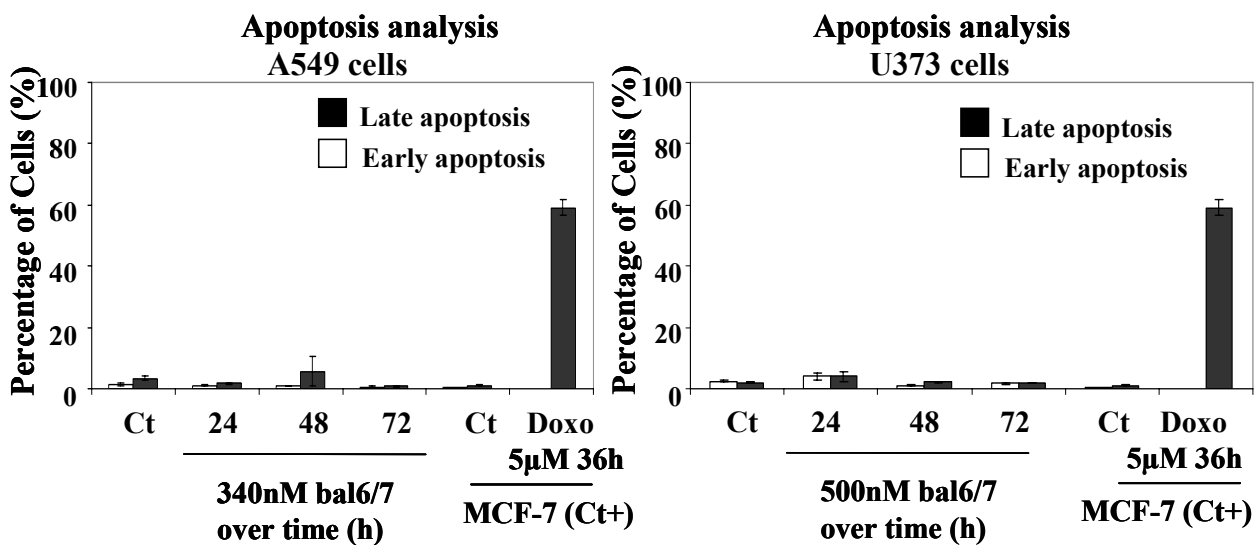


Figure 40 : Mesure par cytométrie en flux des effets de Bal-6/7 sur l'induction de la mort cellulaire par apoptose de cellules A549 et U373 après 24, 48 et 72h de traitement. Les barres ouvertes représentent le pourcentage des cellules en apoptose précoce tandis que les barres noires représentent la proportion de cellules en apoptose avancée. Les cellules humaines du cancer du sein MCF-7 ont été incubées pendant 36h en présence de doxorubicine 5µM, utilisée comme contrôle positif. Pour les contrôles négatifs, des cellules ont été incubées en présence du solvant seul. Chaque mesure a été effectuée en triplicat. Chacun des points du diagramme est une moyenne de ces mesures ± l'écart type.

II.4 Caractérisation de l'effet de Bal-6/7 sur l'accumulation de vésicules acides.

Les images acquises par vidéo-microscopie quantitative indiquent qu'un traitement des cellules cancéreuses A549 ou U373 par le mélange Bal-6/7 conduit à leur mort. Les premières investigations rapportées au § II.3 du chapitre Résultats, ont montré que Bal-6/7 n'induit pas de mort cellulaire par apoptose. Nous nous sommes dès lors demandé si ce mélange Bal-6/7 était susceptible d'induire une mort cellulaire par autophagie des cellules cancéreuses A549 et U373. Pour ce faire nous avons utilisé un marquage cellulaire faisant appel à l'acridine orange qui fluoresce en vert dans le cytoplasme et en rouge dans le noyau en milieu acide (vésicule acides). Ainsi, l'intensité de la fluorescence rouge est proportionnelle aux nombres et au volume d'organelles acides, en ce y compris principalement les vacuoles autophagiques. Le mélange Bal-6/7 induit une importante accumulation de ces vacuoles acides dans les cellules cancéreuses A549 (**Figure 41A**). En revanche, cet effet n'est pas observé dans les cellules cancéreuses U373 (**Figure 41B**).

Le marquage à l'acridine orange n'étant pas spécifique de la mort par autophagie, les résultats obtenus devraient être complétés par la détermination de l'effet du mélange Bal-6/7 sur le taux d'expression de protéines directement impliquées dans le processus autophagiques telles les protéines Beclin-1, et LC3-I et LC3-II. Il se peut également que le mélange Bal-6/7 induise une mort cellulaire par perméabilisation des membranes lysosomiales, plutôt que par autophagie. En effet, une augmentation du taux de marquage par l'acridine orange peut refléter aussi bien une mort par autophagie que par perméabilisation des membranes lysosomiales. Ce processus de perméabilisation des membranes lysosomiales est sous le contrôle de la protéine Hsp70.

II.5 Etude de l'effet de Bal-6/7 sur la perméabilisation lysosomiale au sein des cellules cancéreuses A549 et U373.

Les membranes des lysosomes des cellules cancéreuses sont stabilisées par une expression soutenue de la protéine Hsp70 (Nylandsted et coll. 2004). Plus cette protéine Hsp70 sera exprimée et plus les cellules cancéreuses seront protégées d'un effet de perméabilisation des membranes lysosomiales. La répression du taux d'expression de la protéine Hsp70 favorise une perméabilisation de la membrane des lysosomes entraînant une libération des enzymes lysosomiales (dont la cathepsine B) au sein du cytoplasme, avec pour conséquence immédiate une autodigestion (autolyse cellulaire) de la cellule. Ainsi une substance qui affecte l'expression de la protéine Hsp70 induira une mort cellulaire par perméabilisation de la membrane lysosomiale (LMP).

Les résultats obtenus par immunofluorescence montrent que le mélange Bal-6/7 n'affecte pas l'expression de la protéine Hsp70, et ce ni dans les cellules A549 (**Figure 42A**) ni dans les cellules U373 (**Figure 42B**).

Nous pensons dès lors que le processus autophagique que nous avons mis en évidence avec les résultats rapportés au § II.4 n'est peut être pas un processus de mort cellulaire mais bien un mécanisme de protection des cellules cancéreuses face aux effets cytotoxiques du mélange Bal-6/7. Ce point particulier est développé dans le chapitre Discussion.

II.6 Caractérisation des effets induits par le mélange Bal-6/7 sur la concentration intracellulaire d'ATP ($[ATP]_i$), sur la production intracellulaire de ROS ($[ROS]_i$) et sur l'activité de la pompe à sodium (la Na^+/K^+ -ATPase).

Plusieurs classes distinctes de produits naturels exercent leur activité cytotoxique par induction d'une déplétion de l' $[ATP]_i$ et d'une augmentation des $[ROS]_i$. Le mélange Bal-6/7 diminue de manière très nette le taux intracellulaire d'ATP au sein des cellules cancéreuses A549 (**Figure 43Aa**) et U373 (**Figure 43Ab**), à des concentrations correspondant à la dose d'IC₇₅. A cette même dose d'IC₇₅, le mélange Bal-6/7 n'induit pas d'augmentation de la production des réactifs [ROS] intracellulaires (**Figures 43Ba et 43Bb**), et ce à la différence du contrôle positif utilisé dans le cadre de nos expériences, à savoir des cellules de cancer humain du sein MCF-7 traitées avec H₂O₂.

Certains hétérosides cardiotoniques ainsi que certains anthelminthiques sont connus pour inhiber la pompe à sodium (Mijatovic et coll. 2007b). Cette inhibition affecte fortement la croissance cellulaire. Etant donné la structure hétérosidique de la balanitine-6 et de la balanitine-7, donc du mélange Bal-6/7, nous avons comparé l'effet de ce mélange Bal-6/7 sur le taux d'activité de la pompe à sodium à celui induit par des hétérosides cardiotoniques connus (**Figure 44**). L'utilisation d'un test colorimétrique (détaillé dans le chapitre Matériel & Méthodes) montre que le mélange Bal-6/7 n'inhibe pas l'activité de la pompe à sodium.

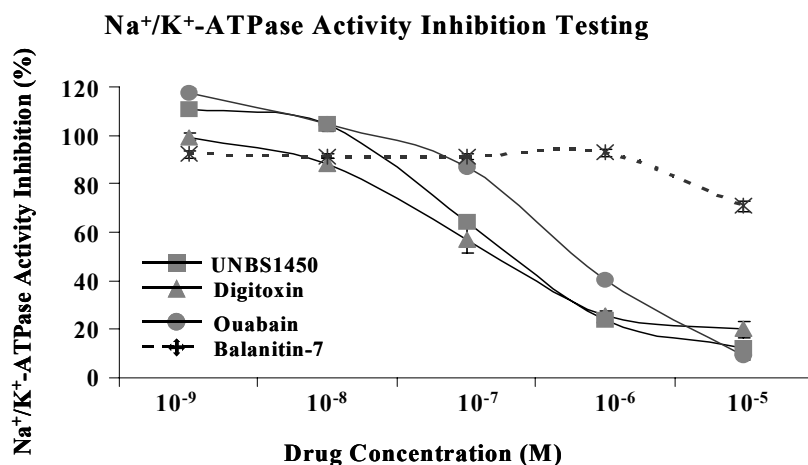


Figure 44: Effet de Bal-6/7 sur l'inhibition de la pompe à sodium. Les tirets pleins et symboles gris représentent la variation du pourcentage d'inhibition de la pompe à sodium en fonction de la concentration de divers hétérosides cardiotoniques (carré gris pour UNBS1450, triangle gris pour la digitoxine, ronds gris pour l'ouabaïne) et tirets brisés celle de Bal-6/7.

II.7 Réduction des effets cytotoxiques du mélange Bal-6/7 par apport exogène de sucres ou de glycine.

La déplétion de l'ATP intracellulaire au sein des cellules cancéreuses A549 et U373 suite au traitement par le mélange Bal-6/7 pourrait être la conséquence directe d'une glycolyse et/ou d'une protéolyse induite(s) par ce mélange Bal-6/7. En conséquence, les niveaux de $[ATP]_i$ pourraient être maintenus par un apport extérieur de sucres et/ou de glycine. Comme l'illustre la **Figure 45**, l'adjonction de D-glucose (**Figure 45A**), de L-fructose (**Figure 45B**) ou de glycine (**Figure 45C**) à des cultures de cellules cancéreuses A549 et U373, 24h avant le traitement avec le mélange Bal-6/7, réduit de manière significative ($p < 0.05$ à < 0.0001) les effets cytotoxiques de ce mélange Bal-6/7 tel qu'il a été évalué à l'aide du test colorimétrique MTT.

II.8 Le mélange Bal-6/7 induit une désorganisation majeure du cytosquelette d'actine au sein des cellules cancéreuses A549 et U373.

L'inhibition significative de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses A549 et U373, ainsi que leur déplétion en ATP intracellulaire, observée suite au traitement avec le mélange Bal-6/7, suggère que les effets du mélange puissent être liés, au moins en partie, par la désorganisation du cytosquelette d'actine. Les résultats obtenus par la microscopie à fluorescence et présentés à la **Figure 46**, montrent que le mélange Bal-6/7 induit rapidement une désorganisation majeure du cytosquelette d'actine au sein des cellules cancéreuses A549 (**Figure 46A**) et U373 (**Figure 46B**), et ce à la concentration IC_{75} .

Rappelons que les filaments d'actine participent à la rigidité cellulaire, à la motilité cellulaire et à la formation des fuseaux mitotiques. De ce fait la désorganisation et la destruction du cytosquelette d'actine induites par le mélange Bal-6/7 au sein des cellules cancéreuses A549 et U373 se traduit par une adynamie des membranes cellulaires, une réduction de la motilité et de la prolifération cellulaire. Toutes ces observations corroborent parfaitement celles obtenues auparavant en ayant fait appel à la vidéo-microscopie quantitative.

II.9 Effets anti-tumoraux *in vivo* de Bal-6/7.

Les effets anti-tumoraux *in vivo* du mélange Bal-6/7 ont été étudiés sur un modèle de criblage primaire, le modèle de leucémie murine L1210 (Darro et coll. 2005) à trois doses différentes: 5, 2.5 et 1.25mg/kg, administrée de manière chronique par voie intra-péritonéale. Ces doses correspondent respectivement à la moitié, au quart et au huitième de de la dose maximale tolérée (MTD : 10 mg/kg chez la souris saine). Le mélange Bal-6/7 a modestement mais significativement ($p = 0.01-0.03$) accru la survie des souris leucémiques L1210 à chacune des trois doses évaluées (**Figure 47**). Nous n'avons pas décelé d'effets dose-dépendants. Les effets anti-tumoraux *in vivo* observés ici avec le mélange Bal-6/7 sont du même ordre de grandeur que ceux observés avec la vincristine dans ce modèle (Darro et coll. 2005).

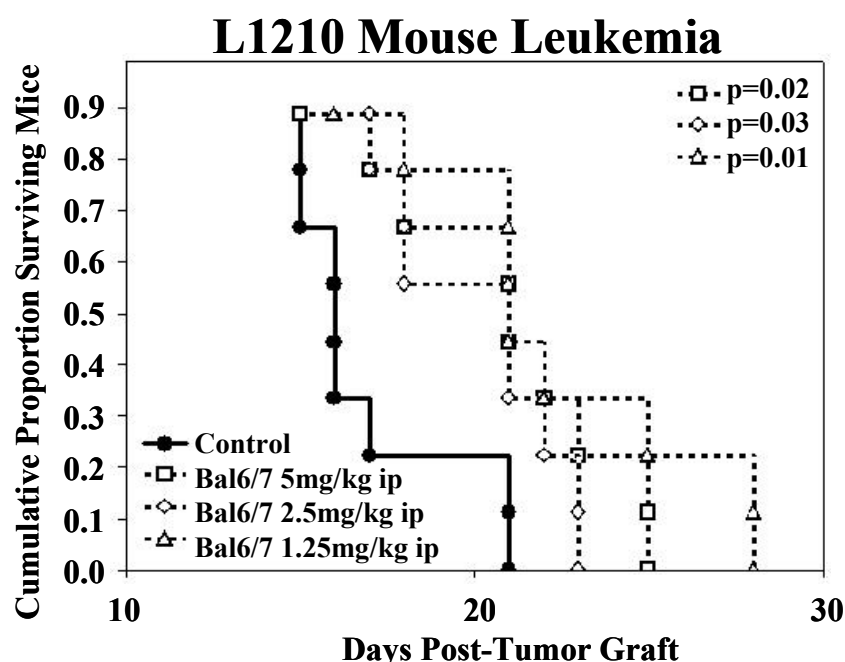


Figure 47: Effet antitumoral *in vivo* de Bal-6/7 sur le modèle de leucémie murine L1210. Bal-6/7 a été évalué aux doses de 5mg/kg (tirets brisés et carrés transparents), 2.5mg/kg (tirets brisés et losanges transparents), 1.25 mg/kg (tirets brisés et triangles transparents) administrées par voie intrapéritonéale 4 fois par semaine pendant 2 semaines consécutives (jours 1-4 et 8-11), avec le traitement commençant le jour suivant la greffe des cellules L1210 aux souris (jour 0). Il y avait 9 souris par groupe expérimental. Les souris du groupe contrôle (tirets pleins et cercles noirs) ont reçu le véhicule seulement. Le présent graphique montre les proportions cumulées décroissantes de souris survivantes dans chaque groupe (Kaplan-Meier survival analysis).

DISCUSSION

Notre étude a pour but d'analyser le potentiel thérapeutique des amandes de *Balanites aegyptiaca*, plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle africaine. Nous avons ainsi entrepris de mettre en évidence d'une part l'activité nématocide des extraits d'amandes de *Balanites aegyptiaca*, utilisé comme anthelminthique en médecine traditionnelle au Burkina Faso, d'isoler le(s) principe(s) responsable(s) de cette activité et d'en caractériser le mécanisme d'action. D'autre part, nous avons entrepris la caractérisation du pouvoir anti-tumoral des extraits des amandes de *Balanites aegyptiaca*.

Il est intéressant de noter que plusieurs familles de substances impliquées dans diverses activités biologiques ont été isolées de *Balanites aegyptiaca*. Il s'agit d'alcaloïdes, de coumarines, de flavonoïdes et de saponosides. Plusieurs saponosides: la balanitoside, la balagyptine, les balanines (B1 et B2), les balanitines (de 1 à 7) et la 6-méthyldiosgénine ont été isolées de cette plante.

Les saponosides, familles de substances à laquelle appartiennent les balanitines, sont largement distribués dans les plantes (Sparg et coll. 2004). Ce sont leurs propriétés tensioactives qui les distinguent des autres composés glycosides (Hostettmann et coll. 2000). Ils se dissolvent aisément dans l'eau pour former des solutions colloïdales moussantes. Les saponosides sont connus pour la diversité de leurs propriétés biologiques. La plupart sont hémolytiques et sont toxiques pour les animaux à sang froid (la digitonoside, la tigonoside sont aussi toxiques pour l'homme), alors que certains saponosides montrent également une activité molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, anti-bactérienne/anti-microbienne, antiparasitaire et antivirale (Lacaille-Dubois et Wagner 1996). Plusieurs travaux ont montré que de nombreux saponosides présentent de fortes propriétés cytotoxiques (Pettit et coll. 1991; Lacaille-Dubois et Wagner 1996; Hostettmann et coll. 2000), molluscicides et nématocides (Ibrahim 1992; Lacaille-Dubois et Wagner 1996; Koko et coll. 2000; Sparg et coll. 2004).

Les saponosides peuvent agir en tant qu'agents anti-cancéreux potentiels en empêchant la carcinogenèse ou par des effets anti-prolifératifs et/ou cytotoxiques directs contre des cellules cancéreuses tant *in vitro* qu' *in vivo* (Pettit et coll. 1991; Lacaille-Dubois et Wagner 1996).

I. Caractérisation de l'effet nématocide de Bal-7.

En entreprenant un travail de recherche afin d'identifier les principes actifs d'une plante, il est totalement illusoire de prétendre isoler tous les constituants de cette plante ou ne fut-ce que d'une partie de la plante. Parmi les centaines ou les milliers de différentes substances, une ou plusieurs sont responsables de l'activité thérapeutique (ou de l'activité toxique selon les cas) (Hostettmann et coll. 2000). Il est donc nécessaire de disposer d'essais biologiques ou pharmacologiques relativement simples afin de caractériser l'activité des extraits ou des fractions résultant des différentes étapes de purification qui mèneront à l'isolement de constituants actifs purs (Hostettmann et coll. 2000). Ces essais doivent être très sensibles parce que les substances actives peuvent être présentes dans la plante à de très faibles concentrations (Hostettmann et coll. 2000).

Dans le cas de la recherche d'un composé doté d'une activité antiparasitaire, le meilleur test serait celui qui permettrait d'évaluer l'activité de la substance à étudier sur le parasite cible directement chez son hôte normal. Mais ceci nécessite des essais expérimentaux *in vivo*, et par conséquent de grandes quantités de produit et un élevage d'animaux, ce qui devient trop onéreux pour un processus de screening primaire.

Une autre approche consiste à utiliser des modèles de nématodes parasites pour le développement de tests *in vitro*. Les modèles parasites les plus couramment utilisés sont *Trichostrongylus colubriformis* (parasite du mouton), *Graphidium strigosum* (parasite du lapin), *Heligmosomoïdes polygyrus* (parasite de rongeurs), *Haemonchus contortus* (parasite du mouton et de la chèvre) et *Teladorsagia circumcincta* (parasite de petits ruminants), dont le maintien en laboratoire nécessite cependant l'entretien du cycle par des infestations expérimentales d'animaux (Mansir 1998; Elard 1999).

L'utilisation de *C. elegans*, un nématode libre proche d'*Ascaris suum* constitue une alternative intéressante (Burglin et coll. 1998; Geary et Thompson 2001). En effet, les connaissances acquises sur la biologie et le génome de ce nématode permettent de caractériser avec précision l'effet des substances testées (Burglin et coll. 1998). C'est donc ce modèle que nous avons utilisé pour la mise au point d'un nouveau test nématocide.

Plusieurs types de tests pharmacologiques sont décrits pour la mise en évidence de substances anthelminthiques. Il s'agit entre autre du :

- test d'inhibition du développement larvaire qui mesure la capacité d'une substance à inhiber le développement larvaire (Athanasiadou et coll. 2000). Ce test consiste en un dénombrement au microscope des différents stades larvaires, après la mise en contact pendant

7 jours, de la substance à étudier avec des larves de premier stade (Athanasidou et coll. 2000);

- test d'inhibition de la migration larvaire qui détermine la capacité d'une substance à inhiber la migration de larves de troisième stade à travers de fines mailles de 70 μm (Athanasidou et coll. 2000). Ces larves sont incubées avec la substance à tester à diverses concentrations à 37°C pendant 2 heures (Athanasidou et coll. 2000). On dénombre ensuite, au microscope le nombre de larves retenues par les mailles (Ld) et celles qui ont migré (Lm), puis on détermine le pourcentage d'inhibition de la migration larvaire (LMI), avec $\%LMI = Lm/(Lm + Ld) \times 100$ (Athanasidou et coll. 2000);

- test d'inhibition de la nutrition larvaire qui mesure l'effet d'une substance sur la fonction de nutrition des larves de premier stade. Des larves de premier stade, sont incubées avec la substance à tester pendant 2 heures à 22°C et nourries pendant 8 heures avec un lyophilisat de *Escherichia coli*, rendu fluorescent par un traitement à la fluorescéine-5-isothiocyanate, puis le nombre de vers ayant conservé leur fonction de nutrition est, déterminé après observation de leur tube digestif en microscopie de fluorescence, à la recherche de nutriments fluorescents (Athanasidou et coll. 2000).

- test d'éclosion des œufs qui mesure la capacité d'une substance à inhiber l'éclosion des œufs d'helminthes. On incube à 22°C, un nombre connu d'œufs embryonnés avec la substance à tester pendant 24 heures, puis on dénombre les larves issues de l'éclosion des œufs incubés (Athanasidou et coll. 2000). On peut alors déterminer le pourcentage d'œufs éclos.

- test de mobilité/viabilité qui évalue la toxicité d'une substance sur un nématode parasite ou non. Ce test est dénommé test d'efficacité nématocide. Il consiste à incuber une suspension de vers avec la substance à tester pendant un temps donné, puis à attribuer une cotation selon la proportion de la population de nématodes traités que l'expérimentateur considère comme morts parce qu'immobiles après stimulation à l'aide d'une aiguille (Simpkin et Coles 1981; Athanasidou et coll. 2000; Fonseca-Salamanca et coll. 2003).

Pour la mise en évidence de l'activité nématocide des amandes de *Balanites aegyptiaca* et le criblage des fractions, nous avons développé un nouveau test qui est une amélioration du test de mobilité/viabilité. Sachant que la paralysie induite par certains anthelminthiques (pyrantel, pipérazine, ivermectine) peut être transitoire, il nous a semblé que la marge d'erreur du test «standard» tel que décrit ci-dessus pouvait être assez élevée. D'autre part, le nombre de vers par condition expérimentale 10 à 20 contre 250 à 300 dans notre test, rend difficile l'interprétation statistique des résultats. Ce nouveau test, dont la mise au point est simple (il

n'est pas nécessaire de stimuler les vers sous le microscope à l'aide d'une aiguille), permet de distinguer les substances qui induisent une paralysie, même transitoire, de celles qui sont létales pour *C. elegans*. La synchronisation de la culture permet de tester la substance étudiée sur une population quasi homogène car les larves ou vers adultes dans la suspension de nématodes utilisée sont presque tous au même stade de développement. Ceci permet de déterminer le stade de développement du vers qui est le plus sensible à la substance étudiée.

L'utilisation de la CFDA a permis, la mise au point d'un test biologique original et efficace pour le criblage de nouvelles substances anthelminthiques. La mise au point de ce nouveau test a été complétée par une validation pharmacologique. Pour rappel, la validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée (Balls et coll. 1995). Nous avons donc pu utiliser un test fiable, permettant la détection de plusieurs niveaux d'activité nématocide. Ce nouveau test peut également être utilisé dans d'autres applications, comme par exemple, l'évaluation de risques écologiques. En effet, l'exposition croissante de l'environnement à un très grand nombre de produits chimiques a affecté des organismes dans de nombreux écosystèmes (Kazuhiro et coll. 2002). Par conséquent, la nécessité de développer des systèmes d'essai biologique, utilisant particulièrement des invertébrés terrestres, est acceptée et encouragée par l'OCDE (Organisation de la Coopération Economique et du Développement) et l'APE (Agence de Protection de l'Environnement) (Kazuhiro et coll. 2002). Le nouveau test que nous avons mis au point dans le cadre de notre thèse de doctorat utilisant comme organisme modèle *C. elegans*, un nématode libre vivant dans les sols des pays tempérés, permettrait la mise en évidence des effets toxiques de composés chimiques, dont des xénobiotiques environnementaux. La détermination des concentrations létales, telles que les concentrations létales 50% (LC₅₀) constitue en effet, une première étape de l'évaluation des risques écologiques de produits chimiques synthétiques et naturels (métaux lourds par exemple) (Kazuhiro et coll. 2002).

L'utilisation de ce nouveau test pourrait aussi être envisagée pour la classification de nouvelles molécules anthelminthiques et pour la détection de résistances à de nouvelles molécules anthelminthiques. Le décryptage du génome de *C. elegans* a permis l'obtention de mutants. Ainsi par exemple, Driscoll et coll., en 1992 a obtenu, par mutation de ben-1III (le gène codant la synthèse de la β -tubuline), des mutants de *C. elegans* résistants aux benzimidazoles (Driscoll et coll. 1989). Il serait donc intéressant de tester les nouvelles molécules nématocides, présentant un intérêt thérapeutique, sur différents mutants résistants aux anthelminthiques connus afin de mieux définir la place de ces nouvelles molécules dans

l'arsenal thérapeutique disponible. D'autre part, l'utilisation de mutants pour caractériser la résistance aux nouveaux anthelminthiques permettrait de surveiller l'apparition de résistances et, mieux, de les caractériser et peut être de les circonscrire. Il convient cependant de nuancer le rôle que peut jouer *C. elegans* dans la recherche de nouveaux composés nématocides et surtout dans l'étude de leurs modes d'action. Les différences observées entre les métabolismes des formes libres et des formes parasites sont des éléments importants dont il faudra tenir compte (Barr 2003). Ainsi, une espèce comme *C. elegans* ne permet pas de tenir compte des changements métaboliques qui peuvent se produire lors du passage des formes juvéniles libres aux formes adultes virulentes chez les nématodes parasites (Barr 2003). Des degrés importants de similitude peuvent néanmoins être observés entre les formes libres, *C. elegans* et les formes parasites (Kwa et coll. 1995). *C. elegans* peut également être utilisé pour l'étude du mode d'action de molécules d'intérêt thérapeutique, à condition que celles-ci ciblent des structures physiologiques et/ou des protéines relativement bien conservées au sein de l'évolution des nématodes (Kwa et coll. 1995).

Le microscope à fluorescence mis à part, le développement de ce test ne nécessite pas d'équipements particuliers. *C. elegans* peut en effet être cultivé tout système permettant l'incubation du nématode à 20°C, la température optimale de culture. La culture du nématode et le développement du test peuvent donc être envisagés dans les pays en voie de développement, où les parasitoses sont endémiques. Ceci pourrait permettre de stimuler et de dynamiser la recherche de nouveaux médicaments anthelminthiques dans les pays du tiers monde en général et en Afrique en particulier.

En recherchant les métabolites actifs d'une plante, le criblage biologique suivi du fractionnement bio-guidé est devenu un procédé standard (Hostettmann et coll. 2000). Toutefois, les essais biologiques ne sont pas toujours prédictifs de l'efficacité clinique et la stratégie du fractionnement bio-guidé mène fréquemment à l'isolement de métabolites connus (Hostettmann et coll. 2000). Nous avons néanmoins choisi d'utiliser cette stratégie, notre objectif étant d'apporter des arguments scientifiques en faveur ou non de la validation d'une recette proposée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour le traitement des helminthiases intestinales, et non pas nécessairement l'identification de nouvelles molécules.

Les nématodes parasites affectent les animaux et l'homme, causant des maladies aux conséquences parfois dramatiques et accroissant la pauvreté dans les pays en développement (Martin 1997). Les anthelminthiques, employés pour traiter et contrôler ces affections, induisent des effets toxiques plus ou moins sélectifs sur ces parasites (Martin 1997). Le **Tableau 1** propose une classification des anthelminthiques courants selon leur mécanisme

d'action et leurs cibles parasites.

L'utilisation intensive de ces composés a entraîné l'apparition de résistances aux anthelminthiques dont la fréquence a augmenté ces dernières années (Martin 1997). Si la résistance à un anthelminthique particulier se produit, il est probable que d'autres anthelminthiques avec le même mécanisme d'action seront également inefficaces (Martin 1997). Par contre des anthelminthiques avec un mécanisme d'action différent pourraient être efficaces (Martin 1997). D'où la nécessité de rechercher des molécules anthelminthiques, pas nécessairement nouvelles, mais dont le mécanisme d'action serait original et différent de ceux des anthelminthiques courants qui sont de moins en moins efficaces du fait de l'apparition de résistance.

Plusieurs plantes, dont *Balanites aegyptiaca*, sont utilisées en médecine traditionnelle africaine comme anthelminthique dans le traitement des parasitoses intestinales ou molluscicides dans la lutte anti-vectorielle (Creach 1940; Ibrahim 1992; Pal et Tandon 1998; Mohamed et Eltahir 1999 ; Koko et coll. 2000). En effet, plusieurs parties de cette plante (les racines, les amandes, les fruits et les rameaux) sont utilisées et ont montré une activité létale sur le vecteur de *Schistosoma*, (notamment *Biomphalaria glabrata* pour *Schistosoma mansoni*), les miracidies et les cercaires de *Schistosoma mansoni*.

De nombreuses espèces végétales ont été décrites comme possédant une activité antiparasitaire, aussi bien contre les parasites humains qu'animaux (Creach 1940; Ibrahim 1992; Pal et Tandon 1998; Mohamed et Eltahir 1999; Hostettmann et coll. 2000; Koko et coll. 2000; Onyeyili et coll. 2001; Diehl et coll. 2004; Fennell et coll. 2004; Beloin et coll. 2005).

Les propriétés anthelminthique et ichtyotoxique des amandes de *Balanites aegyptiaca* (Creach 1940; Ibrahim 1992; Pal et Tandon 1998; Mohamed et Eltahir 1999; Hostettmann et coll. 2000; Koko et coll. 2000; Onyeyili et coll. 2001; Diehl et coll. 2004; Fennell et coll. 2004; Beloin et coll. 2005) pourraient être attribuées aux saponosides (Lacaille-Dubois et Wagner 1996).

La présente étude a permis d'isoler la Bal-7 comme principal agent nématocide des amandes de *Balanites aegyptiaca*. Il s'agit d'une diosgényl saponoside, confirmant ainsi les hypothèses émises sur le rôle des saponosides dans le développement des activités nématocides et molluscicides des amandes de *Balanites aegyptiaca* (Creach 1940; Ibrahim 1992; Pal et Tandon 1998; Mohamed et Eltahir 1999; Hostettmann et coll. 2000; Koko et coll. 2000; Onyeyili et coll. 2001; Diehl et coll. 2004; Fennell et coll. 2004; Beloin et coll. 2005).

Les anthelminthiques courants peuvent être classés en trois grandes familles, les benzimidazoles, les imidazothiazoles et les lactones macrocycliques. Les benzimidazoles

inhibent la polymérisation des β -tubulines, les imidazothiazoles induisent une paralysie des helminthes par un effet anti-acétylcholinestérasique et les lactones macrocycliques paralysent les muscles du pharynx des helminthes.

Bal-7 est plus toxique que le pyrantel et la pipérazine sur *C. elegans*, mais moins que le mébendazole et le thiabendazole.

Il ressort de la caractérisation de l'activité nématocide de Bal-7 qu'elle est plus toxique sur les vers adultes que sur les larves. Or, pour *C. elegans* il n'existe pas de stades larvaires au sens zoologique mais de stades juvéniles car, après l'éclosion des œufs, les jeunes individus libérés possèdent déjà toutes les structures que l'on va retrouver chez les individus adultes, sauf certaines parties de l'appareil reproducteur (Barr 2003). La différence d'activité observée, selon le stade de développement, aurait pu signifier que Bal-7 cible la fonction de reproduction de *C. elegans*. Mais la durée de l'étude (7 heures) exclut une telle hypothèse.

Par rapport à la galanthamine, notre composé n'exerce qu'une inhibition très modeste de l'acétylcholinestérase. Les doses testées étant nettement supérieures aux doses qui induisent un effet nématocide sur *C. elegans*, nous pouvons donc conclure que cet effet ne passe vraisemblablement pas par une inhibition de cette enzyme. Il est évidemment possible que *C. elegans* et/ou les vers parasites présentent une enzyme différente de celle testée ici, pour laquelle notre composé montrerait un tropisme particulier. Une étude récente basée sur la comparaison de séquences primaires et tertiaires de différentes acétylcholinestérases montre cependant qu'il s'agit d'enzymes extrêmement conservées d'un point de vue évolutionnaire, ce qui pose des difficultés, par exemple lorsqu'il s'agit de mettre en évidence des inhibiteurs spécifiques pour une espèce donnée (moustiques, parasites).

Bal-7 n'a montré aucune activité *in vitro* sur l'acétylcholinestérase, ce qui pourrait exclure un mécanisme d'action du type de celui induit par les imidazothiazoles.

A ce stade de notre travail, il n'a pas été possible de préciser davantage le mécanisme d'action nématocide de Bal-7. En effet, nous aurions souhaité tester Bal-7 sur des mutants résistants aux anthelminthiques que nous avons utilisés comme références puis, sur d'autres mutants sur-exprimant les cibles courantes des anthelminthiques (par exemple les β -tubulines, les récepteurs nicotiniques, les récepteurs GABA,...) ce qui aurait permis de caractériser l'activité nématocide de Bal-7. Cependant le manque d'équipement approprié (pour éviter la contamination entre mutants) et surtout de moyens financiers nous ont empêché de poursuivre notre travail sur cette voie-là.

II. Caractérisation de l'effet anti-tumoral du mélange Bal-6/7.

Certains anthelminthiques comme les benzimidazoles, du fait de leur capacité à inhiber la polymérisation des tubulines, présentent un potentiel anti-tumoral (Singh et Lown 2000; Ji et coll. 2001; Boiani et Gonzalez 2005; Nagy et coll. 2005). D'autre part, de nombreux travaux ont montré que de nombreux saponosides sont associés à des activités cytotoxiques très marquées (Pettit et coll. 1991; Lacaille-Dubois et Wagner 1996; Hostettmann et coll. 2000). Ces saponosides peuvent agir en tant qu'agents anti-cancéreux en empêchant la carcinogénèse ou par des effets anti-prolifératifs et/ou cytotoxiques directs contre des cellules cancéreuses tant *in vitro* qu' *in vivo* (Pettit et coll. 1991; Lacaille-Dubois et Wagner 1996). Pettit et coll en 1991 a mis en évidence l'activité cytotoxique des balanitines -4 à -7 sur la lignée cellulaire P388 (modèle de leucémie murine). Cette étude a aussi montré que les balanitines -6 et -7 sont les plus cytotoxiques (Pettit et coll. 1991).

De ce qui précède et, faisant suite à la mise en évidence de l'activité nématocide de Bal-7, nous avons entrepris de caractériser l'activité anti-tumorale de balanitines. La méthode d'extraction que nous avons utilisée est inspirée de celle de Pettit et coll 1991 et tient également directement compte de l'expérience de la société Unibioscreen (Bruxelles, Belgique) dans ce domaine. Le mélange Bal-6/7 obtenu n'a jamais été étudié alors que l'activité cytotoxique de Bal-7, a été mise en évidence par Pettit et coll en 1991.

Dans la présente étude, nous avons démontré qu'un mélange de balanitine-6 et de balanitine-7 (désigné sous le nom de mélange Bal-6/7) montre une activité anti-cancéreuse aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Une approche expérimentale faisant appel à la vidéo-microscopie quantitative a également permis de démontrer que l'activité anti-cancéreuse du mélange Bal-6/7 n'est pas associée à une perméabilisation membranaire ou à un choc osmotique et ne semble pas non plus résulter d'un effet tensioactif. L'activité anti-tumorale du mélange Bal-6/7 ne semble donc point liée à une activité de type «hémolytique» caractéristique de nombreux saponosides (Creach 1940; Ibrahim 1992; Pal et Tandon 1998; Mohamed et Eltahir 1999; Hostettmann et coll. 2000; Koko et coll. 2000; Onyeyili et coll. 2001; Diehl et coll. 2004; Fennell et coll. 2004; Beloin et coll. 2005).

Nous avons fait appel à diverses approches expérimentales pour caractériser l'activité anti-tumorale du mélange Bal-6/7. Ces tests montrent que ce mélange Bal-6/7 n'induit ni un arrêt du cycle cellulaire ni une mort cellulaire par apoptose. Par contre, nous avons observé l'induction par ce mélange Bal-6/7 d'une accumulation de vésicules acides dans les cellules de la lignée cancéreuse A549, sans toutefois qu'intervienne une perméabilisation de la membrane lysosomiale. En effet le mélange Bal-6/7 n'a aucune activité sur l'expression de la

protéine Hsp70, protéine qui stabilise la membrane lysosomiale et dont la destruction provoque une perméabilisation de cette membrane et un relargage des enzymes lysosomiales au sein du cytoplasme, avec pour conséquence une autolyse létale pour la cellule. Cette accumulation de vésicules acides sans perméabilisation de la membrane lysosomiale pourrait en fait constituer un mécanisme de protection cellulaire et non pas un processus de mort cellulaire par autophagie. En effet, l'autophagie n'est pas seulement un processus de mort cellulaire, elle est avant tout un mécanisme de défense cellulaire contre divers types d'agressions physiologiques, notamment l'hypoxie ou encore une diminution drastique de nutriments dans le milieu environnemental (Massey et coll. 2004). Ce mécanisme peut être direct, quand des agents toxiques sont dirigés contre les lysosomes ou indirect, quand le processus autophagique permet d'éliminer des structures intracellulaires endommagées. Dans les états de carence nutritionnelle, la dégradation des lipides membranaires et des protéines par les autolysosomes produit des acides gras libres et des acides aminés qui peuvent être réutilisés pour la production d'ATP et pour maintenir la synthèse protéique (Massey et coll. 2004). En conclusion, l'accumulation des vésicules acides observée pourrait être due à une réaction de protection des cellules cancéreuses A549 contre la toxicité induite par le mélange Bal-6/7.

Les résultats de la caractérisation de l'activité anti-tumorale de ce mélange Bal-6/7 montrent également une diminution significative de l' $[ATP]_i$ (sans augmentation perceptible de $[ROS]_i$). Cette diminution de $[ATP]_i$ induit une désorganisation marquée du cytosquelette d'actine au sein des cellules cancéreuses A549 et U373. Plusieurs classes de produits naturels exercent leur activité cytotoxique par déplétion de l' $[ATP]_i$. C'est le cas par exemple des glycosides cardiotoniques (VanQuaquebeke et coll. 2005), des alcaloïdes d'isocarbostryrile tels que la pancratistatine (Kekre et coll. 2005) et de la tétrandrine, un alcaloïde bisbenzyl tétrahydroisoquinoléique (Yan et coll. 2006). Habituellement, l'induction d'une diminution de l' $[ATP]_i$ s'accompagne d'une augmentation des $[ROS]_i$ (Kekre et coll. 2005; Yan et coll. 2006). Ce n'est pas le cas pour le mélange Bal-6/7, comme indiqué ci-dessus. L'augmentation des $[ROS]_i$ est habituellement mise en parallèle à une activation de l'apoptose (Kekre et coll. 2005; Yan et coll. 2006). Ce qui une fois de plus ne semble point concerner le mélange Bal-6/7. En fait, les effets anti-tumoraux du mélange Bal-6/7 semblent être directement liés à une désorganisation rapide du cytosquelette d'actine induite par la déplétion de l' $[ATP]_i$. Les effets anti-tumoraux induits par ce mélange Bal-6/7 semblent se produire du fait de la déplétion de l' $[ATP]_i$, parce qu'ils sont sensiblement réduits par un apport exogène de D-glucose, de L-fructose ou de glycine. L'apport de fructose ou de glucose permet de suppléer

les besoins énergétiques de la cellule par une augmentation de la glycolyse et donc une préservation de l'ATP intracellulaire (Nieminen et coll. 1994; Nishimura et coll. 1998; Terry et coll. 2006). La cytoprotection induite par l'apport de glycine s'explique par une diminution de la protéolyse cellulaire totale et une réduction de la déplétion de l'[ATP]_i. En d'autres termes, la glycine protège contre les effets cytotoxiques induits par la déplétion de l'[ATP]_i en empêchant les réactions protéolytiques (Dickson et coll. 1992). L'hypoxie chimique induite par le mélange Bal-6/7 dans les cellules A549 et de U373 n'est pas associée à la perméabilisation des membranes lysosomiales.

Comme mentionné précédemment, la déplétion de l'[ATP]_i pourrait entraîner une forte désorganisation du cytosquelette d'actine. En fait, la déplétion de l'[ATP]_i dans divers types cellulaires résulte de la conversion de l'actine-G monomérique en sa forme polymérisée actine-F. Cette conversion résulte elle-même du changement de rapport de l'ATP-G-actine et de l'ADP-G-actine, entraînant une nette diminution de la concentration des complexes thymosine-actine par suite de la différence d'affinité de la thymosine β₄ pour l'ATP et l'ADP-G-actine (Atkinson et coll. 2004).

Les dommages causés aux cellules endothéliales au cours de la simulation d'une ischémie (le rétablissement de la perfusion entraîne un dysfonctionnement mitochondrial, la déplétion de l'ATP et la désorganisation du cytosquelette d'actine) sont caractérisés par une dégradation des microfilaments d'actine, une disparition des adhérences focales et une rétraction du cytoplasme (Terry et coll. 2006). Dans d'autres types cellulaires, y compris les fibroblastes d'embryon de souris, les cellules de leucémies murines, les cellules des microvilli de la membrane apicale des tubules proximaux et des cellules NSCLC humaines, l'effondrement du taux d'ATP intracellulaire provoque également une perturbation majeure de l'organisation du cytosquelette d'actine. Un cytosquelette d'actine fonctionnel est essentiel à la prolifération (pendant la cytokinèse par exemple) et la migration cellulaire. Ainsi, il semble probable que les effets anti-tumoraux du mélange Bal-6/7 puissent s'expliquer, au moins en partie, par l'effondrement de l'[ATP]_i, ce qui a pour conséquence une désorganisation importante du cytosquelette d'actine comme démontré par Molitoris (Molitoris et coll. 1991).

Les effets anti-tumoraux *in vivo* obtenus avec le mélange Bal-6/7, bien que modestes, sont néanmoins statistiquement significatifs. Ces données préliminaires *in vivo* laissent entrevoir la possibilité de développer des dérivés de balanitines plus puissants que celles-ci. Les balanitines -6 et -7, comme la dioscine et la polyphylline D, appartiennent à un groupe de diosgényl saponines structurellement semblables qui peuvent être synthétisées par glycosylations successives. Il devrait donc être possible de produire des dérivés hemi-

synthétiques de balanitines -6 et -7 dotés d'une activité anti-cancéreuse *in vitro* et *in vivo* potentiellement meilleure avec une réduction de la toxicité *in vivo* et un index thérapeutique nettement amélioré. Cette approche a déjà été appliquée avec succès à certains types de cardénolides (VanQuaquebeke et coll. 2005), pyridoacridines marines (ascididémine et méridine) (Delfourne et coll. 2003) et des dérivés de quinolone (Joseph, Darro et al. 2002). En plus, on a déjà démontré que les saponosides de *Tribulus terrestris* L sont moins toxiques pour les fibroblastes humains normaux que pour de nombreuses lignées de cellules tumorales (Neychev et coll. 2007), donnant davantage l'espoir de synthétiser des balanitines avec de meilleurs index thérapeutiques.

Les microtubules et les filaments qui jouent un rôle important dans la mitose, la signalisation et la migration cellulaire constituent des cibles potentielles intéressantes pour le développement de nouveaux agents anti-tumoraux (Hayot et coll. 2006a; Hayot 2006b). Cependant, alors que plusieurs médicaments antitumoraux anti-tubuline (d'origine naturelle) sont déjà commercialisés (Paclitaxel[®], Taxotere[®], Navelbine[®], Oncovin[®], etc.), aucun agent anti-cancéreux anti-actine n'est encore sur le marché. Le cytosquelette d'actine représente néanmoins une cible contre laquelle un nombre important de chercheurs et de firmes pharmaceutiques essayent de développer des inhibiteurs sélectifs pour le développement d'agents anti-tumoraux. Ainsi, les dérivés de balanitines pourraient avoir un potentiel thérapeutique intéressant contre le cancer.

En conclusion, le mélange Bal-6/7 induit *in vitro* une activité cytotoxique non-apoptotique par induction d'un effondrement de l'[ATP]_i entraînant une désorganisation majeure du cytosquelette d'actine.

In vivo, l'activité de ce mélange Bal-6/7 reste modeste, mais néanmoins statistiquement significative. Nous envisageons de développer à partir de dérivés de balanitines des anti-cancéreux plus sélectifs.

Le présent travail a ainsi permis, d'une part, la mise en évidence de l'activité toxique des amandes de *Balanites aegyptiaca* sur *C. elegans* et l'isolement de Bal-7 comme principal agent nématocide et, d'autre part, a montré que le mélange Bal-6/7, extrait également des amandes de *Balanites aegyptiaca*, présente une forte activité anti-tumorale *in vitro*, et une activité anti-tumorale *in vivo* prometteuse.

III. Quels sont les liens entre nos deux expérimentations?

Les protéines membres de la famille des *Rho-GTPases* (dont *Rho*, *Rac* et *Cdc42*) sont impliquées dans la régulation de multiples processus cellulaires dont la progression du cycle cellulaire, la migration cellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Wherlock et Mellor 2002). Elles interviennent de fait aussi dans la formation de métastases tumorales. Ces *Rho-GTPases* sont activées par les Rho-GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), qui ont été souvent isolés comme protéines oncogéniques (Wherlock et Mellor 2002; Kaletta et Hengartner 2006). La répression de Rho GTPases pourrait contribuer à la réorganisation de l'actine (Wherlock et Mellor 2002; Kaletta et Hengartner 2006). Le développement de molécules qui cibleraient ces protéines, permettrait de lutter contre les cellules tumorales migrantes (Kaletta et Hengartner 2006), qui sont très agressives et résistent aux médicaments de chimiothérapie conventionnelle (Lefranc et Kiss 2006). *C. elegans* chez qui ces protéines ont été aussi mises en évidence, constitue un modèle de choix pour le screening de molécules anti-tumorales anti-*Rho GTPases* (Kaletta et Hengartner 2006).

D'autres protéines de liaison de l'actine que l'on retrouve chez *C. elegans*, comme *WASP* (Wiskott-Aldrich syndrome protein), *UNC-115/abLIM*, *MIG-10* sont aussi impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine (Yang et Lundquist 2005; (Ballestrem et coll. 2000)).

Nous avons montré dans notre étude que les balanitines possèdent une forte activité toxique sur *C. elegans* et une activité cytotoxique se traduisant par une désorganisation du cytosquelette d'actine. Nous avons alors émis une hypothèse selon laquelle, ces deux activités pourraient être liées, impliquant un effet anti- *actin binding protein* des balanitines.

Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation de siRNAs qui réprimeraient ces protéines si elles sont les cibles des balanitines. Les balanitines perdraient alors leur activité toxique sur des *C. elegans*.

CONCLUSIONS

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. Au Burkina Faso, par exemple le taux de tradipraticiens par habitant se situe entre 1/400 et 1/600 contre 1/25000 au moins pour le personnel de la médecine moderne (Ministère de la Santé du Burkina Faso 2004). Par ailleurs, la répartition du personnel soignant peut être irrégulière, la plupart se trouvant dans les villes, ce qui rend difficile l'accès aux soins des populations rurales. D'où la nécessité pour les pays en voie de développement, d'identifier des composés et thérapies de médecine traditionnelle, sûrs et efficaces pour les maladies représentant un lourd fardeau pour les populations (OMS 2002). Les parasitoses intestinales qui affectent plus de 2 milliards de personnes à travers le monde et causent plus de 155 000 décès par an (OMS 2004), sont de celles-là. Le paludisme mis à part, ces affections constituent 40% des maladies tropicales (OMS 2004).

La présente étude a permis de montrer que les amandes de *Balanites aegyptiaca*, utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso, pourraient être efficaces dans le traitement des parasitoses intestinales. En effet, nous avons montré, d'une part, que ces amandes présentent un effet toxique sur *C. elegans*, un nématode libre, proche d'*Ascaris suum* sur le plan phylogénétique, et, d'autre part que Bal-7, un saponoside diosgényle, pourrait être le principal agent nématocide de ces amandes. Du fait du potentiel anthelminthique de Bal-7, on pourrait envisager de développer des phytomédicaments standardisés sur la base de la teneur en Bal-7. La production de phytomédicaments à partir de la poudre d'amandes de *Balanites aegyptiaca* ne nécessite pas d'équipements particuliers, ce qui n'est pas le cas des phytomédicaments à base d'extraits de plantes. En effet, la production à grande échelle de phytomédicaments à base d'extraits nécessitera un investissement lourd et coûteux (extracteur industriel, réactifs,...) avec le risque que ces phytomédicaments, dont la teneur en Bal-7 serait plus élevée que ceux à base de poudre d'amandes, soient plus toxiques.

Toutefois, des études complémentaires (détermination de la dose maximale tolérée, études de l'activité nématocide sur des souches de *C. elegans* résistantes aux anthelminthiques courants et sur des nématodes parasites) seront nécessaires avant toute utilisation thérapeutique de ces phytomédicaments.

Le mélange Bal-6/7, isolé pour la caractérisation de l'activité anti-tumorale des balanitines, présente, du fait de son potentiel anti-tumoral, un intérêt certain en thérapeutique anti-cancéreuse.

Le mélange Bal-6/7 induit *in vitro* une activité cytotoxique non-apoptotique par induction d'un effondrement de l'[ATP]_i contribuant à une désorganisation majeure du cytosquelette d'actine.

In vivo, l'activité de ce mélange Bal-6/7 reste modeste, mais néanmoins statistiquement significative. Nous envisageons de développer à partir de dérivés de balanitines des anti-cancéreux plus sélectifs.

A ce jour, il n'existe pas d'anti-cancéreux dirigé contre les filaments d'actine sur le marché. Etant donné le rôle de ces filaments d'actine dans la prolifération et la migration des cellules tumorales, le développement de médicaments ayant cette protéine pour cible constituerait une avancée dans la recherche de nouvelles thérapies anti-tumorales.

Le présent travail a ainsi permis, d'une part, la mise en évidence de l'activité toxique des amandes de *Balanites aegyptiaca* sur *C. elegans* et l'isolement de Bal-7 comme principal agent nématocide et, d'autre part, a montré que le mélange Bal-6/7, extrait également des amandes de *Balanites aegyptiaca*, présente une forte activité anti-tumorale *in vitro*, et une activité anti-tumorale *in vivo* prometteuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adjanohoun, E. J., Aké A. L. (1986). Contribution aux études ethnobotaniques et floristique au togo. Médecine Traditionnelle et Pharmacopée. Paris, ACCT.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York and London.
- Ameisen, J. C. (1996). "Le suicide des cellules." Pour la science **224**: 52-58.
- Athanasidou, S., I. Kyriazakis, Jackson, I., Brandt, K. (2000). "Determination of the most appropriate *in vitro* test assess the efficacy of substances extracted from bioactive forages." Veterinary Record **146**: 728-732.
- Atkinson, S. J., Hosford, M. A., Molitoris, B. A. (2004). "Mechanism of Actin Polymerization in Cellular ATP Depletion." J. Biol. Chem. **279**(7): 5194-5199.
- Attwell, S., Roskelley, C., Dedhar, S. (2002). "The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis." Oncogene **19**(33): 3811-3815.
- Ba, A. (1994). Passé, Présent et Perspectives de l'ethnomédecine vétérinaire africaine. Métissage en Santé animale de Madagascar à Haïti. Namur, C.T.A., Presses universitaires.
- Babweteera, F., Savill, P., Brown, N. (2007). "*Balanites wilsonia*: Regeneration with and without elephants." Biological conservation **134**: 40-47.
- Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spieldmann, H., Zucco, F. (1995). "Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures." ATLA **23**: 129-147.
- Barr, M. M. (2003). "Super models." Physiological Genomics **13**: 15-24.
- Bellestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., Imhof, B. (2000). "Actin-dependent Lamellipodia Formation and Microtubule-dependent Tail Retraction Control-directed Cell Migration." Molecular Biology **11**: 2999-3012.
- Beloin, N., Gbeassor, M., Akpagana, K., Hudson, J., de Soussa, K., Koumaglo, K., Arnason, J. T. (2005). "Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity." Journal of Ethnopharmacology **96**(1-2): 49-55.
- Bennet-Jenkins, E., Bryant, C. (1996). "Novel sources of anthelmintics." International Journal for Parasitology **26**(8-9): 937-947.
- Blasi, F., Stoppelli, M. P. (1999). "Proteases and cancer invasion: from belief to certainty: AACR Meeting on Proteases and Protease Inhibitors in Cancer, Nyborg, Denmark, 14-18 June 1998." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1423**(1): 35-44.

- Bodey, B., Bodey, B. Jr., Siegel, S., Kaiser, H. et al. (2000). "Failure of cancer vaccines: the significant limitations of this approach to immunotherapy." Anticancer Research **20**(4): 2665-76.
- Boiani, M., Gonzalez, M. (2005). "Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents." Mini Reviews in Medicinal Chemistry **5**: 409-424.
- Brown, H. M., A.; Ilves, I.; Peterson, L.; Harris, S.; Sarett, L.; Egerton, J.; Yakstis, J.; Campell, W.; Cuckler, A. (1961). "Antiparasitic drugs IV, 2-(4- thiazolyl) benzimidazole, a new anthelmintic." J.Am.Chem.Soc. **83**: 1764-1765.
- Burglin, T. R., Lobos, E., Blaxter, M. L. (1998). "*Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes." International Journal for Parasitology **28**(3): 395-411.
- Carragher, N. O., Frame, M. C. (2004). "Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion." Trends in Cell Biology **14**(5): 241-249.
- Carter, P. (2001). "Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies." Nat Rev Cancer **1**(2): 118-129.
- Castro, G. A., Olson, L. et coll. (1996). Parasitology. Medical Microbiology. S. Baron. Texas, The University of Texas Medical Branch.
- Centre Belge D'informations pharmacothérapeutiques: <http://www.cbip.be>.
- Chapagain, B., Saharan, V., Wiesman, Z. (2007). "Larvicidal activity of saponin from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito." Bioresource Technology (article in press).
- Chapagain B.P., Wiesman Z. (2007). "Determination of saponins in the kernel cake of *Balanites aegyptiaca* by HPLC-ESI/MS." Phytochem. Anal. **18**(4): 354-62.
- Chapagain B.P., Wiesman, Z. (2006). "Phyto-saponins as a natural adjuvant for delivery of agromaterials through plant cuticle membranes." J. Agric. Food Chem. **54**(17): 6277-85.
- Cohen, A., Kemeny, N. (2003). "An Update on Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy for Colorectal Cancer." Oncologist **8**(6): 553-566.
- Colditz, G. A., Sellers, T. A., Trapido, E. (2006). "Epidemiology [mdash] identifying the causes and preventability of cancer?" Nat. Rev. Cancer **6**(1): 75-83.
- Condeelis, J., Segall, J. E. (2003). "Intravital imaging of cell movement in tumours." Nat. Rev. Cancer **3**: 921-930.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2007). The Cell Cycle. The cell: A Molecular Approach. A. Press and S. Associates. Boston, Boston University: 765.
- Creach, P. (1940). "Le *Balanites aegyptiaca*, ses multiples applications au Tchad." Rev. Bot. appl. Agric. Trop. **20**: 578-593.

- Czczuga-Semeninck, E., Wotczynski, S., Dabrowska, M., Dzieciot, J., Anchim, T. (2004). "The effect of Doxorubicin and retinoids on proliferation, necrosis and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells." Folia Histochemica et Cytobiologica **42**(4): 221-7.
- Darro, F., Decaestecker, C., Gaussin, J-F., Mortier, S., Van Ginckel, R., Kiss, R. (2005). "Are Syngeneic mouse tumor models still valuable experimental models in the field of anti-cancer drug delivery?" International Journal Of Oncology **27**(607-616).
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorezyca, W., Murakami, T., Traganos, F. (1997). "Cytometry in cell neurobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)." Cytometry **27**:1-20.
- De Hauwer, C., Camby, I., Darro, F., Migeotte, I., Decaestecker, C., Verbeek, C. Danguy, A., Pasteels, J.L., Brotchi, J., Salmon, I., Van Ham, P., Kiss, R. (1998). "Gastrin inhibits motility, decreases cell death levels and increases proliferation in human glioblastoma cell lines." J Neurobiol. **37**(3): 373-82.
- Debeir, O., Camby, I., Kiss, R., Van Ham, P., Decaestecker, C. (2004). "A model-based approach for automated in vitro cell tracking and chemotaxis analyses." Cytometry A. **60**(1): 29-40.
- Debeir, O., P. Van Ham, Kiss, R., Decaestecker, C. (2005). "Tracking of migrating cells under phase-contrast video microscopy with combined mean-shift processes." IEEE Trans Med Imaging. **24**(6): 697-711.
- Delfourne, E., Kiss, R., Corre, L.L., Dujols, F., Bastide, J., Collignon, F., Lesur, B., Frydman, A., Darro, F. (2003). "Synthesis and in Vitro Antitumor Activity of Phenanthroline-7-one Derivatives, Analogues of the Marine Pyridoacridine Alkaloids Ascididemin and Meridine: Structure-Activity Relationship." J. Med. Chem. **46**(16): 3536-3545.
- Deng, S., B. Yu, Hui, Yongzheng Yu, Hai Han, Xiuwen (1999). "Synthesis of three diosgenyl saponins: dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7." Carbohydrate Research **317**(1-4): 53-62.
- Dickson, R. C., Bronk, S. F., Gores, G. J. (1992). "Glycine cytoprotection during lethal hepatocellular injury from adenosine triphosphate depletion." Gastroenterology **102**: 2098-2107.
- Diehl, M. S., Atindehou, K., Tere, H. Betschart, B (2004). "Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria." Journal of Ethnopharmacology **95**(2-3): 277-284.
- Dinan, L., Harmatha, J., Lafont, R. (2001). "Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids." Journal of Chromatography A **935**(1-2): 105-123.
- Driscoll, M., Dean, E., Reilly, E., Bergholz, E., Chalfie, M. (1989). "Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity." J. Cell Biol. **109**(6): 2993-3003.

- Duez, P. (2006). Ethnopharmacologie, Médecines traditionnelles, thérapies du cancer en Afrique. Le cancer en Afrique. I. N. d. cancer. Boulogne-Billancourt: 787pp.
- Elard, L. (1999). La résistance aux benzimidazoles chez *Teladorsagia circumcincta*, nématode parasite des petits ruminants. Etude du déterminisme génétique et recherche des conséquences sur le fitness des parasites. Faculté de Médecine Vétérinaire. Tours, Université de Tours.
- Elgorashi, E. E., Taylor, J. L., Maes, A., De Kimpe, N., Van Staden, J., Verschaeve, L. (2002). "The use of plants in traditional medicine: potential genotoxic risks." South African journal of botany **68**(3): 408-410.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., Gonzalez-Baron, M. (2003). "Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets." Cancer Treatment Reviews **29**(6): 515-523.
- Eyog M. O., Gandé G., O., Dossou, B. (2000). Programme de ressources génétiques forestières en Afrique au sud du Sahara. Compte rendu de la première réunion. Ouagadougou, Réseau "Espèces Ligneuses Alimentaires": 243p.
- Fehrenbacher, N., Jaattela, M. (2005). "Lysosomes as Targets for Cancer Therapy." Cancer Res **65**(8): 2993-2995.
- Fennell, C. W., Lindsey, K. L., McGaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I., Elgorashi, E., Grace, O. M., Van Staden, J. (2004). "Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology." Journal of Ethnopharmacology **94**(2-3): 205-217.
- Fibach, E., Reuben, R. C., Rifkind, R. A., Marks, P. A. (1977). "Effect of Hexamethylene Bisacetamide on the Commitment to Differentiation of Murine Erythroleukemia Cells." Cancer Res **37**(2): 440-444.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat. Rev. Cancer **3**(6): 453-458.
- Fonseca-Salamanca, F., Martinez-Grueiro, M., Martinez-Fernandez, A. R. (2003). "Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models." Parasitology Research **91**(4): 321-324.
- Fortin, D. L., Maynard, G. (1988). Plantes médicinales du sahel. Laval.
- Frisch, S. M., Sreaton R. A. (2001). "Anoikis mechanisms." Current Opinion in Cell Biology **13**(5): 555-562.
- Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., Chan-Hui, P. Y. (1996). "Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase." J. Cell Biol. **134**(3): 793-799.
- Fu, K. K. (1998). "Combined radiotherapy and chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma." Seminars in Radiation Oncology Head and Neck Cancer **8**(4): 247-253.
- Geary, T. G, Sangster, N. C., Thompson, D. P.(1999). "Frontiers in anthelmintic pharmacology." Veterinary Parasitology **84**(3-4): 275-295.

- Geary, T. G., Thompson D. P. (2001). "Caenorhabditis elegans: how good a model for veterinary parasites?" Veterinary Parasitology **101**(3-4): 371-386.
- Geary, T. G., Thompson, D. P. (2003). "Development of antiparasitic drugs in the 21st century." Veterinary Parasitology **115**(2): 167-184.
- Gerald, K. (1996). Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments. Gainesville, John Wiley and Sons Inc.
- Gietema, J. A., de Vries, E. G. (2002). "Clinical cancer research: new agents and therapies." Drug Resistance Updates **5**: 192-203.
- Gnoula, C., Guissou, P., Dubois, J., Duez P. (2007a). "5(6)-carboxyfluorescéine diacétate as an indicator of *Caenorhabditis elegans* viability for the development of an in vitro anthelmintic drug assay." Talanta **71**: 1886-92.
- Gnoula, C., Guissou, P., Duez, P., Frédéricich, M., Dubois, J. (2007b). "Nematocidal compounds from the seeds of *Balanites aegyptiaca*. Isolation and structure elucidation." International Journal of Pharmacology **3**(3): 280-4.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). "The Hallmarks of Cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hardman, R., Wood C. N. (1971). "The effect of ripening and aqueous incubation on the yield of diosgenin and yamogenin from the fruits of *Balanites pedicellaris*." Planta Medica **20**(4): 350-6.
- Hayot, C., Debeir, O., Van Ham, P., Van Damme, M., Kiss, R., Decaestecker, C (2006a). "Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumour cell migration." Toxicology and Applied Pharmacology **211**: 30-40.
- Hayot, C. (2006b). Mise au point d'une stratégie pharmacologique originale pour l'obtention de composés anti-cancéreux anti-migratoires. Institut de Pharmacie. Bruxelles, Université Libre de Bruxelles: 118.
- Héron, J.-F. (1998). Epidémiologie. Cours de Cancérologie Fondamentale du Professeur J-F. Héron de la Faculté de Médecine de Caen, Centre François Baclesse, Centre de lutte contre le cancer de Basse-Normandie., <http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/2-epidemiologie/Epi-0.htm>.
- Hood, J. D., Cheresch, D. (2002). "Role of the integrins in cell invasion and migration." Nat Rev Cancer **21**: 91-100.
- Hope, I. A. (1999). *C. elegans*: A practical Approach. O. U. Press. New York.
- Hosny, M., Khalifa, T., Calis, I., Wright, A. D., Sticher, O. (1992). "Balanitoside, a furostanol glycoside, and 6-methyl-diosgenin from *Balanites aegyptiaca*." Phytochemistry **31**(10): 3565-3569.

- Hostettmann, K., Marston, A., Ndjoko, K., Wolfender, J-L. (2000). "The Potential of African Plants as a Source of Drugs." Current Organic Chemistry **4**: 973-1010.
- Hurley, L. H. (2002). "DNA and its associated processes as targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **2**(3): 188-200.
- Ibrahim, A. M. (1992). "Anthelmintic Activity of some Sudanese Medicinal Plant." Phytotherapy Research **6**: 155-157.
- Imperato, P. J., Traoré D. A. (1968). "Traditional beliefs about smallpox and its treatment among the Bambara of Mali." J. Trop. Med. Hygiene **71**: 224-228.
- Institut National du Cancer (2006). Le cancer, une maladie en progression rapide, http://www.e-cancer.fr/Les-Statistiques/op_1-it_61-1a-ve_1.html.
- Ishida, H., Umino T. (1989). "Studies on the antihemostatic substances in herbs classified as hemostatic principles in traditional Chinese medicine. I. On the antihemostatic principle of *sophora japonica* L." Chem. Pharm. Bull. **37**: 1616-1618.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M. J. (2006). "Cancer Statistics, 2006." CA Cancer J Clin **56**(2): 106-130.
- Ji, Y.-H., Bur, D. Häslar, W., Schmitt, V. R., Dorn, A., Bailly, C., Waring, M. J. Hochstrasser, R., Leupin, W. (2001). "Tris-benzimidazole derivatives: Design, synthesis and DNA sequence recognition." Bioorganic & medicinal chemistry **9**(11): 2905-19.
- Joseph, B., Darro, F., Behard, A., Lesur, B., Collignon, F., Decaestecker, C., Frydman, A., Guillaumet, G., Kiss, R. (2002). "3-Aryl-2-quinolone derivatives: synthesis and characterization of *in vitro* and *in vivo* antitumor effects with emphasis on a new therapeutical target connected with cell migration." J Med Chem. **45**: 2543-2555.
- Kaletta, T., Hengartner, M. (2006). "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism." Nature Reviews Drug Discovery **5**(5): 387-399.
- Kamel, M. S. (1998). "A furostanol saponin from fruits of *Balanites aegyptiaca*." Phytochemistry **48**(4): 755-757.
- Kamel, M. S., Koskinen A. (1995). "Pregnane glycosides from fruits of *Balanites aegyptiaca*." Phytochemistry **40**(6): 1773-1775.
- Kazuhiro, U., Toshinori, K., Sakata, S., Iguchi, T., Arizono, K. (2002). "Aquatic Acute Toxicity Testing Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*." Journal of Health Science **48**(6): 583-586.
- Kekre, N., Griffin, C., McNulty, J., Pandey, S. (2005). "Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells." Cancer Chemother Pharmacol. **56**: 29-38.

- Kirsch, R., Schleich, H. (1982). "Morphological changes in trichostrongylid eggs after treatment with fenbendazole." Vet Parasitol. **11**(4): 375-80.
- Knowles, G., McCulloch, C. (1992). "Simultaneous localization and quantification of relative G and F actin content: optimization of fluorescence labeling methods." J. Histochem. Cytochem. **40**(10): 1605-1612.
- Koko, W. S., Galal, M., Khalid, H. S. (2000). "Fasciolicidal efficacy of *Albizia anthelmintica* and *Balanites aegyptiaca* compared with albendazole." Journal of Ethnopharmacology **71**(1-2): 247-252.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., Kondo, S. (2005). "The role of autophagy in cancer development and response to therapy." Nat Rev Cancer **5**(9): 726-734.
- Kroemer, G., Jaattela, M. (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." **5**(11): 886-897.
- Kummar, S., Kinders, R., Rubinstein, L., Parchment, R., Murgo, A., Collins, J., Pickeral, O., Low, J., Steinberg, S., Gutierrez, M., Yang, S., Helman, L., Wiltrout, R., Tomaszewski, J., Doroshov, J. (2007). "Compressing drug development timelines in oncology using phase '0' trials." **7**(2): 131-139.
- Kwa, M. S., Veenstra, J. G., Van Dijk, M., Roos, M. (1995). "[beta]-Tubulin Genes from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus* Modulate Drug Resistance in *Caenorhabditis elegans*." Journal of Molecular Biology **246**(4): 500-510.
- Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H. (1996). "A review of the biological and pharmacological activities of saponins." Phytomedicine **2**(4): 363-86.
- Lefranc, F., Kiss, R. (2006). "Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas." Neurosurg. Focus **20**(3): 1-6.
- Lefranc, F., Sadeghi, N., Camby, I., Metens, T., Dewitte, O., Kiss, R. (2006). "Present and potential future issues in glioblastoma treatment." Expert Review of Anticancer Therapy **6**(5): 719-32.
- Lewis, J. S., Cheng, D., Jordan, V. C. (2004). "Targeting oestrogen to kill the cancer but not the patient." British Journal of Cancer **90**: 944-9.
- Li, S., Guan, J-L., Chien, S. (2005). "Biochemistry and Biomechanics of cell motility." Annu. Rev. Biomed. Eng. **7**: 105-50.
- Lieberman, R. (2002). "Chemoprevention of Prostate Cancer: Current Status and Future Directions." Cancer and Metastasis Reviews **21**(3): 297-309.
- Liotta, L. A., Kohn E. (2004). "Anoikis: Cancer and the homeless cell." **430**(7003): 973-974.
- Liu, H-W., Nakanishi, K. (1982). "The structures of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*." Tetrahedron **38**(4): 513-519.

- Maciel, S., Gimenez, A. M., Gaona, C., Waller, P. J., Hansen, J. W. (1996). "The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay." Veterinary Parasitology **62**(3-4): 207-212.
- Maksoud, S. A., Hadidi, M. (1988). "The flavonoids of *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae) from Egypt." Plant Systematics and Evolution **V160**(3): 153-158.
- Mann, J. (2002). "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future." Nat Rev Cancer **2**(2): 143-148.
- Mansir, A. (1998). Le cytosquelette pendant la spermatogenèse des Nématodes parasites: Actine, protéine spermatique majeure (MSP) et tubuline chez *Heligmosomoides polygyrus*. laboratoire de Biologie Parasitaire, Protistologie, Helminthologie. Paris, Muséum National d'Histoire Naturelle: 227 pp.
- Martin, R. J. (1997). "Modes of action of anthelmintic drugs." The Veterinary Journal **154**(1): 11-34.
- Massager, N., Lorenzoni, J., Devriendt, D., Desmedt, F., Brotchi, J., Levivier, M. (2004). "Gamma knife surgery for idiopathic trigeminal neuralgia performed using a far-anterior cisternal target and a high dose of radiation." J. Neurosurg **100**(4): 590-9.
- Massey, A., Kiffin, R., Cuervo, A. M. (2004). "Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **36**(12): 2420-2434.
- Mehlen, P., Puisieux, A. (2006). "Metastasis: a question of life or death." Nat Rev Cancer **6**(6): 449-458.
- Menan, E. I., Nebavi, N. (1997). "Profil des helminthiases intestinales chez les enfants d'âge scolaire dans la ville d'Abidjan." Santé Publique **17**96.
- Menan, E., Rouamba, E. (1997). "Helminthiases intestinales: Résultats cinq années de Coprologie Parasitaire à Ouagadougou." Médecine d'Afrique Noire **44**(7): 415-419.
- Penali, L. K., E. Y. Broalet, et al. (1993). "Helminthiases et protozooses intestinales de la femme enceinte en Cote d'Ivoire." Médecine d'Afrique Noire **40**(5).
- Merlano, M., Marchetti G. (2003). "Radiochemotherapy in head and neck cancer." Cancer Treatment Reviews **29**(4): 291-296.
- Mijatovic, T., Mathieu, V., Gaussin, J-F., De Nève, N., Ribaucour, F., Van Quaquebeke, E., Dumont, P., Darro, F., Kiss, R. (2006a). "Cardenolide-Induced Lysosomal Membrane Permeabilization Demonstrates Therapeutic Benefits in Experimental Human Non-Small Cell Lung Cancers." Neoplasia **8**(5): 402-412.
- Mijatovic, T., Op De Beeck, A., Van Quaquebeke, E., Dewelle, J., Darro, F., de Launoit, Y., Kiss, R. (2006b). "The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor {kappa}B-mediated

- cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells." Mol Cancer Ther **5**(2): 391-399.
- Mijatovic, T., Roland, I., Van Quaquebeke, E., Nilsson, B., Mathieu, A., Van Vynckt, F., Darro, F., Blanco, G., Facchini, V., Kiss, R. (2007a). "The $\alpha 1$ subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers." The Journal of Pathology **212**(2): 170-179.
- Mijatovic, T., Van Quaquebeke, E., Delest, B., Debeir, Olivier, Darro, F., Kiss, R. (2007b). "Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy." Biochimica et Biophysica Acta **in press**.
- Milewski, A. V., Madden, D. (2006). "Interactions between large African browsers and thorny Acacia on a wildlife ranch in Kenya." African Journal Of Ecology **44**(4): 515-522.
- Ministère de la Santé du Burkina Faso (2004). Document Cadre de Politique Nationale en Matière de Médecine et Pharmacopée Traditionnelles. Ouagadougou, Ministère de la Santé du Burkina Faso: 18 pp.
- Mocellin, S., S. Mandruzzato, Bronte, V., Marincola, F.M. (2004). "Cancer vaccines: pessimism in check." Nat Med **10**(12): 1278-9.
- Mohamed, A. H., Eltahir, K. E. (1999). "Some pharmacological and toxicological studies on *Balanites aegyptiaca* bark." Phytotherapy Research **13**(5): 439-41.
- Molitoris, B. A., Geerdes, A., McIntosh, J. R. (1991). "Dissociation and redistribution of Na^+, K^+ -ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion." J Clin Invest. **88**(2): 462-469.
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., Roberts-Thomson, S. J. (2007). "Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport." **7**(7): 519-530.
- Moody, T. W. (2006). "Peptides hormones and lung cancer." Panminerva Medica **48**(1): 19-26.
- Moore, E. E., Moritz, E. A., Mitra, N. S. (1985). "A Variant F9 Embryonal Carcinoma Cell Line Which Undergoes Incomplete Differentiation in Retinoic Acid." Cancer Res **45**(9): 4387-4396.
- Nacoulma, O. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du plateau central. Institut des Sciences Naturelles. Ouagadougou,: 605. Institut des Sciences Naturelles. Ouagadougou, Université de Ouagadougou: 605p.
- Nagy, K., Petak, I., Imre, G., Barna, G., Gezane-Csorba, M., Sebestyén, A., Houghton, J. A., Mihalik, R., Kopper, L. (2005). "Proteasome inhibitors abolish cell death downstream of caspase

- activation during anti-microtubule drug-induced apoptosis in leukemia cells." Anticancer Res. **25**(5): 3321-6.
- Neidle, S., Thurston, D. E. (2005). "Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies." Nat Rev Cancer **5**(4): 285-296.
- Neureiter, D., Herold, C., Ocker, M. (2006). "Gastrointestinal cancer - only a deregulation of stem cell differentiation?" International Journal Of Molecular Medecine **17**: 483-9.
- Neychev, V. K., Nikolova, E., Zhelev, N., Mitev, V.I. (2007). "Saponins from *Tribulus terrestris* L. are less toxic for normal human fibroblasts than for many cancer lines: influence of apoptosis and proliferation." Exp Biol Med (Maywood) **232**: 126-133.
- Nieminen, A. L., Saylor, A. K., Herman, B., Lemasters, J. J. (1994). "ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition." Am J Physiol Cell Physiol **267**(1): C67-74.
- Nikonov, G. K., Avramenko, L. G., Sharova, G. P. (1971). "Synthesis of acyl derivatives of hydroxycoumarins and relation between their structure and spasmolytic activity." Khim. Farm. Zh. **5**: 12-18.
- Nishimura, Y., Romer, L. H., Lemasters, J. J. (1998). "Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine." Hepatology **27**: 1039-1049.
- Nowell, C. P. (1976). "The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations." Science **194**: 23-28.
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U.
Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., Jaattela, M. (2004). "Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization." J. Exp. Med. **200**(4): 425-435.
- Okada, H., Mak, T. W. (2004). "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells." Nat Rev Cancer **4**(8): 592-603.
- Old, L. (1996). "L'immunothérapie. Les progrès de la lutte contre le cancer." Scientific American.
- OMS (2002). Stratégies de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève.
- OMS (2004). Liens entre l'eau, l'assainissement, l'hygiène et la santé: faits et chiffres. Genève.
- OMS (2006). Le cancer. Aide-mémoire. W. H. Organisation, World Health Organisation. **297**: 1-4.
- Onyeyili, P. A., Nwosu, C. O., Amin, J. D., Jibike, J. I. (2001). "Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes." Fitoterapia **72**(1): 12-21.

- Ouattara O., Ouedraogo, S., Tamboura, H., Lompo, M., Poda, J. N., Guissou, I.P. (1998). "Propriétés anthelminthiques in vitro de *Balanites aegyptiaca* L. Del. (Balanitaceae)." Sciences et technique, Sciences de la santé **26(2)** : 69-72.
- Padmashali, B., Vaidya, V. P., Vagdevi, H. M., Satyanarayana, N. D. (2006). "Antifertility Efficacy of the Plant *Balanites Roxburghii*(Balanitaceae) in Female Rats." Indian Journal of Pharmaceutical Sciences **68(3)**: 347-51.
- Pal, P., Tandon, V. (1998). "Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Leguminosae): Genistein-induced alterations in the activity of tegumental enzymes in the cestode, *Raillietina echinobothrida*." Parasitology International **47(3)**: 233-243.
- 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.
- Pierce, G. B., Speers, W. C. (1988). "Tumors as Caricatures of the Process of Tissue Renewal: Prospects for Therapy by Directing Differentiation." Cancer Res **48(8)**: 1996-2004.
- Pierce, G. B., Wallace, C. (1971). "Differentiation of Malignant to Benign Cells." Cancer Res **31(2)**: 127-134.
- Pirotte, B., Acerbi, F., Lubansu, A., Goldman, S., Brotchi, J., Levivier, M. (2007). "PET imaging in the surgical management of pediatric brain tumors." Child's Nervous System **23(7)**: 739-751.
- Popkin, B. M. (2007). "Understanding global nutrition dynamics as a step towards controlling cancer incidence." Nat Rev Cancer **7(1)**: 61-67.
- Pousset, J. L. (1992). Plantes médicinales africaines: Possibilité de développement. Paris.
- Rang, H. P., M. M. Dale, et al. (1999). Pharmacology. Edimbourg.
- Rastogi, T., Hildesheim, A., Sinha, R. (2004). "Opportunities for cancer epidemiology in developing countries." Nat Rev Cancer **4(11)**: 909-917.
- Reed, J. C. (2003). Apoptosis and Cancer. Cancer Medecine. B. C. D. Inc.
- Relling, M. V., Dervieux, T. (2001). "Pharmacogenetics and cancer therapy." Nat Rev Cancer **1(2)**: 99-108.
- Roberson, E. (1982). Antimetodal drugs. Veterinary pharmacology and therapeutics, Iowa State University Press: 803-851.
- Robertson, S. J., Martin, R. J. (1993). "Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*." British Journal of Pharmacology **108**: 170-178.
- Roskams, T. (2006). "Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma." Oncogene **25(27)**: 3818-3822.

- Sarker, S. D., Bartholomew, B., Nash, R. J. (2000). "Alkaloids from *Balanites aegyptiaca*." Fitoterapia **71**(3): 328-330.
- Sawadogo, R., W. (2006). Etude comparée de la phytochimie et des effets pharmacologiques de six plantes de la famille des Acanthaceae utilisées dans la prise en charge du paludisme en médecine traditionnelle. Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la vie et de la Terre. Ouagadougou, Université de Ouagadougou: 250.
- Seida, A. A., Kinghorn, A. D., Cordell, G. A., Farnsworth, N. R. (1981). "Isolation of Bergapten and Marmesin from *Balanites aegyptiaca*." Planta Medica **43**: 92-93.
- Shorderet, M. (1998). Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Paris.
- Simpkin, K. G., Coles, G. C. (1981). "The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening." J. Chem. Tech. Biotechnol. **31**: 66-69.
- Singh, A., Lown, J. (2000). "Design, synthesis and antitumor cytotoxicity of novel bis-benzimidazoles." Anti-Cancer Drug Design **15**(4): 265-275.
- Small, J. V., Kaverina, I. (2003). "Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity." Current Opinion in Cell Biology **15**: 40-47.
- Sofowora, A. (1996). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Paris, Académie suisse des sciences naturelles.
- Sparg, S. G., Light, M. E., Van Staden, J. (2004). "Biological activities and distribution of plant saponins." Journal of Ethnopharmacology **94**(2-3): 219-243.
- Sperandio, S., de Belle, I. et coll. (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death." PNAS **97**(26): 14376-14381.
- Speroni, E., Cervellati, R., Innocenti, G., Costa, S., Guerra, M. C., Dall'Acqua, S. Govoni, P. (2005). "Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile." Journal of Ethnopharmacology **98**(1-2): 117-125.
- Stupack, D. G., Cheresch, D. A. (2002). "Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival." J Cell Sci **115**(19): 3729-3738.
- Svensson, C., Kaigas, M., Goldman, S. (1992). "Induction chemotherapy with carboplatin and 5-fluorouracil in combination with radiotherapy in loco-regionally advanced epidermoid carcinoma of the anus- preliminary results." International Journal of Colorectal Disease **7**(3): 122-124.
- Taylor, J. L. S., Elgorashi, E. E., Maes, A., Van Gorp, U., De Kimpe, N. Van Staden, J., Verschaeve, L. (2003). "Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine:

- Testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays." Environmental and Molecular Mutagenesis **42**(3): 144-154.
- Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R. R., Lehec, S. C., Hughes, R.D. (2006). "Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing." Liver Transpl. **12**: 165-177.
- US Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, <http://www.fda.gov/cder/drug/>.
- Valentijn, A. J., Zouq, N., Gilmore, A. P. (2004). "Anoikis." Biochem. Soc. Trans. **32**(Pt3): 421-425.
- Van den Bossche, H. (1982). "Mebendazole and related anthelmintics." Adv. Pharmacol. Chemother. **19**: 67-128.
- Van Wyk, J. A., Van Schalkwyk, P. C. (1990). "A novel approach to the control of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep." Veterinary Parasitology **35**(1-2): 61-69.
- VanQuaquebeke, E., Simon, G., Andre, A., Dewelle, J., Yazidi, M.E., Bruyneel, F., Tuti, J., Nacoulma, O., Guissou, P., Decaestecker, C., Braekman, J-C., Kiss, R., Darro, F. (2005). "Identification of a Novel Cardenolide (2' '-Oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the Hemisynthesis of Novel Derivatives Displaying Potent *in Vitro* Antitumor Activities and High *in Vivo* Tolerance: Structure-Activity Relationship Analyses." J. Med. Chem. **48**(3): 849-856.
- Vasiliev, J. M. (2004). "Cytoskeleton mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells." Int. J. Dev. Biol. **48**: 425-439.
- Waller, P. J. (1986). "Anthelmintic resistance in nematode parasite of sheep." Agric. Zool. Rev. **1**: 333-373.
- Waller, P. J. (1997). "Anthelmintic resistance." Veterinary Parasitology **72**(3-4): 391-412.
- Wasonga, V. O., Ngugi, R. K., Nyariki, D. M., Kironchi, G., Njoka, T. J. (2003). "Effect of *Balanites glabra* canopy cover on grass production, organic matter and soil moisture in a southern Kenyan rangeland." African Journal of Range & Forage Science **20**(3): 259-264.
- Wherlock, M., Mellor, H. (2002). "The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story." J Cell Sci **115**(2): 239-240.
- Wikipedia (2006). Cancer, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cancer>. 2006.
- Yamazaki, D., Kurisu, S., Takenawa, T. (2005). "Regulation of cancer cell motility through actin reorganization." Cancer Science **96**(7): 379-386.
- Yan, C., Xin-Ming, Q. Li-Kun, G., Lin-Lin, L., Fang-Ping, C., Ying, X., Xiong-Fei, W., Xiang-Hong, L., Jin, R. (2006). "Tetrandrine-induced apoptosis in rat primary hepatocytes is

initiated from mitochondria: caspases and endonuclease G (Endo G) pathway,"
Toxicology **218**: 1-12.

Yang, Y., Lundquist, E. (2005). "The Actin-Binding Protein UNC-115/abLIM Controls Formation of Lamellipodia and Filopodia and Neuronal Morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*." Mol. Cell. Biol. **25**(12): 5158-5170.

ANNEXES