

Analyse chimique et propriétés anticancéreuse et antifongique de *Withania adpressa* Coss.

Abdeljebbar. L. H^{*#}, Humam. M[□], Amzazi. S^{*}, Hostettmann. K[□], Bekkouche. K[#], Christen. P[□], Benjouad. A^{*}

*Laboratoire de Biochimie-Immunologie, Faculté des Sciences – Rabat, #Laboratoire des plantes médicinales et de phytochimie, Faculté des Sciences Semlalia- Marrakech – Maroc,

□ Laboratoire de pharmacognosie et phytochimie, Section des sciences pharmaceutiques, Ecole de pharmacie Genève-Lausanne.

Résumé

Les propriétés antiproliférative et antifongique de différents extraits des feuilles de *Withania adpressa*, une Solanacée endémique du Sahara marocain ont été étudiées. L'activité antiproliférative a été réalisée à l'aide du test MTT sur des lignées cellulaires humaines HT29 (Cancer du Colon) et RD (Cancer du rhabdomyosarcome), ainsi que sur des cellules cancéreuses d'origine animale. L'activité antifongique a été réalisée par bioautographie sur couche mince contre *Cladosporium cucumerinum*. Les extraits et leurs fractions actives ont été analysés par LC/UV et LC/MS.

L'extrait dichlorométhane présente un effet cytotoxique très élevé ($IC_{50} = 0,2 - 5 \mu\text{g/ml}$) pour les lignées cellulaires humaines comparable à celui obtenu avec le nocodazol. L'extrait acétate d'éthyle inhibe efficacement à $10 \mu\text{g/ml}$ le développement du champignon *Cladosporium cucumerinum*. La nature chimique et la structure des substances actives ont été caractérisées par NMR, IR, UV et HRMS.

Mots clés : *Withania adpressa*, test MTT, activité antiproliférative, Test antifongique, *Cladosporium cucumerinum*, .

Introduction

Les plantes du continent africain ont joué un rôle primordial pour soigner les maladies les plus diverses depuis maintenant plusieurs siècles. Encore aujourd'hui, jusqu'à 90% de la population africaine a recours aux plantes comme unique source de médicaments.

Dans le domaine des anticancéreux, nombreuses sont les molécules cytotoxiques qui sont d'origine végétale et qui sont largement utilisées en chimiothérapie, citons par exemple la colchicine, la pervenche, la podophyllotoxine et le taxol. En effet, le traitement du cancer qui est devenu, avec les maladies cardio-vasculaires, une des principales causes de la mortalité, fait appel à la chirurgie, la radiothérapie et à la chimiothérapie[1]. Malheureusement, malgré l'avènement récent de différents types d'agents anticancéreux, certains cancers résistent à la plupart des médicaments existant. Notre travail s'inscrit dans le cadre de recherche de nouvelles substances antitumorales d'origine naturelle et la valorisation des plantes endémiques du Maroc utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce travail nous avons étudié l'activité antiproliférative et antifongique *in vitro* de *Withania adpressa* (Wa), plante endémique saharienne de la famille des Solanacées.

Matériel et Méthodes

1) Technique d'extraction et de séparation du matériel végétal

Pour extraire les feuilles de *Withania adpressa*, nous avons adopté en premier temps, l'extraction à chaud par soxhlet, suivi d'un épuisement par différents solvants organiques. L'extrait dichlorométhane ayant montré une activité antiproliférative importante a été soumis à une série de techniques de séparation, chromatographie liquide sur colonne ouverte, chromatographie liquide à basse pression (LPLC) et chromatographie liquide semi-préparative à haute pression.

2) Evaluation de l'activité antiproliférative

a) Lignées cellulaires utilisées

Les lignées cellulaires utilisées pour cette étude sont des cellules cancéreuses adhérentes **humaines** [HT-29 (ATCC N° HTB 38, dérivant du carcinome colorectal) et RD (ATCC N° CCL-136, dérivant du rhabdomyosarcome embryonnaire] et **animales** [Vero (ATCC N° CCL-81, dérivant du cancer de rein de singe) et BSR (ATCC N° CCL-10, dérivant du cancer de rein d'hamster)].

b) Test de mesure de la prolifération

Le test MTT (Bromure de 3 (4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) est réalisé selon la méthode décrite par (Mosmann ; 1983)[2,3,4]. Les cellules vivantes métabolisent le MTT de couleur jaune en cristaux de formazan bleu dont la densité optique est mesurée à 550 nm.

Après dépôt des cellules dans des microplaques de 96 puits et incubation 24h à 37°C [5], les extraits/produits à tester sont déposés à différentes concentrations en duplicata dans les puits. Les plaques sont mises en incubation pendant 48 heures à 37°C, ensuite une solution de MTT est additionnée 5h avant la fin d'incubation. Le contenu des puits est ensuite éliminé et une solution de lyse (Isopropanol/Hcl) est ajoutée dans chaque puits pour dissoudre les cristaux de formazan.

3) Test antifongique sur *Cladosporium cucumerinum* par bioautographie directe

L'activité antifongique contre *Cladosporium cucumerinum* a été testée par bioautographie sur la base de la méthode développée par Homan et al., 1970. Les différents extraits et fractions (10 µg) ont été déposés sur plaque Silicagel 60 sur une feuille d'aluminium, puis élués par un mélange : Chloroforme-méthanol (2 :1).

Après évaporation complète des solvants, les plaques ont été pulvérisées avec une suspension de spores de *Cladosporium cucumerinum* dans un milieu nutritif;

elles ont été ensuite incubées 2-3 jours à 25°C dans une atmosphère humide à l'abri de la lumière. Les composés actifs se révèlent à la fin du test par des zones d'inhibition claires sur un fond grisâtre, produit par le développement du champignon.

Résultats et discussion

L'effet antiprolifératif des extraits des feuilles de *Wa* a été évalué par le test de cytotoxicité *in vitro* de ces extraits vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses. Les courbes représentant l'effet antiprolifératif des extraits des feuilles de *Wa* vis-à-vis des différentes lignées cancéreuses humaines et animales (Fig.1) montrent qu'il existe une bonne corrélation dose-effet et que l'effet inhibiteur est directement lié à la quantité d'extrait testé.

L'extrait dichlorométhane présente un effet inhibiteur de la croissance plus important par rapport aux extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle vis-à-vis des cellules cancéreuses humaines. Cet effet est comparable à celui obtenu par le Nocodazol (5-[2-thienylcarbonyl]-1h-benz-imidazol-2-yl]carbamate) utilisé comme un antimétabolite de contrôle. En revanche, les cellules cancéreuses animales ne présentent pas une très haute sensibilité vis-à-vis des différents extraits de cette plante.

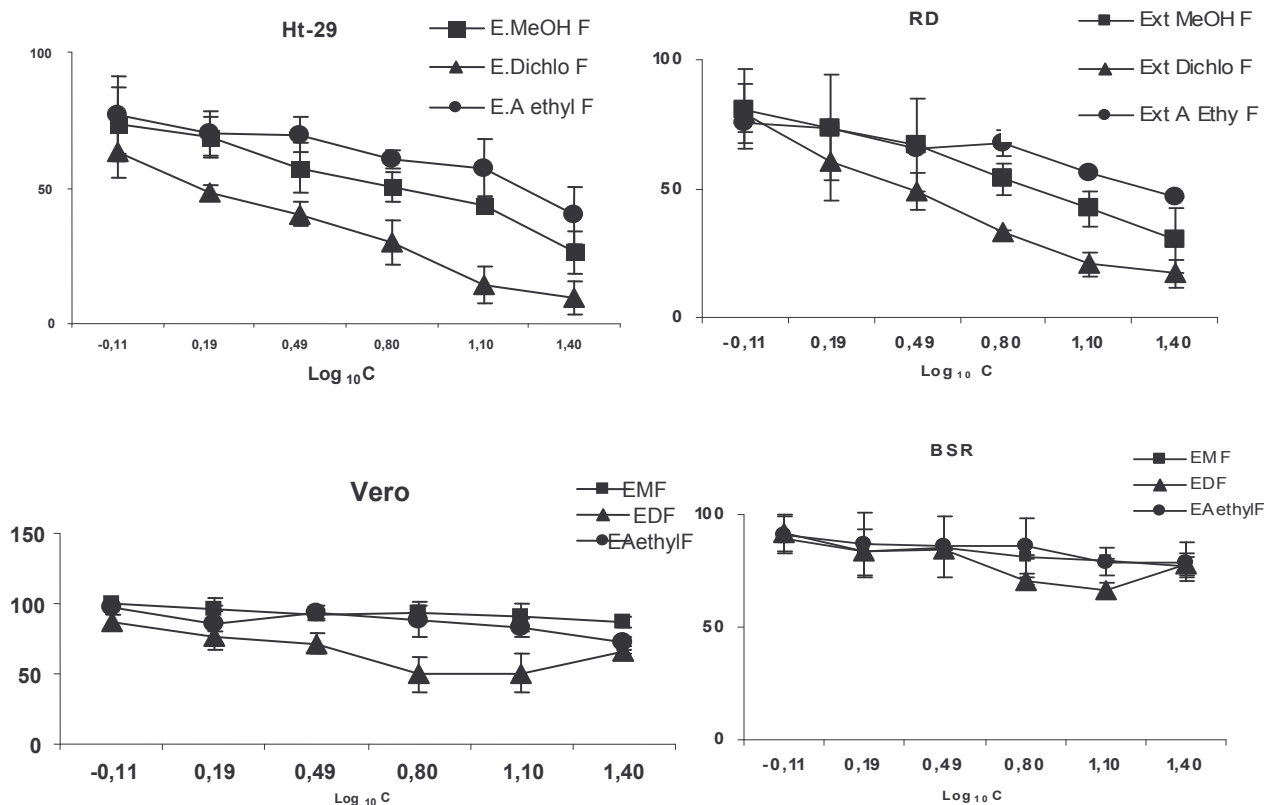


Fig.1 : Courbes dose - effet, illustrant l'effet cytotoxique des différents extraits des feuilles de *Withania adpressa* Coss. vis-à-vis des cellules cancéreuses humaines (n= 6) animales (n= 4)
 Congrès International de Biochimie. Agadir, 09-12 Mai 2006.

Les concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀ µg/ml) des différents extraits de cette plante ont été calculées. L'effet inhibiteur le plus important est obtenu avec l'extrait de dichlorométhane avec une IC₅₀ < 2µg/ml. Nous avons en conséquence entrepris le fractionnement et l'isolement des principes actifs à partir de cet extrait.

Le test antifongique sur *Cladosporium cucumerinum* par bioautographie directe a révélé que l'extrait acétate d'éthyle inhibe efficacement le développement de ce champignon à la concentration testée 10 µg/ml.

Bibliographie

- 1- David R. 2005. How to develop a successful cancer drug-molecules to medicines or targets to treatments? European journal of Cancer, 41, 676-682.
- 2- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55-63.
- 3- Carmichael J et al. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based, semi-automated calorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing cancer Res.47: 936-42.
- 4- Denizot F et Lang R. 1986. Rapid calorimetric assay for cell growth and survival. Modification to tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods. 89, 271.
- 5- Betancur-Galvis L A et al. 1999. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts.
- 6- Luduena R F et al. 1991. Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents. Pharmacol, 49, 133-152.
- 7- Vasquez R J et al. 1997. Nanomolar concentrations of nocodazol after microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. Mol. Bio. Cell. 8, 973-985.