

## Activité antioxydante et cytotoxicité des colorants extraits de cinq plantes tinctoriales du Bénin contre les lignées cellulaires cancéreuses MCF-7 et IGROV

FAGBOHOUN Louis<sup>1,3,\*</sup>, SAKIRIGUI Amoussatou <sup>1,2</sup>, FATONDJI Houssou Raymond<sup>1</sup>, MATHE Carole<sup>3</sup>, GBENOU Joachim Djimon<sup>2</sup>, BOUJILA Jalloul<sup>4</sup>, VIEILLESZAZES Cathy<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Kaba Research Laboratory in Chemistry and Applications (LaKReCA), University of Technical Sciences, Engineering and Mathematics (UNSTIM), Republic of Benin.

<sup>2</sup> Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils, Faculty of Sciences and Techniques/University of Abomey-Calavi (LaPHE-UAC) Cotonou, Republic of Benin.

<sup>3</sup> IRPNC Team, UMR IMBE CNRS 7263/IRD 237, Avignon University, Avignon, France.

<sup>4</sup> Laboratory of Molecular Interactions and Chemical and Photochemical Reactivity, UMR 5623; Institute of Chemistry, University of Toulouse, and Paul Sabatier.

Date de réception : 15 Mai 2022 ; Date de révision : 11 Juin 2022 ; Date d'acceptation : 22 Juin 2022.

### Résumé:

En Afrique subsaharienne, les cancers féminins restent prédominants, notamment le cancer du sein qui est le plus répandu après le cancer du col de l'utérus qui est le plus meurtrier. A noter qu'auparavant, le monde féminin a pu vaincre de nombreuses maladies grâce à son contact régulier avec les plantes tinctoriales employées dans la teinture ou toute autre activité artisanale traditionnelle. L'objectif de cette étude est d'évaluer in vitro, la toxicité des colorants extraits de cinq plantes tinctoriales traditionnellement utilisées par des femmes artisanes, sur des souches de cellules cancéreuses du sein et de l'ovaire. La méthode utilisée est celle de la culture de cellules souches en présence du bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Ce travail a révélé une forte corrélation de l'activité antioxydante des espèces étudiées en lien avec la teneur en phénols et en tannins totaux ; le plus fort pouvoir antiradicalaire,  $0,1323 \pm 0,00057$  étant celui de *Khaya senegalensis*. L'extrait méthanolique de *Tectona grandis*, appliqué à une concentration de 50 µg/mL, a induit une inhibition très élevée, évaluée à  $95,1 \pm 4,3$  % sur les cellules MCF-7 et moyennement élevée ( $51,8 \pm 7,3$  %) sur les cellules IGROV. De même, l'inhibition de la croissance cellulaire provoquée par *Lawsonia inermis* (48%) est sensiblement identique sur les deux lignées cellulaires testées. En effet, la richesse de ces plantes en substances antiradicalaires notamment en polyphénols et en dérivés quinoniques caractérisés dans les espèces *T. grandis* et *L. inermis*, donne une forte possibilité de purification de molécules actives contre les cellules cancéreuses testées.

**Mots clés:** cancer, cytotoxicité, colorants, activité antioxydante, activité artisanale.

## Antioxidant activity and cytotoxicity of dyes extracted from five dye plants from Benin against cancer cell lines MCF-7 and IGROV

### Abstract :

In sub-Saharan Africa, female cancers remain predominant, in particular breast cancer which is the most widespread after cancer of the cervix which is the deadliest. Previously, the female world was able to overcome many affections thanks to its regular contact with the tinctorial plants used in dyeing or other traditional craft activity. The objective of this study is to evaluate in vitro the toxicity of dyes extracted from five tinctorial plants traditionally used by craftswomen, on strains of breast and ovarian cancer cells. The method used is that of stem cell culture in the presence of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). This work revealed a strong correlation of the antioxidant activity of the species studied in relation to the phenols and total tannins content, the strongest antiradical power,  $0,1323 \pm 0,00057$  being that of *Khaya senegalensis*. The methanolic extract of *Tectona grandis* applied at a concentration of 50 µg/mL, induced a very high inhibition, evaluated at  $95,1 \pm 4,3\%$  on the MCF-7 cells and moderately high ( $51,8 \pm 7,3\%$ ) on the IGROV cells. Similarly, the inhibition of cell growth caused by *Lawsonia inermis* (48%) is substantially identical on the two cell lines tested. Indeed, the richness of these plants in antiradical substances such as polyphenols and quinone derivatives characterized in the species *T. grandis* and *L. inermis*, gives a strong possibility of purification of molecules active against the cancer cells tested.

**Key words:** cancer, cytotoxicity, dyes, antioxidant activity, artisanal activity.

### Introduction

Autrefois considéré comme maladie des pays riches, le cancer est en train de devenir un fléau mondial avec en moyenne 18,1 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2018 et près de 9,6 millions de décès, d'après les données épidémiologiques les plus récentes (Ferlay et al., 2019). Ce fléau atteint de plus en plus les populations des pays à faible et moyen revenu. En Afrique, il a été diagnostiqué près de 1,049

millions soit 5,8 % de nouveaux cas en 2018 selon la base de données GLOBO-CAN de l'Agence Internationale de Recherche sur le cancer (IARC) (Ferlay et al., 2019). Bien que la prévalence soit encore généralement plus élevée dans les régions plus développées, la mortalité est relativement beaucoup plus élevée dans les pays moins développés (Ferlay et al., 2015). En effet, dans les pays d'Afrique subsaharienne, la faiblesse de

(\*) Correspondance : Fagbohoun L. ; e-mail : [fadis07@yahoo.fr](mailto:fadis07@yahoo.fr) ; tél. : (+229) 95814403.

l'offre thérapeutique en chirurgie, chimiothérapie et en radiothérapie ainsi que la forte résistance des cellules cancéreuses aux médicaments cytotoxiques et antinéoplasiques, donnant des résultats de traitement insatisfaisants, font que la grande majorité des populations se replie sur des solutions endogènes en exploitant la flore locale pour faire face à ce fléau (Temidayo et al., 2016; Singh and Settleman, 2010; Luqmani, 2005). Au Bénin, les plantes utilisées comme remèdes anticancéreux sont encore moins documentées. Certaines plantes ont été répertoriées auprès des praticiens de la médecine traditionnelle mais les informations sur elles sont dispersées. L'enquête ethnobotanique effectuée récemment par Tohinou (2019) dans les départements de l'Ouémé et du Littoral, a révélé 112 espèces végétales et 206 recettes employées dans le traitement des cancers de sein, de foie, de prostate et de peau. En effet, les cancers féminins restent prédominants, notamment le cancer du sein qui est le plus répandu après le cancer du col de l'utérus qui reste le plus meurtrier dans les régions d'Afrique subsaharienne (Ferlay et al., 2015 ; 2019). La prévalence hospitalière observée au CNHU-HKM de Cotonou entre 2003 et 2007 est de 34,6 % pour le cancer de sein et 12,2 % pour les cancers gynécologiques (utérus, ovaire) loin devant le cancer de la prostate 3,2 % et de la peau 2,0 % sur un total de 344 patients (Azon-Kouanou et al., 2015).

Auparavant, les activités artisanales féminines, principalement la teinturerie, contribuaient à la protection des femmes contre les maladies dangereuses, grâce à leur contact régulier avec les plantes tinctoriales employées, nonobstant que dans certaines traditions, cette protection est généralement attribuée à une divinité qui protègerait le monde féminin et ses activités (Fagbohoun et Vieillescazes, 2020 ; Varichon, 2005).

En effet, les plantes à usage principal de colorant et tanin sont souvent polyvalentes et comptent en général quatre usages secondaires dont le plus important est l'usage médicinal (Jansen et Cardon, 2005). Leurs principes actifs seraient souvent les composés chimiques également responsables des propriétés tinctoriales.

## 1. Matériel et Méthodes

### 1.1. Matériel végétal :

Les échantillons étudiés ont été récoltés en juin 2012 dans la région d'Ifangni, lors d'une enquête

Les analyses phytochimiques effectuées précédemment sur les plantes tinctoriales ciblées dans le cadre de cette étude, ont révélé que ces espèces renfermaient des polyphénols notamment des tanins, flavonoïdes, anthocyanes (Fagbohoun et al., 2014). Ces composés possèdent un large éventail d'activités biologiques antibactériennes, anti-cancérigène, anti-inflammatoire liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques ainsi qu'ils présentent des propriétés antioxydantes bien établies en lien avec l'inhibition des stress oxydants (Ozyilkan et al., 2005). En outre, les travaux de laboratoire ont montré que les composés phytochimiques ayant les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires peuvent inhiber l'initiation, la promotion et la progression d'une tumeur (Sharma et al., 2009) et celles-ci sont étayées par des études épidémiologiques rapportant que les conditions inflammatoires ou les stress oxydatifs sont fréquemment associées à un risque accru de cancers (Schottenfeld et Beebe-Dimmer, 2006, Coussens et Werb, 2002).

Il y a donc une justification de plus en plus convaincante que l'on pourrait trouver une certaine compatibilité entre les propriétés des groupes chimiques identifiés dans les plantes étudiées, les diverses couleurs tirées de ces plantes, et naturellement, leur effet thérapeutique sur les artisans teinturiers qui les manipulent à priori, et étendu à ceux qui portent ces tissus teints aux colorants naturels.

C'est dans ce contexte que le présent travail porte sur les plantes tinctoriales *Tectona grandis*, *Indigofera tinctoria*, *Philenoptera cyanescens*, *Lawsonia inermis*, *Khaya senegalensis* les plus utilisées par les artisans teinturiers au sud Bénin (Fagbohoun et al., 2014), dans le but de tester leur potentielle activité antioxydante ainsi que leur effet antiprolifératif in vitro sur les cellules des cancers du sein et de l'ovaire. En effet, cette étude vise à caractériser quantitativement et qualitativement les colorants polyphénoliques totaux extraits de ces plantes, afin d'évaluer leur pouvoir antiradicalaire et leur potentiel cytotoxique contre la croissance des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et celles de l'ovaire IGROV.

ethnobotanique sur les plantes tinctoriales du sud Bénin. Ils ont été identifiés sur le terrain en exploitant Arbonnier (2002) et la Flore analytique

du Bénin (Akoegninou et al., 2006) puis confirmés à l'herbier national du Bénin. Il s'agit des feuilles de *T. grandis*, de *L. inermis*, de *P. cyanescens*, des tiges feuillées de *I. tinctoria* et des écorces de *K. senegalensis*. Ils ont été séchés à l'abri du soleil, à température de laboratoire pendant deux semaines, moulus puis stockés dans des récipients hermétiques.

### 1.2. Principaux solvants, réactifs et standards commerciaux utilisés

Tous les produits chimiques utilisés ont été achetés en France. Il s'agit de : Méthanol 99,9% (VWR) ; Kit réactif de Folin-Ciocalteu (Isitec Labo) ; 2-aminoéthyl-diphénylborate (Sigma-Aldrich) ; Bovine Serum Albumine /BSA ≥ 96% (Aldrich) ; Triéthanolamine /TEA 98% (Alfa Aesar) Sodium DodecylSulphate/ SDS ≥ 99% (Aldrich) ; 1,1-diphényl-2-picrylhydrazole / DPPH 90% (Aldrich) ; Acide chlorhydrique (AcrosOrganics) ; Acide trichloroacétique /TCA 99,5% (Aldrich) ; Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium / MTT (Aldrich) ; Acétate de sodium (Carlo Erba) ; Chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (Aldrich) ; ferricyanure de potassium 99% (Aldrich) ; Trolox 97% (AcrosOrganics) ; Acide gallique 99% (Alfa Aesar) ; Quercétine ≥ 95% (Aldrich) ; Cyanidine-3-glucoside ≥ 98% (Aldrich) ; Acide tannique ≥ 90% (Extrasynthèse) ; Chlorure de malvidine 95% (Extrasynthèse).

### 1.3. Lignées cellulaires

Pour cette étude, deux lignées cellulaires de cancer humain ont été utilisées dont les cellules mammaires cancéreuses MCF-7 (HTB-22, ATCC) et la lignée cellulaire de carcinome ovarien humain IGROV (SCC203 / IGROV-1, Aldrich). Toutes ces cellules ont été procurées par le laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

### 1.4. Préparation des extraits

Six grammes (6 g) de poudre de chaque matériel végétal ont été extraits aux ultrasons avec 150 mL de méthanol absolu, pendant 30 min, au moyen d'un sonificateur SOLEX 180 (R.E.U.S., Contes, France) (25 kHz, 120 W). Le prototype utilisé, est composé d'un réservoir inoxydable d'une

capacité de 0,8 L et d'une sonde ultrasonique de 13 cm de diamètre. L'intensité acoustique électrique dissipée par cette sonde est de 0,905 W.cm<sup>-2</sup> calculée par la formule  $I = P / \pi r^2$  où r est le rayon de la sonde, et P sa puissance d'entrée. L'extrait obtenu est ensuite filtré puis évaporé à sec. Chaque opération est répétée trois fois. Le rendement (Rdt en %) correspondant à chaque matrice végétale a été déterminé.

$$Rdt = \frac{\text{Masse d'extrait sec} \times 100}{\text{Masse de matériel végétal}}$$

### 1.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques d'extraits totaux

#### 1.5.1. Teneur en phénols totaux (TPT)

Les polyphénols totaux de chaque extrait ont été dosés via le kit pré-fait en référence à la méthode utilisée par Singleton et Rossi (1965), reprise par Yizhong et al. (2004).

On prépare séparément dans des tubes à hémolyse des solutions constituées de blanc réactif, d'étalon (acide gallique) et d'échantillon à doser.

-A 20 µL d'eau distillée, on ajoute 2 mL du chromogène constitué du réactif de Folin-Ciocalteu : c'est le blanc réactif.

-A 20 µL d'étalon (acide gallique 3 g/L), on ajoute 2 mL de chromogène : c'est la solution étalon.

-A 20 µL de chaque échantillon (extrait végétal méthanolique à 0,005 g/mL), on ajoute 2 mL du chromogène : c'est l'échantillon.

Chaque solution est agitée à l'aide d'un vortex puis après 1 minute de repos, on complète à chaque solution 1 mL du tampon carbonate de sodium et on agite une seconde fois au vortex.

Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance des solutions d'échantillon et celle de l'étalon sont mesurées par spectrophotométrie (Biochrom-libra S6) à 720 nm par rapport à la solution d'eau distillée représentant le blanc réactif. Chaque expérience est répétée trois fois au niveau des échantillons. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g d'échantillon) après une première transformation utilisant l'expression :

$$[(\text{Abs.échantillon} - \text{blanc réactif}) / (\text{Abs.Standard} - \text{blanc réactif})] \times 3 = \text{g/L d'acide gallique.}$$

#### 1.5.2. Teneur en flavonoïdes totaux (TFT)

La méthode décrite par Hariri et al. (1991), utilisant le 2-aminoéthyl diphénylborate a été exploitée pour la détermination de la teneur en flavonoïdes totaux de chaque extrait.

On dispose pour ce dosage d'une solution mère d'étalon (quercétine 0,1 mg/mL) à partir de laquelle on réalise des dilutions successives (0,001 à 0,03 mg/mL) et d'une solution de chaque échantillon à doser, préparées à partir du MeOH 80%.

A 2 mL de la solution d'extrait ou d'échantillon, on ajoute 100 µL du réactif de NEU 1% (2-aminoethyl diphenyl borate). Après agitation au vortex, l'absorbance est mesurée à 404 nm au spectrophotomètre par rapport au blanc MeOH 80% (2,10 mL). Chaque expérience est répétée trois fois. L'étalonnage est réalisé à partir de la quercétine utilisée comme standard à différentes concentrations (0,001 à 0,03 mg/mL). Les résultats sont exprimés en équivalent quercétine (mg EQ/g) après transformation dérivant de la formule :

$$F = [(CEq \times Abs_{ext} / Abs_{sq}) / C_{ext}] \times 100.$$

CEq : Concentration de quercétine équivalente à l'extrait à une absorbance donnée de l'extrait sur la courbe d'étalonnage ;

Ab<sub>ext</sub> : Absorbance de l'extrait ;

Ab<sub>sq</sub> : Absorbance de quercétine ;

C<sub>ext</sub> : Concentration de l'extrait en matériel végétal.

### 1.5.3. Teneur en anthocyanes totaux (TAT)

$$\text{Anthocyanes totaux (mg Ecyd - 3 - glu / g d'échantillon)} = \frac{A \times M \times F \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times Q}$$

Où

$$A = \text{absorbance } A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700 \text{ nm}})_{pH 1,0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700 \text{ nm}})_{pH 4,5}.$$

M = masse molaire de l'anthocyane prédominant dans l'échantillon (449,2 g/mol)

F = facteur de dilution ; V = volume de l'extrait en L ; d = largeur de la cuvette en cm

ε = coefficient d'absorption molaire de cyanidine-3-glucoside (26 900 L/cm<sup>2</sup>mol) ;

Q = quantité d'extrait sec ou de poudre sèche en gramme (g).

### 1.5.4. Teneur en tanins totaux (TTT)

La méthode basée sur la formation du complexe protéine-tanins décrite par Hagerman et Butler (1978), a été utilisée avec quelques modifications.

On prépare préalablement une solution tampon A en dissolvant 9,8 g de NaCl dans 800 mL d'eau distillée, on ajoute 11,5 mL d'acide acétique glacial et on ajuste le pH à 4,9 avec une solution de NaOH jusqu'à 1 L ; et une solution tampon B constituée d'une solution mixte (à 1% de SDS et 5% de TEA v/v) à pH 9,4 ajusté avec du HCl.

Un millilitre (1 mL) d'extrait a été ajouté à 2 mL de solution de BSA à 1mg/mL préparée à partir de la solution tampon A. Le mélange est homogénéisé puis incubé à 4 °C pendant 24 h. Il est ensuite centrifugé à 1500 RPM pendant 15 min et le surnageant décante. Le précipité est dissous dans 5 mL de la solution tampon B. Un millilitre (1 mL) de FeCl<sub>3</sub> acide (10 nM de FeCl<sub>3</sub> préparé à partir de

Le dosage des anthocyanes monomères totaux a été effectué par la méthode actualisée par Lee et al. (2005) à travers une collaboration scientifique internationale.

On prépare pour ce dosage des solutions tampon KCl pH 1,0 (0,025 M), tampon acétate de sodium pH 4,5 (0,4 M), d'étalon (cyanidine-3-glucoside : 0,05 à 0,5 mg /mL) et des solutions d'échantillon à doser.

Dans un tube à hémolyse contenant 100 µL de la solution d'étalon ou d'échantillon à doser, on ajoute 2 mL du tampon KCl pH1 et dans un autre contenant 100 µL de la même solution on ajoute 2 mL du tampon CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na pH 4,5. Après agitation, chaque tube est laissé à température ambiante pendant 20 min et l'absorbance de chaque dilution est lue à 520 et 700 nm respectivement par rapport à un blanc constitué d'eau distillée (2,10 mL). Chaque expérience est répétée trois fois. La teneur en anthocyanes totaux est donnée en équivalent gramme de cyanidine-3-glucoside (mg ECyd-3-glu/g) d'échantillon. Elle est calculée selon la formule suivante :

HCl 0,01N) est ajouté puis le mélange est immédiatement homogénéisé au vortex et laissé au repos à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance due aux tanins présents dans le précipité est mesurée par spectrophotométrie à 510 nm contre un blanc où l'extrait est remplacé par le méthanol. La quantité de tanins dans chaque extrait est calculée en utilisant la courbe d'étalonnage issue du contrôle positif mené dans les mêmes conditions opératoires par une solution méthanolique d'acide tannique à différentes concentrations (0,025 à 0,5 mg/mL). Elle est exprimée en mg. L<sup>-1</sup> Equivalent acide tannique (EAT) à partir de la formule :

$$[2 \times (\text{Abs} - \text{Intersection}) \times F / \text{pente}]$$

$$\text{Abs} = 0,9903q - 0,0157 ;$$

q : quantité de tanins dans chaque extrait ;

F : facteur de dilution.

### 1.6. Détermination de l'activité antioxydante des colorants extraits

L'activité antioxydante (AA) des plantes étudiées est traduite par l'évaluation du pouvoir antiradicalaire par piégeage des radicaux libres de DPHH<sup>o</sup> ainsi que celle du pouvoir réducteur du fer (Fe<sup>3+</sup>) des différents extraits appliqués.

### 1.6.1. Mesure du Pouvoir antiradicalaire par piégeage des radicaux libres de DPPH

Le pouvoir antiradicalaire (ARP) de chaque extrait a été déterminé par la méthode de réduction du radical DPPH°, utilisée par Blois (1958).

Ainsi,  $6 \times 10^{-4}$  M de la solution stock de DPPH a été préparée par dissolution de 24,9 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. Par prélèvement de 10 mL de cette dernière solution, on prépare 100 mL de la solution test  $6 \times 10^{-5}$  M. Dans des tubes à hémolyse, on introduit 50  $\mu$ L de la solution méthanolique d'extrait à tester, on ajoute 2 mL de solution du DPPH  $6 \times 10^{-5}$  M. Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration de l'extrait, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm au spectrophotomètre. On réalise un blanc constitué de 2,05 mL de méthanol. Le contrôle test est constitué de 2 mL de la solution de DPPH additionnée de 50  $\mu$ L de méthanol. L'activité antioxydante, qui exprime la capacité des composés extraits de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH° en solution dans le méthanol selon la formule :

$$\% AA = [(Abscontrol - Abstest) / Abscontrol] \times 100.$$

Elle a été transformée en  $ARP = 1 / EC_{50}$  ; avec  $EC_{50}$  la concentration efficace de l'échantillon, exigée pour donner une diminution de 50 % de l'absorbance de la solution contrôle, constituée de méthanol et DPPH. Les valeurs ARP ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais par l'activité antioxydante.

### 1.6.2. Mesure du Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

Le pouvoir réducteur du fer ( $Fe^{3+}$ ) dans les extraits méthanoliques des plantes a été évalué en utilisant la méthode FRAP suivant le protocole décrit par Oyaizu (1986).

Un millilitre (1 mL) de l'extrait méthanolique à différentes concentrations (0,5 ; 1,0 et 2,0 mg/mL) est mélangé avec 1,25 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1,25 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est homogénéisé au vortex puis incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 min ; ensuite, 1,25 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction et les tubes sont centrifugés au 3000 rpm pendant 10 min. 1,0 mL du surnageant est combiné avec 1,0

mL d'eau distillée et 200  $\mu$ L d'une solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 0,1%. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 700 nm au spectrophotomètre contre un blanc semblablement préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. Le trolox est l'antioxydant standard utilisé pour le contrôle positif et son absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Son étalonnage a été effectué entre 20 et 120  $\mu$ g/mL. Le pourcentage de réduction de l'échantillon par rapport au standard trolox a été calculé selon la formule :

$$(\%) \text{ du pouvoir réducteur} = [1 - (1 - Ae/As)] \times 100.$$

$A_s$  = absorbance du standard pour la concentration maximale testée et

$A_e$  = absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

### 1.7. Cytotoxicité des extraits sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV

Le test de cytotoxicité a été effectué sur la lignée de cellules mammaires cancéreuses humaines (MCF-7) et la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire IGROV, selon la méthode décrite par Daycem et al., (2013). Ce test se traduit par l'évaluation des effets de chaque extrait de plantes étudiées sur la croissance cellulaire. Les cellules sont dénombrées dans des flasques de culture puis ensemencées dans une plaque de 96 puits à raison de  $2,5 \cdot 10^3$  cellules par puits. Les plaques sont mises dans l'incubateur durant 24 h à 37 °C, dans une atmosphère à 5% de  $CO_2$ . Le 2<sup>ème</sup> jour, les extraits sont ajoutés au milieu, à concentration de 50 mg/L, puis les plaques sont mises à incuber pendant 72 heures. Ensuite, les cellules sont traitées avec 100  $\mu$ L d'une solution de MTT (0,2 mg/mL dans le PBS) à 37°C pendant 2 h. Le produit de réduction du MTT obtenu, est solubilisé dans 50  $\mu$ L d'isopropanol afin de favoriser la lecture au spectrophotomètre de l'absorbance du formazan à 540 nm. Les expériences ont été répétées trois fois contre un blanc sans extrait, analysé dans les mêmes conditions. Les effets cytotoxiques des extraits ont été évalués en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire suivant l'expression :

$$Rdt = \frac{(Abs.témoin - Abs.extrait) \times 100}{Abs.témoin}$$

Abs.témoin étant l'absorbance lue au niveau des puits de cellules sans extrait.

### 1.8. Analyses des données et corrélation activité antioxydante et teneur en polyphénols

Les données ont été traitées avec le logiciel Excel et exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types des mesures après trois répétitions. Les valeurs issues des différents dosages de composés polyphénoliques ont été mises en relation avec l'activité antioxydante à travers l'usage du logiciel

mathématique R version 2.15.2. Une Analyse en Composante Principale (ACP) a été effectuée dans le but d'établir la corrélation entre les différentes familles de composés dosées dans les plantes d'une part et entre ces composés et l'activité antioxydante d'autre part.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Rendement d'extraction et teneur en phénols, en flavonoïdes, en tanins et en anthocyanes totaux

Les résultats d'extraction aux ultrasons, des colorants des plantes tinctoriales échantillonnées, ont révélé que le meilleur rendement  $26,06 \pm 0,84$  % est issu de *T. grandis* suivi de *K. senegalensis*  $17,82 \pm 0,71$  %, de *P. cyanescens*  $14,02 \pm 0,83$  % et de *I. tinctoria*  $11,19 \pm 0,43$  %. Le plus faible rendement  $9,83 \pm 0,21$  % est venu de *L. inermis*, en dépit de sa richesse en grands groupes chimiques comparée à *K. senegalensis*, *P. cyanescens* et *I. tinctoria*. En effet, le screening phytochimique effectué précédemment sur ces espèces, ont montré que *L. inermis* renferme en plus des tanins, flavonoïdes et leucoanthocyanes, des dérivés

quinoniques, terpènes, stéroïdes, mucilages, coumarines et composés réducteurs ; tandis que *T. grandis* contient de plus, des alcaloïdes, saponosides, et cardénolides (Fagbohoun et al., 2014). Le plus fort rendement en colorants extraits de cette dernière dénote de sa richesse en grands groupes de famille chimique. Ce résultat relève non seulement une variabilité en termes de richesse en groupes chimiques mais aussi en teneur de composés chimiques présents dans ces plantes, les plus polaires étant les plus extraits par le solvant méthanol utilisé.

L'évaluation des teneurs en polyphénols, flavonoïdes, tanins, et anthocyanes ainsi que les rendements en extrait des espèces étudiées sont présentées dans le tableau I.

**Tableau I** : Rendement et teneur en phénols, en flavonoïdes, en tanins et anthocyanes totaux

Espèce	Rendement (%)	TPT (mg EAG/g)	TFT (mg EQ/g)	TTT (mg.L <sup>-1</sup> EAT)	TAT (mgECyd-3-glu/g)
<i>T. grandis</i>	$26,06 \pm 0,84$	$307,08 \pm 8,56$	$104,9 \pm 0,84$	$392,53 \pm 1,16$	$7,14 \pm 0,58$
<i>L. inermis</i>	$9,83 \pm 0,21$	$197,97 \pm 6,47$	$47,86 \pm 0,72$	$1330,3 \pm 32,49$	nd
<i>K. senegalensis</i>	$17,81 \pm 0,71$	$427,59 \pm 4,05$	$6,76 \pm 1,47$	$1281,83 \pm 12,12$	nd
<i>I. tinctoria</i>	$11,19 \pm 0,43$	$35,33 \pm 1,55$	$17,88 \pm 2,38$	$519,09 \pm 31,95$	$3,55 \pm 0,19$
<i>P. cyanescens</i>	$14,02 \pm 0,83$	$43,18 \pm 2,83$	$31,18 \pm 1,24$	$434,27 \pm 22,24$	nd

EAG : Equivalent Acide Gallique; EQ : Equivalent Quercétine; EAT: Equivalent Acide Tanique; ECyd-3-glu: Equivalent Cyanidine-3-glycoside TPT: Teneur en phénols totaux; TFT : Teneur en flavonoïdes totaux ; TTT : Teneur en tanins totaux ; TAT : Teneur en anthocyanes totaux.

L'estimation des phénols totaux a mis en évidence que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont ceux de *K. senegalensis*, *T. grandis* et *L. inermis* avec respectivement une teneur de  $427,59 \pm 4,05$  ;  $307,08 \pm 8,56$  et  $197,97 \pm 6,47$  mg EAG/g; approximativement 3 à 12 fois plus élevée que celle des extraits méthanoliques de *P. cyanescens* et *I. tinctoria*.

La teneur en flavonoïdes totaux  $104,9 \pm 0,84$  mgEQ/g a été également élevée au niveau des colorants extraits de *T. grandis*, puis s'en suivent  $47,86 \pm 0,72$  et  $31,18 \pm 1,24$  mgEQ/g enregistrées respectivement au niveau de *L. inermis* et *P. cyanescens*. Les extraits issus de *I. tinctoria* ont présenté une teneur en flavonoïdes totaux moyennement faible de  $17,88 \pm 2,38$  mgEQ/g). La teneur la plus basse en flavonoïdes totaux a été

obtenue au niveau des écorces de *K. senegalensis* ( $6,756 \pm 1,47$  mgEQ/g).

Le dosage des tanins totaux a révélé que les feuilles de *L. inermis* contiennent plus de tannins avec une teneur évaluée à  $1330,3 \pm 32,49$  mg.L<sup>-1</sup>EAT, suivies de près par les écorces de *K. senegalensis* ( $1281,83 \pm 12,12$  mg.L<sup>-1</sup>EAT).

La plus faible teneur en tannins totaux a été enregistrée au niveau de *T. grandis* ( $392,53 \pm 1,16$  mg.L<sup>-1</sup>EAT). Il ressort de ces résultats, deux groupes d'espèces tannantes. Le premier groupe d'espèces riches en tannins est constitué des écorces de *K. senegalensis* et des feuilles de *L. inermis* dont les teneurs en tannins font environ deux à trois fois celles du second groupe constitué des feuilles de *T. grandis*, *P. cyanescens* et *I. tinctoria*.

Parmi les cinq plantes étudiées, seules *T. grandis* et *I. tinctoria* ont pu exprimer respectivement une teneur en anthocyanes totaux de  $7,14 \pm 0,53$  et  $3,55 \pm 0,019$  mgECyd-3-glu/g. Ce résultat complète celui du criblage phytochimique qui a relevé l'absence de cette famille de composés chimiques au niveau de *L. inermis*, *K. senegalensis* et *P. cyanescens* (Fagbohoun et al., 2014). Par contre, bien qu'ayant présenté la teneur la plus élevée en anthocyanes, les feuilles de *T. grandis* caractérisées par criblage phytochimique, n'ont pu révéler la

présence d'anthocyanes. Ce résultat serait lié au seuil de détection des substances caractérisée par des tests qualitatifs. En effet, les travaux menés par Onzo et al. (2014) ont montré que cette espèce contient d'anthocyanes.

## 2.2. Activités antioxydantes des extraits

L'activité antioxydante des extraits, exprimée en ARP dérivé d'une relation proportionnelle à la concentration efficace EC50 (ARP =1/ EC50), est consignée dans le tableau II :

**Tableau II** : EC<sub>50</sub> et ARP d'extraits de plantes et du standard trolox testés

Standard et extraits testés	Equation et R <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	ARP
<i>Trolox</i>	$y = -0,0464x + 0,6592$ R <sup>2</sup> = 0,99	$7,18 \pm 0,41$	$0,139 \pm 0,0079$
<i>T. grandis</i>	$y = -0,0158x + 0,6734$ R <sup>2</sup> = 0,98	$18,65 \pm 0,05$	$0,0533 \pm 0,00035$
<i>L. inermis</i>	$y = -0,0187x + 0,7259$ R <sup>2</sup> = 0,95	$18,56 \pm 0,023$	$0,0538 \pm 5,77E-05$
<i>K. senegalensis</i>	$y = -0,0386x + 0,6696$ R <sup>2</sup> = 0,98	$7,53 \pm 0,02$	$0,1323 \pm 0,00057$
<i>I. tinctoria</i>	$y = -0,102\ln(x) + 1,0777$ R <sup>2</sup> = 0,97	$962 \pm 0,152$	$0,00103 \pm 5,77E-06$
<i>P. cyanescens</i>	$y = -0,0016x + 0,6857$ R <sup>2</sup> = 0,98	$192,07 \pm 0,113$	$0,0052 \pm 0,00$

R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination des régressions induites par les échantillons testés

Le test au DPPH• a révélé que l'ARP de *K. senegalensis* est approximativement identique à celui du témoin trolox ; il est deux fois supérieur à celui développé par chacun des extraits provenant de *T. grandis*, et de *L. inermis*. Comparé au trolox, les pouvoirs antiradicalaires de *P. cyanescens* et *I. tinctoria* sont très faibles et par conséquent leur activité antioxydante. Il ressort de ces résultats trois groupes d'espèces botaniques d'activité antioxydante variable. Le premier groupe constitué principalement de *K. senegalensis* développe un fort pouvoir antioxydant à peu près identique à celui du trolox; le second groupe doté d'un potentiel antioxydant modéré est constitué d'extraits de *T. grandis*, de *L. inermis*. Le dernier groupe constitué de *P. cyanescens* et *I. tinctoria* est celui d'espèces présentant un faible pouvoir antioxydant.

Le pouvoir réducteur des extraits de plantes testés par la méthode FRAP (figure 1) est dose dépendante. Trois concentrations successives d'extraits ont été évaluées (0,5 ; 1,0 et 2,0 mg/mL) par rapport au trolox étalonné entre 20-120 µg/mL dont résulte l'équation :

$$y = 0,021x - 0,3947 \text{ et } R^2 = 0,99.$$

Les résultats du test FRAP ont montré qu'au niveau de chaque espèce, la réduction du Fe (3+) en Fe (2+) est plus importante au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en extrait. De même, pour des concentrations identiques appliquées, le pouvoir réducteur des extraits testés varie en fonction des espèces ; la plus forte concentration induisant le plus fort pouvoir réducteur  $15,73 \pm 0,014$  % obtenu au niveau de *K. senegalensis*. Les plus faibles pouvoirs réducteurs ont été obtenus au niveau des espèces *P. cyanescens* et *I. tinctoria*. Ce test a confirmé, pour l'essentiel, des résultats des tests conduits au DPPH.

Les données issues des différents dosages de composés polyphénoliques ont été mises en relation avec l'activité antioxydante à travers une analyse en composante principale (ACP), dans l'intérêt de corrélérer les différents groupes de composés dosés, entre eux d'une part (figure 2) et entre ces composés et l'activités antioxydantes d'autre part (tableau III).

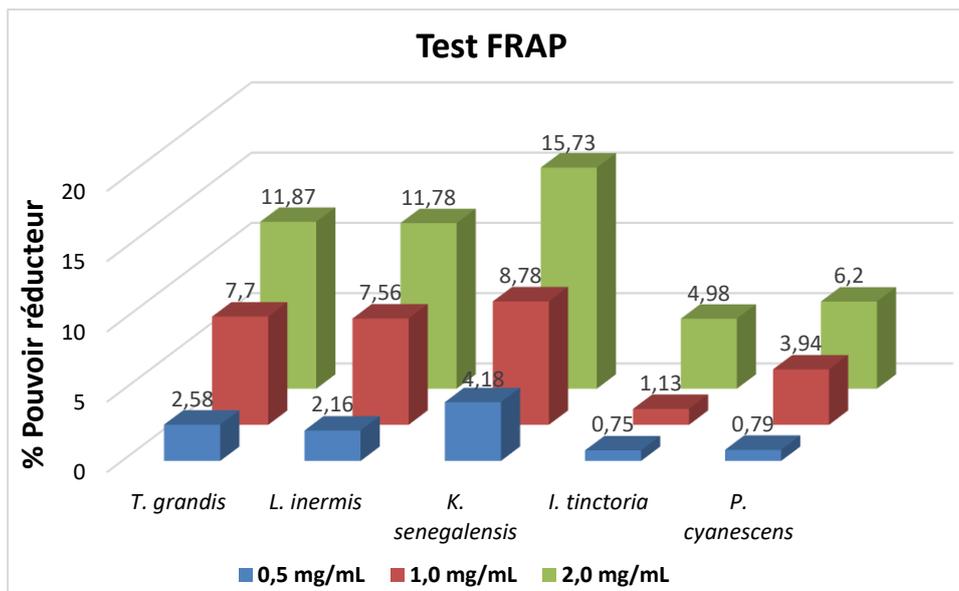


Figure 1 : Test FRAP traduisant le pouvoir réducteur dose-dépendante des extraits testés

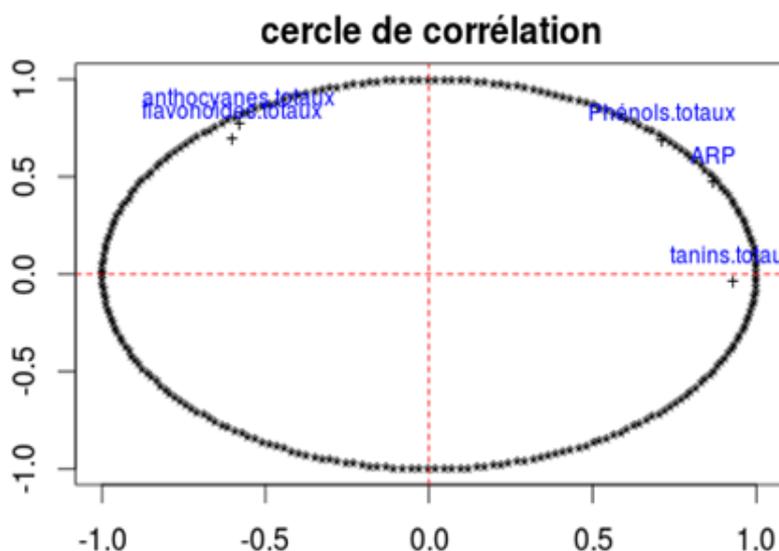


Figure 2 : Graphique d'observation et des variables de l'analyse en composantes principales basée sur la teneur en composés polyphénols et le pouvoir antiradicalaire des extraits testés.

Tableau III : Matrice de corrélations entre les différents composés polyphénoliques dosés et l'ARP, avec le coefficient de corrélation de Pearson

	TPT	TFT	TAT	TTT	ARP
TPT	1	0,02	0,13	0,59	0,96
TFT	0,02	1	0,82	-0,49	-0,22
TAT	0,13	0,82	1	-0,58	-0,14
TTT	0,59	-0,49	-0,58	1	0,74
ARP	0,96	-0,22	-0,14	0,74	1

Il ressort de l'ACP que l'ARP est fort positivement corrélé avec la teneur en phénols totaux ainsi qu'avec la teneur en tannins totaux présents dans

les extraits de plantes dosés ; tandis que les teneurs en phénols et en tannins totaux sont moyennement corrélées. De même, les teneurs en

anthocyanes et en flavonoïdes totaux sont positivement corrélées entre elles mais négativement corrélées avec les teneurs en phénols et en tanins totaux ainsi qu'avec l'ARP.

En effet, la forte corrélation ( $R^2 = 0,96$ ) entre l'ARP et les teneurs en phénols totaux ont démontré que l'activité antioxydante des extraits testés est fortement liée à la teneur en composés phénoliques présents dans ces plantes. De même, le pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes testés est déterminé par la teneur en tannins totaux contenus dans ces plantes avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,74$ . Par contre, les quatre familles de composés chimiques dosées, sont très peu corrélées entre elles, à part les teneurs en tanins et en phénols totaux ( $R^2 = 0,59$ ) et les teneurs en flavonoïdes et en anthocyanes totaux ( $R^2 = 0,82$ ).

Il existe une grande variabilité en teneur de polyphénols contenus dans chaque échantillon testé ; certains extraits sont plus riches en tannins alors que d'autres sont riches en flavonoïdes et pauvres en tannins... Malgré, cette disparité de répartition en composés phénoliques présents dans les extraits de plantes testés, il apparaît clair

d'après l'ACP que l'activité antioxydante de ces plantes est due à la teneur en composés phénoliques totaux qu'elles contiennent et plus loin à leur teneur en tanins totaux. Par ailleurs, il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, trolox, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Božovi'c et Ragno, 2017).

### 2.3. Cytotoxicité des extraits contre les cancéreuses MCF-7 et IGROV

Le potentiel anticancéreux des extraits bruts appliqués à une concentration de 50 µg/mL sur les cellules MCF-7 et IGROV, a montré une variation du pourcentage d'inhibition en fonction des espèces testées. Hormis *I. tinctoria*, tous les échantillons possèdent une toxicité non négligeable sur l'une ou l'autre des lignées cellulaires testées (tableau IV).

Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est issu de l'espèce *T. grandis*. En effet, son extrait brut méthanolique a induit une inhibition de  $95,1 \pm 4,3\%$  sur la lignée cellulaire MCF-7 et une inhibition moyenne ( $51,8 \pm 7,3\%$ ) sur la croissance de la lignée IGROV.

**Tableau IV** : Pourcentage d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV

Espèces	% inhibition	
	MCF-7	IGROV
<i>T. grandis</i>	$95,1 \pm 4,3$	$51,8 \pm 7,3$
<i>L. inermis</i>	$48,5 \pm 3,9$	$47,5 \pm 9,3$
<i>K. senegalensis</i>	$27,0 \pm 6,7$	$54,4 \pm 0,2$
<i>I. tinctoria</i>	nd	$13,4 \pm 2,1$
<i>P. cyanescens</i>	$47,2 \pm 1,4$	nd

Ce résultat avoisine celui de l'extrait hexanique des feuilles de teck (54%), sur les cellules embryonnaires du fibroblaste (CEF), trouvé par Mahesh et Jayakumar (2010) alors que l'extrait chloroformique des écorces, testé sur les cellules embryonnaires du rein humain (HEK 293) a fourni un résultat (95,3%) similaire à celui de l'extrait MeOH, bien que les organes exploités de la plante soient différents. L'inhibition de la croissance cellulaire induite par *L. inermis* (48%) est sensiblement identique sur les deux lignées cellulaires testées. Cette inhibition est proche de celle issue des travaux d'Endrini et al., (2002) sur *L. inermis* qui a induit une inhibition de 50 % des cellules MCF-7 à une dose  $24,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ , si l'on considère la population 105 de cellules testées, sans compter avec la cinétique de la dose-effet. Ces résultats ont indiqué également que certains

extraits ciblent spécifiquement des lignées cellulaires induisant leur destruction. En effet, les colorants extraits de *K. senegalensis* ont engendré un potentiel inhibiteur évalué à  $54,4 \pm 0,2\%$  sur les cellules IGROV tandis que celui de *P. cyanescens* est de  $47,2 \pm 1,4\%$  sur les cellules MCF-7 à la dose testée. L'écart plus ou moins important du pourcentage d'inhibition relevé entre les cellules MCF-7 et IGROV serait lié à la sensibilité différentielle des deux lignées face aux composés ou groupes de composés contenus dans les extraits testés ainsi qu'à leur teneur.

Il ressort que les plantes à indigo *P. cyanescens* et *I. tinctoria*, dont les extraits méthanoliques ont présenté les teneurs en phénols totaux et les activités antioxydantes les plus faibles sont également celles qui ont produit la plus basse activité cytotoxique. Toutefois, les études

effectuées par Paitoon et al., (2007) ont montré que l'indirubine, l'une des marqueurs de coloration des plantes à indigo, purifiée de *I. tinctoria*, a été active sur les cellules MCF-7 avec un potentiel d'inhibition de 42 % à concentration de 30 mM. Par-delà, de nombreux dérivés d'indirubine de synthèse, dont la 5-chloro-indirubine, la 3'-monoxime-indirubine..., ont donné des propriétés pharmacologiques très intéressantes contre les cellules cancéreuses (Damiens et al., 2001).

Par ailleurs, ce travail a montré que l'activité antioxydante est fortement corrélée avec la teneur en phénols totaux et en tanins totaux, mettant en avant *K. senegalensis* suivie de *T. grandis* et *L. inermis*. En effet, de nombreux travaux ont démontré que les polyphénols ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation (Debra et al., 2001 ; Bohm et al., 1998). Les composés contenant une structure ortho-trihydroxylée, comme les gallotanins et les proanthocyanidines galloylées montrent une forte activité contre les anions superoxydes(O<sub>2</sub>-) (Ursini et al., 2001). Il a aussi été démontré que les gallocatéchines ont la propriété de neutraliser les radicaux OH• et HOO• grâce à leur potentiel redox bas. On leur attribue également, des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers (Bohm et al., 1998 ; Vinson et al., 1995) ou encore des activités antitumorales et chimio-préventives (Lacaille-

## Conclusion

L'étude quantitative des extraits bruts méthanoliques de *T. grandis*, *L. inermis*, *K. senegalensis*, *I. tinctoria*, et *P. cyanescens* au moyen des dosages spectrophotométriques ont permis de déterminer leur teneur en polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes et tannins totaux). Les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de ces plantes est liée à la teneur en phénols totaux notamment en tanins, qu'elles renferment et que les espèces testées peuvent être désignées comme les plus intéressantes en termes de capacité antioxydante, suivant l'ordre :

*K. senegalensis* > *T. grandis* ≥ *L. inermis* > *P. cyanescens* > *I. tinctoria*.

## Remerciement

Les auteurs témoignent leur gratitude à M. François Adjibodé et à M. Emmanuel Petitcolas

Dubois et Wagner, 1996). La taille des proanthocyanidines polymériques joue aussi un rôle important. Les dimères et trimères ont une activité antioxydante plus forte que les oligomères de taille supérieure (Ursini et al., 2001). Ceci expliquerait, dans une certaine mesure, le fait que *L. inermis* présente un pouvoir antiradicalaire inférieur à celui de *K. senegalensis* (riche en tanins condensés) bien que cette espèce ait fourni la plus forte teneur en tanins.

A contrario, *K. senegalensis* a présenté une cytotoxicité faible sur les cellules cancéreuses étudiées, comparée à *T. grandis* et *L. inermis*. Bien que les composés phytochimiques ayant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires peuvent inhiber l'initiation et la progression d'une tumeur (Sharma et al., 2009), l'activité cytotoxique des extraits ne pourrait être attribuée aux seuls composés phénoliques dans le cadre de cette étude. En effet, hormis les polyphénols, *T. grandis* et *L. inermis* renferment des dérivés quinoniques (Fagbohoun et al., 2014). De nombreux travaux (Guerra et al., 2001 ; Khan et Mlungwana, 1999) ont rapporté que les anthraquinones comme le lapachol et ses dérivés, notamment le 5-hydroxylapachol constituent les principaux composés cytotoxiques isolés de *T. grandis*. De même, les propriétés pharmacologiques de *L. inermis* ont été associées à la 2-hydroxynaphthoquinone (Rani et al., 2007) et ses dérivés notamment l'isoplumbagin responsable de son activité cytotoxique ; (Endrini et al., 2007).

Par ailleurs, l'évaluation in vitro de l'activité cytotoxique des colorants extraits de ces plantes sur les cellules cancéreuses MCF-7 et IGROV, a révélé un fort effet antiprolifératif allant jusqu'à 95% pour de petites concentrations d'extraits testées notamment au niveau des espèces *T. grandis*, et *L. inermis*. Ces résultats sont très encourageants car certaines espèces testées semblent très actives pour lutter contre les cancers, véritables fléaux les plus meurtriers au monde. La poursuite de ces travaux va donc s'attacher à la purification des dérivés quinoniques contenus dans les deux espèces ayant présenté un potentiel cytotoxique assez fort sur les cellules cancéreuses étudiées.

pour leur assistance au cours des activités liées aux dosages des polyphénols.

## Références

- Akoegninou A., van der Burg W.J., van der Maesen L.J.G., 2006. Flore Analytique du Bénin, Leiden (Netherlands), Backhuys Publishers.
- Arbonnier M., 2002, *Arbres*. Arbustes et Lianes des Zones Sèches d'Afrique de l'Ouest, 2<sup>ème</sup> ed., Paris, CIRAD-MNHN.
- Azon-Kouanou A., Zannou D. M., Agbodande K. A., Agossou M., Gnintoungbe S., Gougounhoueto A. S., Ade G. et Houngbe F., 2015. Morbidité et mortalité par cancers dans le service de médecine interne du CNHU-HKM de Cotonou de 2003 à 2007. *Journal de la Société de Biologie Clinique du Bénin*, **22** : 51-56.
- Blois M.S., 1958. Antioxydant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **18**: 1199-1200.
- Bohm H., Boeing H., and Hempel J., 1998. Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **37**(2): 147-63.
- Božović M., and Ragno R., 2017. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, **22**(290): 1-50.
- Coussens L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, **420**(6917): 860-867.
- Damiens E., Baratte B., Marie D., Eisenbrand G. and Meijer L., 2001. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-oxime ; a CDK/GSK-3 inhibitor : induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene*, **20**: 3786-3797.
- Daycem K., Rabiaa M.S., Sameh A., Dhafer L., Mokhtar H. and Jalloul B., 2013. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology*, **55**: 202 - 208.
- Debra A., Pearson H. H. S., Lazarus S. A., and Keen C. L., 2001. Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Methods in Enzymology*, **335**: 350-360.
- Endrini S., Rahmat A., Ismail P. and Taufiq-Yap Y.H., 2007. Comparing of the cytotoxicity properties and mechanism of *Lawsonia inermis* and *Strobilanthes crispus* extract against several cancer cell lines. *J. Med. Sci.*, **7**(7): 1098-1102.
- Endrini S., Rahmat A., Ismail P. and Yun Hin T-Y., 2002. Anticarcinogenic properties and antioxidant activity of Henna (*Lawsonia inermis*). *J. Med. Sci*, **2**(4): 194-197.
- Fagbohoun L. and Vieillescazes C., 2020. Cultural Heritage Objects of Southern Benin: Plant Dyes and Exudates Used in Their Confection, Book Heritage, Daniela Turcanu-Carutiu, Ovidius University Romania.
- Fagbohoun L, Gbaguidi A.F., Ayedoun M.A., Mathe C., Moudachirou M., Vieillescazes C., 2014. Etudes ethnobotanique et phytochimique des plantes tinctoriales sources de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal (Ifangni/Bénin). *Ethnopharmacologia*, **52**: 56-66.
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Piñeros M., Znaor A. and Bray F., 2019, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer*, **144**: 1941-1953.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D. and Bray F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, **136**: 359-386.
- Guerra M., de O., Mazoni A. S. B., Brandao M. A. F. and Peters V.M., 2001. Toxicology of lapachol in rats: Embryo lethality. *Rev. Brasil. Biol.*, **61**(1): 171-174.
- Hagerman A.E. et Butler L.G., 1978. Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, **26**: 809-812.
- Hariri E.B., Sallé G. et Andary C., 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma*, **162**: 20-26.
- Jansen P.C.M. et Cardon D., 2005. Colorants et tanins Ressources végétales de l'Afrique tropicale, PROTA 3, Fondation Prota Wageningen, Backhuys, Leiden, Netherlands.
- Khan R.M. and Mlungwana S.M., 1999. 5-Hydroxylapachol: a cytotoxic agent from *Tectona grandis*. *Phytochemistry*, **50** : 439-442.
- Lacaille-Dubois M.A. and Wagner H., 1996. Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica*, **143**(6) : 555-562.
- Lee J., Durst R. W., Wrolstad R. E. et collaborateurs, 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, **88** (5):1269-1278.
- Luqmani Y.A., 2005. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practices*, **14** (1): 35-48.
- Mahesh S.K. and Jayakumaran N.A., 2010. Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potential of Different Extracts from Leaf, Bark and Wood of *Tectona grandis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, **2**(2): 155-158.
- Onzo C. F., Azokpota P., Agbani P., Gbaguidi F., Hounhouigan J. D. et Kossou D., 2014. Caractéristiques physico-chimiques, phytochimiques et toxicité des espèces végétales utilisées comme emballages alimentaires en Afrique de l'Ouest. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(4): 1504-1516.
- Oyaizu M., 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**: 307-315.
- Ozyilkan O., Colak D., Akcali Z., Basturk B., 2005. Olive : Fruit of Peace Against Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*, **6**: 77-82.
- Paitoon A., Supachok S., Suree P. and Shui-Tein C., 2007. Simple Purification of Indirubin from *Indigofera tinctoria* Linn. and Inhibitory Effect on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Chiang Mai J. Sci.*, **34**(3): 329-337.

- Rani S., Da-Hong W., Yoko T., Ken T., Noriyoshi M., Kuniaki S., Masako H., Bing-Ling W. and Keiki O., 2007.** Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. *Toxicology*, **235**: 103–111.
- Schottenfeld D., Beebe-Dimmer J., 2006.** Chronic Inflammation: a Common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. *CA Cancer J. Clin.*, **56**: 69–83.
- Sharma P., Parmar J., Verma P., Goyal P. K., 2009.** Antitumor activity of *Phyllanthus niruri* (a Medicinal Plant) on chemical-induced skin carcinogenesis in mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, **10**: 1089–1094.
- Singh A. and Settleman J., 2010.** EMT cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, **29**(34): 4741–4751.
- Singleton V.L. and Rossi J.A.J., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*, **16**: 144–158.
- Temidayo D. P., Olufunsho A., Adeola O., Nkechinyerem O., Chioma U., Amos A. F., 2016.** Three indigenous plants used in anti-cancer remedies, *Garcinia kola* Heckel (stem bark), *Uvaria chamae* P. Beauv. (root) and *Olax subscorpioidea* Oliv. (root) show analgesic and anti-inflammatory activities in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, **194**: 440–449.
- Tohinnou H.C.V.G., 2019.** Ethnobotanique et Ecologie des plantes anticancéreuses dans les départements de l’Ouémé et du Littoral au Bénin. Thesis for obtaining the Master degree in Agronomy Uuniversity of Abomey-Calavi, Benin.
- Ursini F., Rapuzzi I., Toniolo R., Tubaro F. and Bontempelli G., 2001.** Characterization of antioxidant effect of procyanidins. *Methods in Enzymology*, **335** : 338–350.
- Varichon A., 2005.** Couleurs pigments et teintures dans les mains des peuples, Editions du Seuil, Paris, France.
- Vinson J. A., Dabbagh Y. A. and Serry M. M., 1995.** Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 2800–2802.
- Yizhong C., Qiong L., Mei S., Harold C., 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**: 2157–2184.