

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU D MAMMARI DE TIZI OUZOU FACULTE DES SCIENCES
BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme De MASTER En sciences biologiques

Option : Biochimie Appliqué

Thème

Evaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif et cytotoxique de la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L.

Rédigé par :

OUGUEMAT Anaïs

Soutenu devant le jury :

M ^{me} : AICHE-IRATNI G.	Maitre de conférences B	UMMTO	Président
Mr HOUALI K.	Professeur	UMMTO	Promoteur
M ^{me} OUZID Y.	Maitre de conférences B	UMBB	Co-promotrice
Mr MOUALEK I.	Maitre de conférences A	UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), au sein de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, département de Biochimie Microbiologie de l'université Mouloud Mammeri, sous la direction du Professeur HOUALI KARIM, à qui j'adresse ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur HOUALI K. professeur à UMMTO, pour m'avoir proposé ce sujet.

Je tiens à remercier Madame IRATNI G. maitres de conférences classe B qui m'a guidé durant la réalisation de ce travail, d'avoir pu bénéficier de ses précieux conseils et d'avoir acceptée de présider le jury

Je remercie Madame OUZID Y. Maitre de conférence classe B, d'avoir accepté de Co-encorder ce mémoire, et à qui j'exprime ma profonde reconnaissance pour ses conseils et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier Mr MOUALEK K. maitre de conférence classe A, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire.

A la fin je remercie toute personne ayant contribué de prêt ou de loin dans l'élaboration et l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A Mes parents, pour tous leur amour, leurs sacrifices et leurs encouragements, Que dieu les protège.

A mon très cher frère Anis.

A monsieur CHAFAI pour on aide et son soutien.

A ma famille et amis pour lesquels j'exprime ma sympathie.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide désoxyribonucléique messenger

CDK : Kinases dépendantes des cyclines

PDB: Potato Dextrose Broth

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase.

G1: Gap 1 (intervalle 1).

G2: Gap 2 (intervalle 2).

PLAN

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Summary	
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre I : présentation des plantes médicinales étudiées

1.1. <i>Peganum harmala</i> L.	2
1.1.1. Présentation de l'espèce <i>Peganum harmala</i> L.	2
1.1.2. Classification botanique	3
1.1.3. Répartition géographiques	3
1.1.4. Usage traditionnelle	4
1.1.5. Etude photochimique.....	4
1.1.6. Les alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i> L.	6
1.1.6.1. Les β -carbolines	6
1.1.6.2. Les quinazolines.....	8
1.2. <i>Verbascum sinuatum</i> L.	9
1.2.1. Présentation de l'espèce <i>Verbascum sinuatum</i> L.	9
1.2.2. Classification botanique	9
1.2.3. Répartition géographique du genre <i>Verbascum</i> et de l'espèce <i>Verbascum sinuatum</i> L. ...	10
1.2.4. Usage traditionnelle.....	11
1.2.5. Etude photochimique	11
1.2.6. Les alcaloïdes de genre <i>Verbascum</i>	13

Chapitre II : le cycle cellulaire et Les principales cibles des agents antiprolifératifs et cytotoxiques

2.1 Description du cycle cellulaire	14
2.2. Les différentes phases du cycle cellulaire	14
2.1.1. L'interphase.....	14
2.1.2. La mitose	15

2.1.2.1. La prophase	15
2.1.2.2. La métaphase	15
2.1.2.3. L'anaphase	15
2.1.2.4. La Télaphase	15
2.2. Les principales cibles des agents antiprolifératifs et cytotoxiques	16
2.2.1. Action sur le fuseau mitotique	16
2.2.2. Action sur l'ADN	18
2.2.3. Action sur l'enzyme tyrosine kinase	19

Partie Expérimentale

1. Matériel et méthodes	20
1.1 Matériel	20
1.1.1. Matériel biologique	20
1.1.2. Matériels du laboratoire	20
1.1.3. Réactifs et solvants	21
1.1.4. Préparation de milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth)	22
1.2. Méthodes	22
1.2.1. Préparation des fractions d'alcaloïdes des feuilles de <i>P.harmala</i> L. et <i>V.sinuatum</i> L.	22
1.2.2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antiproliférative des fractions d'alcaloïdes des plantes étudiées.....	24
1.2.2.1. Préparation de l'inoculum de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.2.2.2. Le test antiprolifératif	24
1.2.2.2.1. Action de bleu de méthylène	24
1.2.3. Etude statistique	26
2. Résultats et discussion.....	26
2.1. Synthèse des résultats.....	28
Conclusion.....	31
Références bibliographiques	32
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : vue d'ensemble de la plante <i>Peganum harmala</i> L.....	2
Figure 2 : les différentes parties de la plante <i>Peganum harmala</i> L.....	2
Figure 3 : structure de base de la molécule β -carbolines.	6
Figure 4 : schéma général de biosynthèse des alcaloïdes de β -carbolines.....	8
Figure 5 : structure générale des quinazolines de <i>Peganum harmala</i> L.	8
Figure 6 : aspect morphologique de <i>Verbascum sinuatum</i> L.....	9
Figure 7 : les différentes parties de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	9
Figure 8 : aire de répartition du genre méditerranéen <i>Verbascum</i> L.....	10
Figure 9 : les différentes phases de la mitose.....	14
Figure 10 : la structure de la micro tubuline.	16
Figure 11 : structure de Quercetine.....	19
Figure 12 : cellules de Malassez.	21
Figure 13 : Schéma d'extraction des alcaloïdes totaux (HARBONE, 1998).....	23
Figure 14 : les différentes étapes du test antiprolifératif.....	25
Figure 15 : pourcentages de cytotoxicité de différentes fractions testées.....	28

Liste des tableaux

Tableau 1 : les propriétés thérapeutiques de <i>Peganum harmala</i> L.	4
Tableau 2 : les différents métabolites secondaires des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.....	5
Tableau 3 : Les principaux alcaloïdes β -carbolines de l'espèce <i>Peganum harmala</i> L.	7
Tableau 4 : les propriétés thérapeutiques des différentes parties de <i>Verbascum sinuatum</i> L.....	11
Tableau 5 : les différents composés photochimiques de genre <i>Verbascum</i>	12
Tableau 6 : quelques alcaloïdes du genre <i>Verbascum</i> et leur activité biologiques.	13
Tableau 7 : les différents agents mitotiques et leurs mode d'action.	17
Tableau 8 : les différents types d'anticancéreux cytotoxiques et leurs modes action	18
Tableau 9 : Appareillage, verreries et autres matériels utilisés.....	21
Tableau 10 : Réactifs et solvants.	22
Tableau 11 : Les différents pourcentages de cytotoxicité : des fractions d'alcaloïdes testées, le standard et le témoin négatif	27

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source très importante de métabolites bioactifs naturels à l'origine de plusieurs activités biologiques, à savoir Antioxydante, antiproliférative, anti-inflammatoire, cytotoxique, antimototique... C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressées aux deux plantes médicinales du bassin méditerranéen très utilisées en médecine traditionnelle : *Verbascum sinuatum* L. et *Peganum harmala* L.. La présente étude vise à évaluer l'effet antiprolifératif et cytotoxique des fractions d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L.. Le test antiprolifératif a été réalisé par la méthode de coloration au bleu de méthylène en utilisant la levure de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote et la colchicine comme standard. La colchicine et les fractions d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L. ont inhibé la croissance cellulaire des levures avec des potentiels cytotoxiques différents. Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. est estimé à 67.29 %, quant à la fraction d'alcaloïdes de *Verbascum sinuatum* L. a exprimé une activité antiproliférative plus élevée avec un pourcentage de cytotoxicité de 76.36%. La colchicine représente l'effet antiprolifératif le plus faible avec un pourcentage de cytotoxicité estimé à 55.70 %

Mots clés : Alcaloïdes, *Peganum harmala* L. *Verbascum sinuatum* L. *Saccharomyces cerevisiae*, Effet anti prolifératif, cytotoxicité.

Summary

Medicinal plants constitute a very important source of natural bioactive metabolites at the origin of several biological activities, namely antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory, cytotoxic, antimutagenic... It is in this perspective that we are interested in two medicinal plants of the Mediterranean basin very used in traditional medicine: *Verbascum sinuatum* L. and *Peganum harmala* L.. The present study aims at evaluating the antiproliferative and cytotoxic effect of alkaloid fractions of the leaves of *Peganum harmala* L. and *Verbascum sinuatum* L.. The antiproliferative assay was performed by the methylene blue staining method using *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a eukaryotic cell model and colchicine as a standard. Colchicine and alkaloid fractions of *Peganum harmala* L. and *Verbascum sinuatum* L. leaves inhibited yeast cell growth with different cytotoxic potentials. The percentage of cytotoxicity of the alkaloid fraction of *Peganum harmala* L. leaves is estimated 67.29 to %, while the alkaloid fraction of *Verbascum sinuatum* L. expressed higher antiproliferative activity with a percentage of cytotoxicity of 76.36%. Colchicine represents the lowest antiproliferative effect with an estimated percentage of cytotoxicity of 55.70 %.

Key words: Alkaloids, *Peganum harmala* L. *Verbascum sinuatum* L. *Saccharomyces cerevisiae*, Antiproliferative effect, cytotoxicity.

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales représentent une source importante d'une grande variété de molécules bioactives ayant des propriétés thérapeutiques remarquables (activité antioxydant, activité anti-inflammatoire, anti tumorale...), pouvant traiter et soigner plusieurs maladies humaines (KUMAR *et al.*, 2015). Ces molécules sont connues sous le nom de métabolites secondaires et sont classés selon leur structure en plusieurs groupe : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (RHATTAS, 2016).

Selon l'OMS (2006), le cancer présente une des causes majeures de décès dans le monde. Il existe plusieurs type de traitement pour lutter contre cette maladie, notamment la chimiothérapie qui est basée sur l'administration de médicaments ayant le pouvoir d'entraver la prolifération des cellules tumorales en induisant leur apoptose, mais malheureusement le coût de ce traitement est très onéreux, de plus il présente de nombreux effets secondaires du fait de leur mode action non spécifique (FAURE, 2010). Le retour à la phytothérapie ouvre une voie prometteuse dans le développement de nouvelles molécules bioactives d'origine végétale afin de proposer des thérapies beaucoup plus spécifiques et moins toxiques pour les cellules saines (FARNSWORTH et KASS, 1986).

A ce sujet, on s'est intéressé aux plantes médicinales *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. considérées parmi les plantes médicinales les plus célèbres dans la médecine traditionnelle (BOULLARD, 2001). Leurs effets thérapeutiques sont dus à la richesse de ces plantes en des composés pharmacologiquement actifs.

L'objectif de notre travail consiste à évaluer *in vitro* l'effet antiproliférative et cytotoxique des fractions d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. Pour cela, on a présenté en premier temps quelques connaissances dans la partie bibliographique sur : Les caractéristiques botaniques des plantes étudiées et leurs études photochimiques. Quant à la partie expérimentale décrit la méthodologie suivie, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et comparaisons avec d'autres résultats publiés dans la littérature scientifique.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Présentation des plantes médicinales étudiées

1.1. *Peganum harmala* L.

1.1.1. Présentation de l'espèce *Peganum harmala* L.

Peganum harmala L. aussi appelé harmel, rue de Syrie ou rue sauvage est une plante vivace, buissonnante de la famille de Zygophyllacées. Elle est largement distribuée à travers le monde, généralement dans le nord du continent africain jusqu'au nord des indes et en Mandchourie, au Tibet ou encore en Sibérie (BRUNETON, 2009). Cette herbacée pousse naturellement sur les décombres, les bords de chemins et les parcours steppiques dégradés (ISERIN, 2001). *Peganum harmala* L. peut mesurer jusqu'au 90cm de hauteur. Son rhizome est épais, possédant une odeur forte désagréable. Elle porte des feuilles très divisées en lanières de couleur vert –glaucue, ses fleurs sont assez grandes (25 à30 mm), solitaires, à 5 pétales (5 sépales et de 10 à15 étamines) de couleur blanc-jaunâtre veinées de vert (WATSON *et al.* , 2011) le fruit est une capsule globuleuse devisées en trois loges renfermant des graines brunâtre de saveur amère (CHOPRA *et al.*, 1960 ; NEGRE, 1962).



Figure 1 : vue d'ensemble de la plante *Peganum harmala* L. (WECKESSER, 2013).

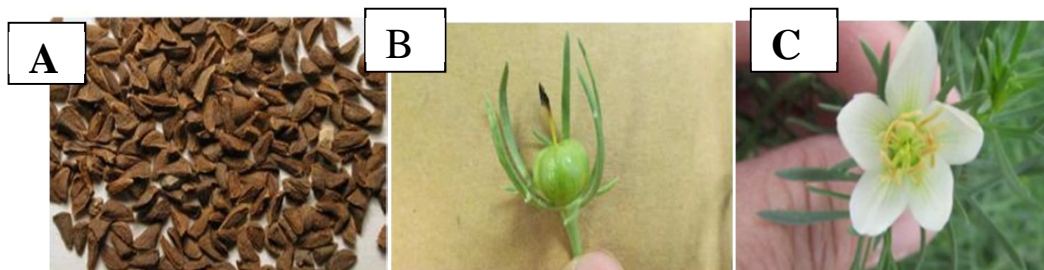


Figure 2 : les différentes parties de la plante *Peganum harmala* L. (WECKESSER, 2013).

A : grains ; B : fruit ; C : fleur

1.1.2. Classification botanique

La classification botanique de *Peganum Harmala L.* est donnée ci-dessous selon (MOGHADAM *et al.*, 2010).

Règne : Plantes

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Malvides

Ordre : Sapindales

Famille : Zygophyllaceae

Genre : *Peganum*

Espèce : *Peganum harmala L.*

1.1.3. Répartition géographique

Peganum harmala L. est largement distribuée dans le monde, particulièrement ré pondue dans les régions arides méditerranéennes, dans les sols sableux et nitrés. Son aire de répartition est :

- ❖ En Europe, elle est très commune dans les zones sèches de l'Espagne à Hongrie jusqu'aux steppes de la Russie méridionale (YOUSSEFI *et al.*, 2009).
- ❖ En Asie, elle est ré pondue dans les steppes de l'Iran et du Turkestan jusqu'aux Tibet (BEZANGER *et al.*, 1980).
- ❖ En Afrique, particulièrement abondante dans les zones arides méditerranéennes (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux d'Algérie, Tunisie, Steppes de la Lybie, déserts d'Egypte (OZENDA, 1991 ; CHOPRA *et al.*, 1960).

1.1.4. Usage traditionnelle

Peganum harmala L. présente un intérêt en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter plusieurs maladies. Ses propriétés thérapeutiques sont consignées dans le tableau suivant :

Tableau 1: les propriétés thérapeutiques de *Peganum harmala* L.

Maladies	Effets	Référence
Maladies cardiovasculaires	Antihypertenseur, hypotenseur, Purificateur de sang antiagrégants plaquettaires	(AI-QURAN, 2008) (SAEED <i>et al.</i> , 1991)
Maladies Gastro-intestinal	Anti diarrhéique, antispasmodique	(Farouk <i>et al.</i> , 2008 ; GOEL <i>et al.</i> , 2009)
Maladies neurologique	Antiparkinsonien, Narcotique, Analgésique	(ASHTON., 2012)
Néoplasme et tumeurs	Effet cytotoxique sur les lignées cellulaires tumorales	(CHEN <i>et al.</i> , 2005)
Maladies pulmonaires	agit comme un bronchodilatateur dans les maladies telles que l’asthme, l’emphysème, Pneumonie et la bronchite.	(MAHMOUDIAN <i>et al.</i> , 2002)
Maladies infectieuse	Antiparasitaire (Antipaludique) Antibactérien (contre le tétanos néonatal), Antifongique	(MONSEF <i>et al.</i> , 2004) (ASTULLA <i>et al.</i> , 2008) (NENAAH, 2010)
Autres maladies	Antidiabétique, Antiseptique, cicatrisant, Emménagogue utilisé contre le rhumatisme	(JINOUS et FERESHTEH., 2012) (ISERIN, 2001)

1.1.5. Etude phytochimique

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques de structures variées, qui remplissent des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes comme la communication intercellulaire, la défense contre les agressions d’origine biotique ou abiotique, la régulation des cycles catalytiques et l’amélioration de la production (FREIDEL, 1980). Ces composés sont classés en 3 grandes groupes : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes (DERBEL, 2005).

Des études photochimiques réalisées sur les feuilles de *Peganum harmala* L. ont permis d'identifier plusieurs types de métabolites secondaires comme les alcaloïdes, présent en grand quantité suivie par les coumarines, les saponosides, les flavonoïdes, les anthocyanes, les stérols, les terpènes et les tannins (AL YAHYA, 1986) consignés dans le tableau 2.

Tableau 2 : les différents métabolites secondaires des feuilles de *Peganum harmala* L.

Métabolites Secondaire	Molécules identifiées	Activités biologiques	Références bibliographiques
Poly phénols	Flavonoïde	VitaminiqueP Antioxydante Anti-inflammatoire Antitumorale Anticarcinogène Antiulcéreuse	(FAROUK <i>et al.</i> , 2009 ; LINK <i>et al.</i> , 2010)
	Coumarines	Antioxydante anticoagulante antiœdémateuse	(BRUNETON, 2009 ; AKROUM, 2011).
	Quinones	Antibactérienne Antifongique Antivirale	(NENNAH, 2010)
Saponosides	NI	Cytotoxique et Antitumorale	(BRUNETON, 2009)
Caroténoïdes	α -carotène β -carotène	Antitumorale	(PIKARD <i>et al.</i> , 2009)
Huiles essentiels	Terpènes et stérols	Antidiabétique Activités contre les anuries et l'hypertension	(ASHTON, 2012)

1.1.6. Les alcaloïdes de *Peganum harmala* L.

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basique d'origine naturelle, provenant essentiellement des plantes médicinales, Ils sont formés à partir des acides aminés mais il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur où l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (HESSE, 2002). Quelques structures d'alcaloïdes sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes. Ils peuvent être classés en fonction de leur précurseur, On distingue trois grandes classes (alcaloïdes vrais, proto-alcaloïdes, pseudo-alcaloïdes) (BRUNETON, 1999).

L'espèce *Peganum harmala* L. est très riche en alcaloïde indoliques de type β -carbolines et en alcaloïdes quinazolines.

1.1.6.1. Les β -carbolines

L'harmaline, l'harmine, l'harmalol, l'harmol et le tétrahydroharmine sont identifiés et quantifiés comme étant les principaux alcaloïdes β -carbolines de *Peganum harmala* L. (KARTAL *et al.*, 2003). Le taux de ces alcaloïdes est plus élevé dans les graines et les racines (3 à 4 %) que dans la feuille (0,52 %), et sont totalement absents dans les fleurs. L'harmine et l'harmaline s'accumulent dans les graines sèches à 4,3 et 5,6%, respectivement, d'harmalol à 0,6% et de tétrahydroharmine à 0,1%. Les racines contiennent l'harmine et l'harmol avec 2 et 1,4% respectivement (HERRAIZ *et al.*, 2010).

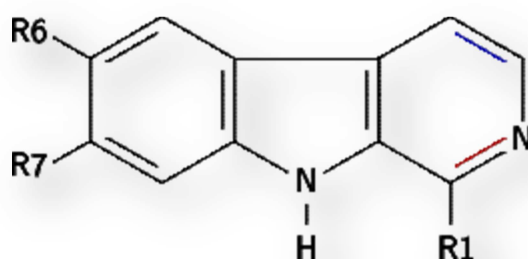
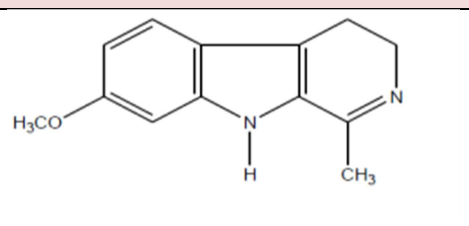
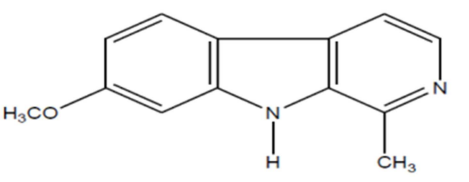
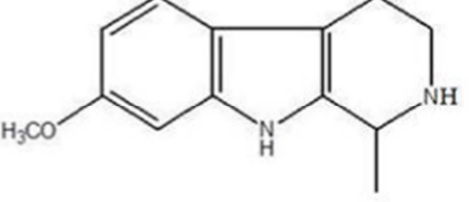
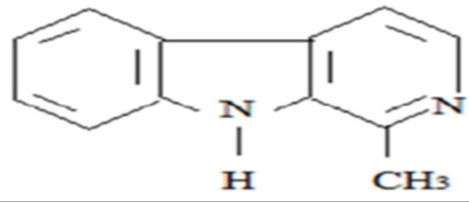
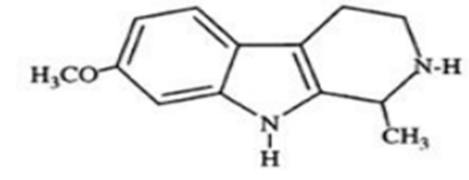


Figure 3 : structure de base de la molécule β -carbolines (MAYAD *et al.*, 2013).

Les principaux alcaloïdes β -carbolines de l'espèce *Peganum harmala* L. : L'harmaline, l'harmine, l'harmalol, l'harmol et le tétrahydroharmine (KARTAL *et al.*, 2003), sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les principaux alcaloïdes β -carbolines de l'espèce *Peganum harmala* L.

Les β -carbolines	Structure	Activité biologique	Référence
Harmaline C ₁₃ H ₁₅ ON ₂		Analgésique Anti nociceptive Hypoglycémiant	(FAROUK et al., 2008) (MONSEF et al., 2004) (SINGH et al., 2008)
Harmine C ₁₃ H ₁₂ ON ₂		Antifongique	(NENAAH, 2010)
Harmalol C ₁₂ H ₁₂ ON		Antibactérienne Antivirale	(MOGHADAM et al., 2010) (KIANI et al., 2010)
Harmol C ₁₂ H ₁₀ N ₂		Antiparasitaire Cytotoxique	(SOBHANI et al., 2002) NAFISI et al., 2010)
Tétrahydroharmine C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O		Antioxydant	FAROUK et al., 2008)

Les β -carbolines sont des composés hétérocycliques avec une structure pyrido indoliques. En effet le noyau de base est constitué d'un cycle pyridine fusionné avec un noyau d'indole par le cycle d'azole.les β -carbolines dérivent de l'acide aminé aromatique tryptophane, celui-ci subit une décarboxylation par la L-aminoacide décarboxylase aromatique (AADC) et induit la formation de la tryptamine. Une base de shiff est formée à partir de la tryptamine et un aldéhyde ou un cetoacide par la réaction de Pictet-Spengler, le composé obtenu est réorganisé par la réaction de Manish-Like aboutissant à la formation de tétrahydro- β -carbolines qui sera oxydé progressivement en dihydro- β -carbolines et β -carbolines (DEWICK, 2002).

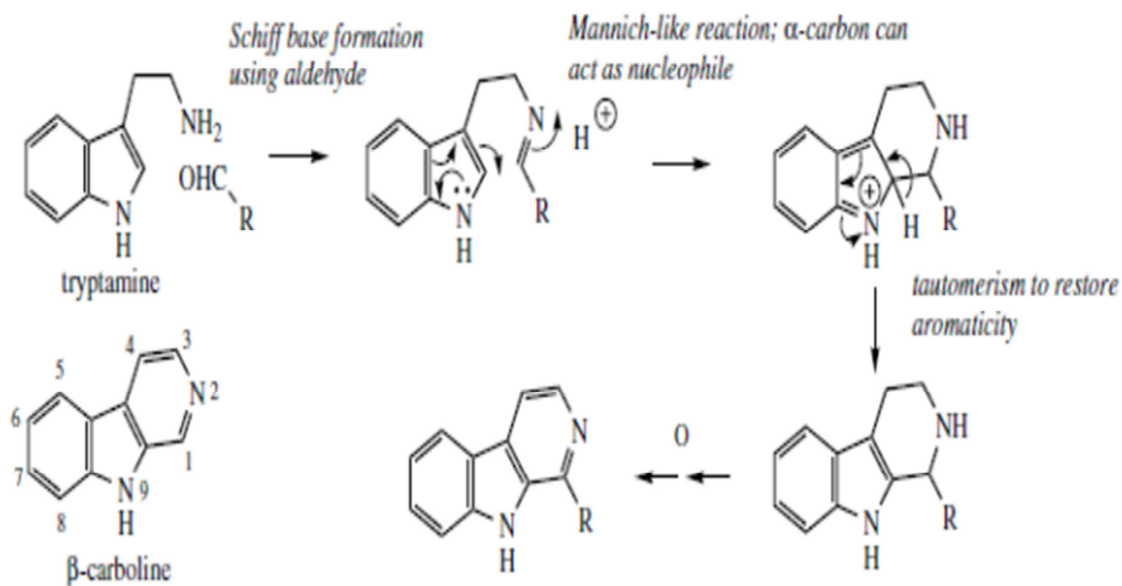


Figure 4: schéma général de biosynthèse des alcaloïdes de β -carboline (DEWICK, 2002).

1.1.6.2. Les quinazolines

Peganum harmala L. contient une autre classe d'alcaloïdes, les quinazolines, dérivés de l'acide anthranilique et qui sont représentés par la Péganine, le Vasicinone et la Desoxypéganine (figure 5) (KHASHIMOV *et al.*, 1969 ; ZHAREKEEV *et al.*, 1974).

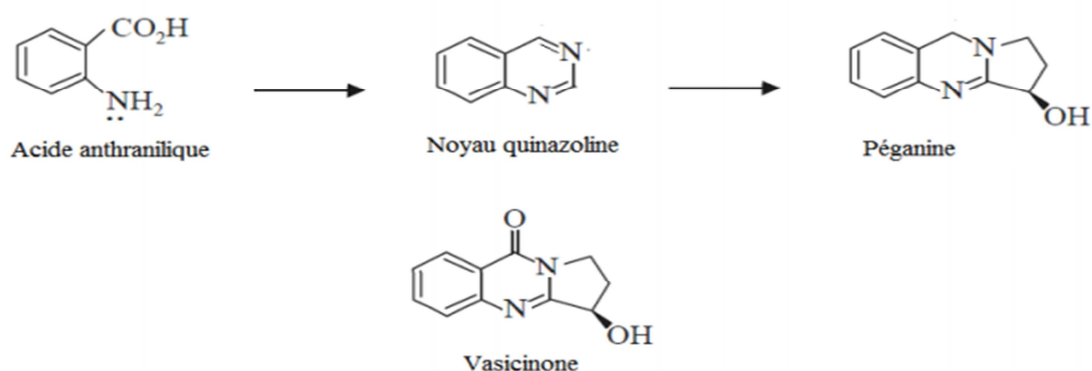


Figure 5 : structure générale des quinazolines de *Peganum harmala* L. (ANISZEWSKI, 2007).

1.2. Présentation de l'espèce *Verbascum sinuatum* L.

1.2.1. Description des différentes parties de la plante

Verbascum sinuatum L. appelé aussi molène à feuilles sinuées, est une plante vivace ou bisannuelle de la famille des Scrophulariacées, pouvant atteindre, voir même dépasser les 1 mètre de hauteur. Elle se caractérise par des feuilles basales sinuées aux bords ondulés et très poilus. Des fleurs en épi de couleur jaune soufre et des étamines à poils violet. Le fruit est une capsule portant plusieurs graines (MOSSERAY, 1935).

Ce genre de plantes fleurissent généralement à partir de mois de juin jusqu'à octobre ((DANE et YILMAZ, 2009 ; REMAL, 2014) ; elles affectionnent tous les terrains chauds, secs et bien exposés au soleil. On les retrouve parfois même parmi les décombres. (SPERANZA *et al.*, 2010 ; GUY, 2012).



Figure 6 : aspect morphologique de *Verbascum sinuatum* L. (JARDAT *et al.*, 2015).

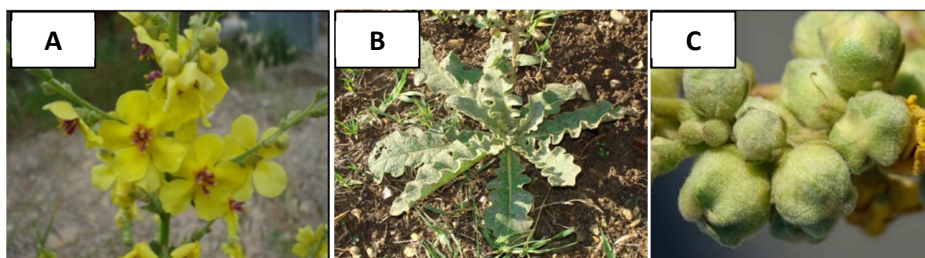


Figure 7 : les différentes parties de *Verbascum sinuatum* L. (JARDAT *et al.*, 2015)

A : Fleur B : Feuille C : Fruits

1.2.2. Classification botanique

La classification botanique de *Verbascum sinuatum* L. est donnée ci-dessous selon STOODER (2015).

Super-embranchement	Spermatophyta
Embranchement	Angiospermae
Classe	Eudicotyledonae
Sous-classe	Astridae
Ordre	Lamiales
Famille	Scrophulariaceae
Tribu	Verbasceae
Genre	<i>Verbascum</i>
Espèce	<i>Verbascum sinuatum</i> L.

1.2.3. Répartition géographique de l'espèce *Verbascum sinuatum* L.

La plupart des plantes du genre de *Verbascum* L. ont une aire de distribution très restreinte. Cependant d'autres espèces on les trouve naturellement à large distribution comme l'espèce *Verbascum sinuatum* L. ; qui est présente en en Turquie, en Europe, en Afrique du nord et dans toute la région méditerranée (Sahara algérien) (REMAL, 2014).

Elles affectionnent tous les terrains chauds, secs et bien exposés au soleil. On les retrouve parfois même parmi les décombres (SPERANZA *et al.*, 2010 ; GUY, 2012).

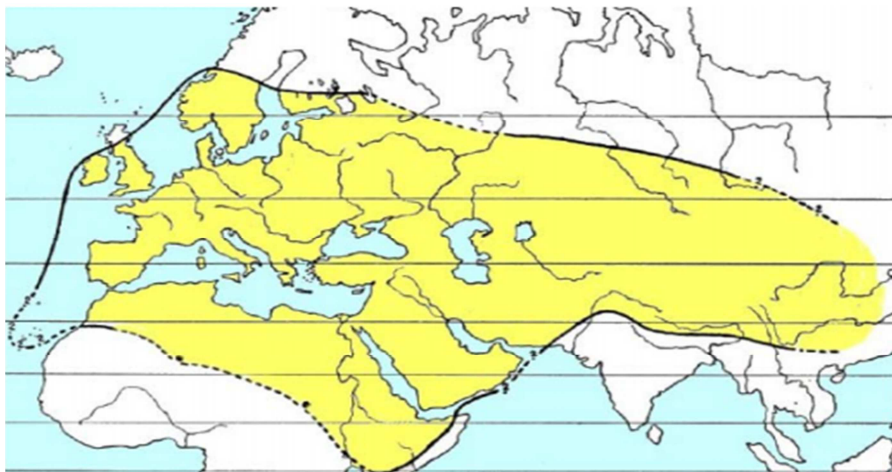


Figure 8 : aire de répartition du genre méditerranéen *Verbascum* L. (MURBECK, 1933).

1.2.4. Usage traditionnel

Les espèces appartenant au genre de *Verbascum* sont très utilisées en phytothérapie (POLLETIE, 1988). Les feuilles, racines et les fleurs sont de la plante les plus connues par leurs vertus thérapeutiques comme élargi dans le tableau 4.

Tableau 4 : les propriétés thérapeutiques des différentes parties de *Verbascum sinuatum* L.

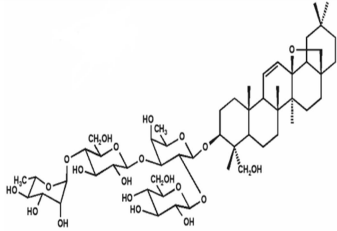
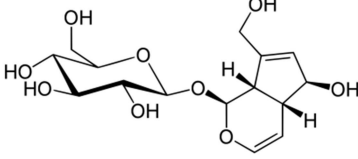
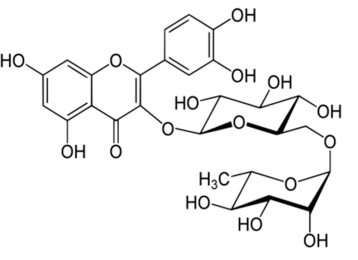
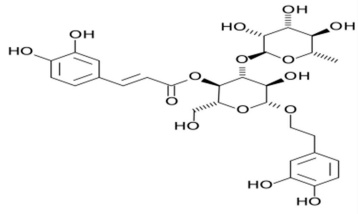
Parties utilisées	Traitement	Référence
Feuilles et fleurs (infusion des 2 parties)	Traitement des problèmes respiratoires comme la toux irritante et l'asthme. Effet Anti-inflammatoire sur le système urinaire pour traiter les infections fongiques et la diarrhée.	(SENATORE <i>et al.</i> , 2007).
Les feuilles et racines	Utilisées comme antiseptique, antispasmodiques, émollient, antioxydant.	SENATORE <i>et al.</i> , 2007).
Les feuilles basales	Soulager les douleurs rhumatismales et sciatiques	(MEDDOUR R, 2009)
Le bouillon des racines	Utilisé contre les maladies de foie	(WIHELMINA <i>et al.</i> , 1999).
Les fleurs	Pour traiter les maladies de la peau, exemple : l'eczéma Utilisée aussi contre les maladies oculaires	(TATLI et AKDERMIR, 2006).

1.2.5. Etude photochimiques et activité biologique

Les métabolites secondaires est un ensemble de biomolécules de structures et de fonctions variées qui interviennent dans l'interaction des plantes avec leur environnement biotique et abiotique (YARNELL, 2007). Chez le genre *Verbascum*, ces composés secondaires regroupent plusieurs molécules, généralement rassemblées en superfamilles chimiques : les alcaloïdes, les poly phénols et les terpénoïdes (NEWMAN, 2012).

Les différents composés photochimiques de genre *Verbascum* sont présentés dans les tableaux 5 et 6 :

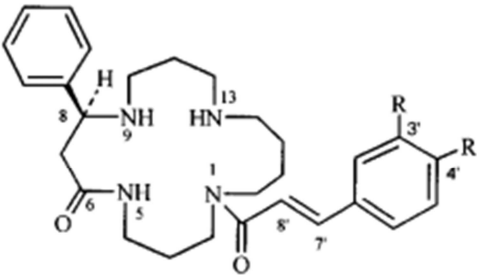
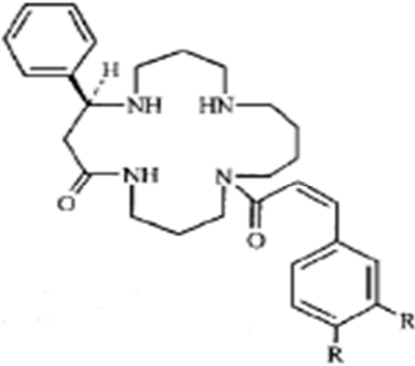
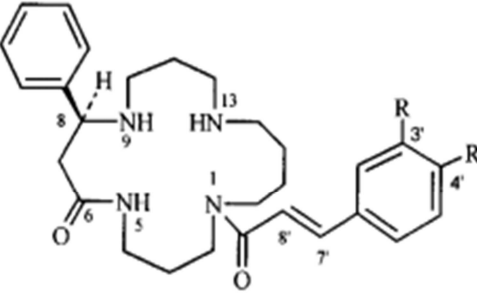
Tableau 5 : les différents composés terpéniques et phénoliques du genre *Verbascum* et leurs activités biologiques.

Classe chimique	Composés isolés	Structures chimiques	Activités biologiques	Référence
Composés terpéniques	Les saponosides : Verbascosaponine, ILwensisaponine A ILwensisaponine B	 <p>Verbascosaponine</p>	Anti-inflammatoire Cytotoxique Antifongique Laxative	SENATORE <i>et al.</i> , 2007 ; TATLI et AKDEMIR, 2006).
	Iridoides : l'harpagide, l'aucubine ; le verbascoside A ; catalpol ; phlomoidoside ; ajugol ; sinuatol	 <p>Aucubine</p>	Antibactérienne Anti-inflammatoire Cicatrisante antinociceptive	(AKDEMIR <i>et al.</i> , 2004 ; TATLI <i>et al.</i> , 2007)
Les composés phénoliques	Flavonoïdes glycolyses : Apigenine, quercitrine, lutéoléine, rutine, Kaempferphole	 <p>Rutine</p>	Anti-inflammatoire Antioxydante Anti tumorale Antiallergique	(SENATORE <i>et al.</i> , 2006 ; ALIPIEVA <i>et al.</i> , 2014 ; MOUSAVI <i>et al.</i> , 2015).
	Glucoside de phenylethanoides: Verbascoside, Martynoside.	 <p>Martynoside</p>	Anti-inflammatoire Anti nociceptive Antifongique Diurétique	(KAHRAMAN <i>et al.</i> , 2012 ; ALIPIEVA <i>et al.</i> , 2014)

1.2.6. Les alcaloïdes du genre *Verbascum*

Plusieurs alcaloïdes ont été isolés à partir des parties aériennes de *Verbascum*, la pluparts sont dérivés de la spermine et comportent un squelette macrocyclique. Ils sont caractérisés aussi par la présence d'un lien amide dans la plupart des composés, et ils peuvent comporter un ou plusieurs substituant, soit sur un atome d'azote, soit sur un atome de carbone du cycle (BAKKALI, 1997), parmi ces alcaloïdes, les plus importants sont : verbacine, verbasitrine et Verbalocine (KOBLICOVA *et al.*, 1983). Ces alcaloïdes sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau 6 : quelques alcaloïdes du genre *Verbascum* et leur activité biologiques.

Alcaloïdes	Structure chimique	Activités biologique	Références
Verbacine	 <p>1 R = H, (-)-(S)-Verbacine [1];</p>	Anticancéreux	(GOVINDA N <i>et al.</i> , 2019)
Verbalocine		Antalgique	BEANZ <i>et al.</i> , 2002)
Verbasitrine	 <p>2 R = MeO, (-)-(S)-Verbasitrine</p>	Antimicrobienne Antispasmodique	ALIEVA <i>et al.</i> , 2014
		Hypotensive	(JAMSHIDI-KIA <i>et al.</i> , 2018).

Chapitre II : le cycle cellulaire et Les principales cibles des agents antiprolifératifs et cytotoxiques

2.1. Description du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une série d'événements régulés et organisés, qui conduisent à la formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère possédant le même patrimoine génétique. Ce cycle est divisé en deux phases principales : l'interphase et la mitose (ou phase M) (KARP, 2004). Les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées dans la figure 9.

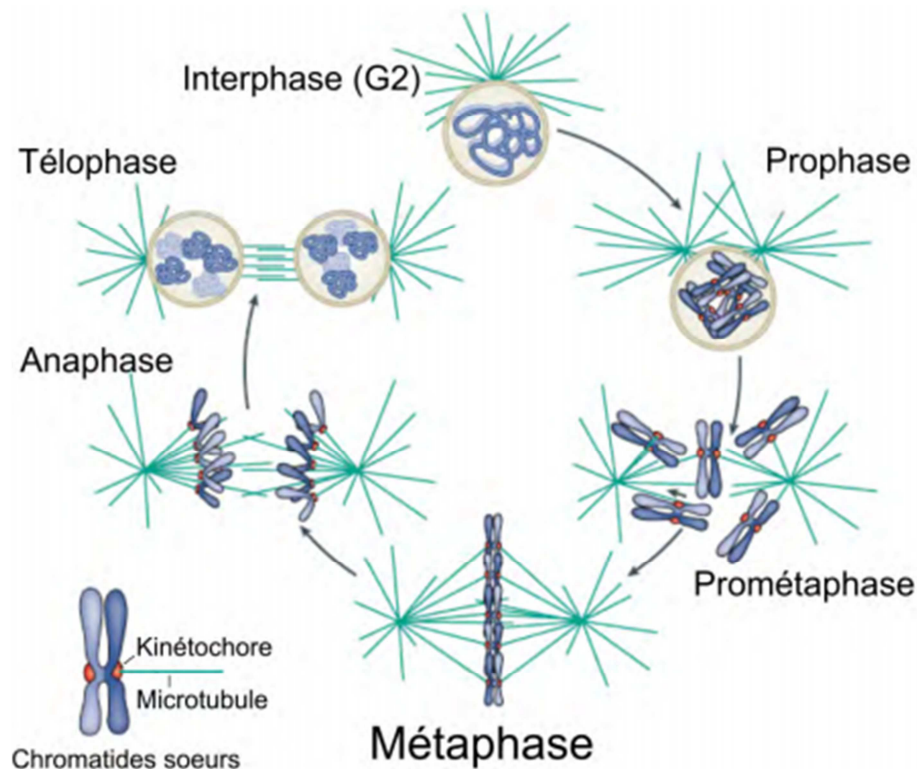


Figure 9 : les différentes phases de la mitose (CHEESEMAN et DESAI, 2008).

2.2. Les différentes phases du cycle cellulaire

2.1.1. Interphase

L'interphase est la plus longue étape du cycle cellulaire. C'est le moment où la cellule grandit et copie son ADN avant de réaliser la mitose, elle recompose trois phases :

- La phase G1 : première phase de croissance ; la cellule grandit et les organites sont copiés (GALAS *et al.*, 2008).

- La phase S : phase de synthèse ; la cellule synthétise une copie complète de l'ADN dans son noyau (FAVRO et NICOLLE, 2011).
- La phase G2 : seconde phase de croissance ; la cellule croît encore plus, produit des protéines et des organites, et commence à réorganiser son contenu en se préparant à la mitose (NORBURY et NURSE, 1992).

2.1.2. Mitose

Le processus de mitose, ou division cellulaire, est également connu sous le nom de phase M. C'est au cours de cette phase que la cellule divise son ADN, précédemment copié, et le cytoplasme pour créer deux nouvelles cellules-filles identiques. Elle se compose de quatre phases de base : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

2.1.2.1. Prophase

La chromatine se condense et les chromosomes dupliqués (avec 2 chromatides) apparaissent. Les microtubules du cytosquelette se réorganisent en fuseau mitotique.

2.1.2.2. La métaphase

Les chromosomes sont très condensés = chromosomes métaphasiques et organisés en plaque équatoriale.

2.1.2.3. L'anaphase

Clivage du centromère et partage des chromosomes dupliqués en 2 lots identiques de chromosomes simples chromatides qui migrent vers les pôles opposés.

2.1.2.4. La télophase

Le fuseau disparaît, les chromatides se décondensent. La membrane nucléaire se reforme.

2.2. Les principales cibles des agents antiprolifératifs et cytotoxiques

2.2.1. Action sur le fuseau mitotique

La distribution du matériel génétique en deux lots identiques aux cellules filles lors de chaque division cellulaire est réalisée par une structure constituée essentiellement de microtubules: le fuseau de division (CARAZO-SALAS et BRUNET, 2002).

Les microtubules sont des cylindres creux d'un diamètre de 25 nm, présents dans toutes les cellules eucaryotes (MURRAY *et al.*, 2011). Elles sont formés de dimères de tubulines constitués chacun de deux sous-unités, la tubuline α et la tubuline β , liées par des liaisons non covalentes. Les dimères sont assemblés en protofilament qui constitue la paroi des microtubules et ils sont polarisés et orientés de façon également polarisée le long de chaque protofilament. Cet assemblage est extrêmement dynamique car les deux extrémités des microtubules passent leur temps à basculer entre deux états : la polymérisation (assemblage) et la dépolymérisation (désassemblage). Les deux extrémités étant chargées différemment GTP et GDP possèdent une dynamique plus ou moins importante. On parle d'extrémité (+) pour celle chargée en GTP et donc très dynamique et d'extrémité (-) pour celle chargée en GDP donc moins dynamique (MARY, 2015).

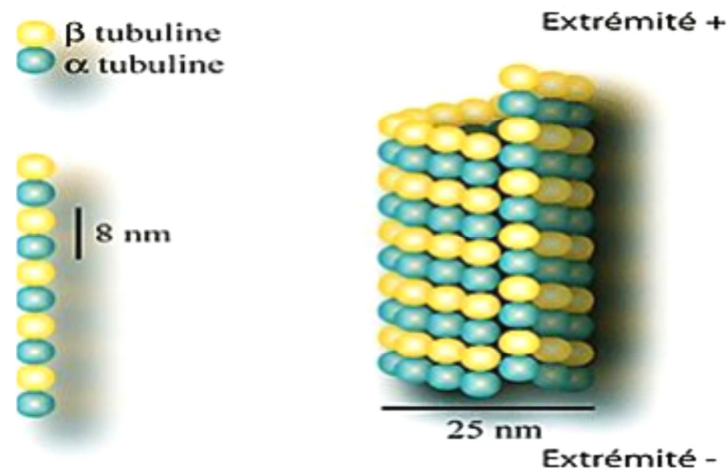
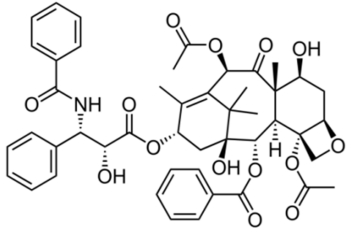
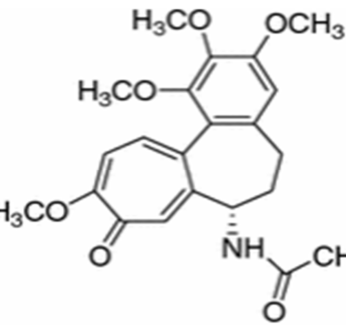
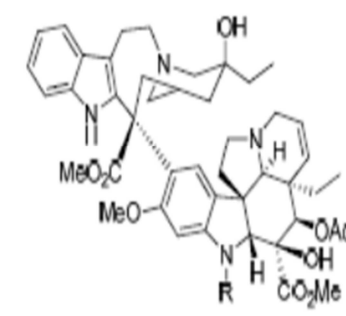
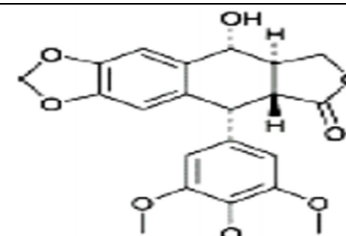


Figure 10 : structure des microtubules (CAUDRON, 2007).

Les agents antimitotiques affectent le réseau micro tubulaire et donc la division et le transport intracellulaire. Ils peuvent agir selon deux mécanismes opposés : soit en stabilisant les microtubules (inhibiteur de la polymérisation de la tubuline) soit en les déstabilisant (inhibiteur de la polymérisation de la tubuline).

Les différents agents antimitotiques ainsi que leurs mécanismes d’actions sont consignés dans le tableau suivant.

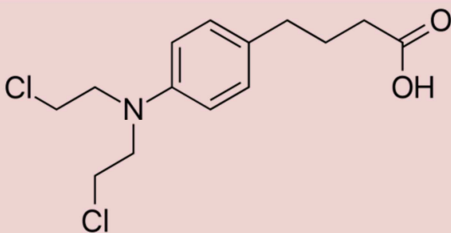
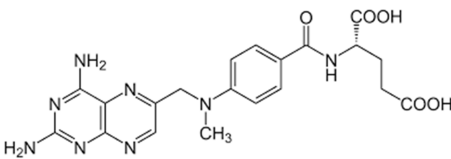

Tableau 7 : les différents agents antimitotiques et leurs modes d’action.

Les agents mitotiques		Structure chimique	Mécanisme d’action	Références
Stabilisant du fuseau	Le taxol		Inhibition de la dépolymérisation des microtubules, en se fixant sur la poche de β tubuline, bloquant ainsi le mécanisme de la mitose (en phase G2).	GROSIOS <i>et al.</i> , 1999 ; BHATTACHARYY <i>A et al.</i> , 2008)
	La colchicine		fixation de façon irréversible sur la sous unité α et β de la tubuline, ce qui empêche la polymérisation en microtubule et entraîne le blocage de la division cellulaire au stade métaphase et le transport intracellulaire des vésicules et des organites.	(GARRETT et GRISHAM, 2000 ; AMOS, 2004 ; ROGALSKA <i>et al.</i> , 2015)
	Les vanca-alcaloïdes		Inhibition de la polymérisation de tubuline en se liant sur les sous unités α et β induisant la formation des paracristaux de tubuline, qui bloquent la mitose en métaphase et empêchent la formation du fuseau et la dispersion des chromosomes.	(CORREIA et LOBERT, 2001 ; ROBERT ,2007)
Les podophylotoxines		L’effet inhibiteur est dû à la formation du complexe podophyllotoxine-tubuline, qui bloque la polymérisation en microtubules	(BABA-AISSA 2000).	

2.2.2. Action sur l'ADN

Il existe de nombreuses molécules bioactifs d'origine végétal qui ciblent l'ADN notamment pour bloquer la transcription et empêcher la réplication. Il s'agit de la plupart des métabolites cytotoxiques (LENGLET, 2010). Ils peuvent agir par différents mécanismes soit en se fixant de façon covalente, ou induisant des cassures mono ou bi caténares (inhibiteur de topo isomérase) ou en inhibant la synthèse des métabolites. Les différents types d'anticancéreux cytotoxiques et leurs modes action, sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : les différents types d'anticancéreux cytotoxiques et leurs modes action

Les agents ciblant l'ADN	Structure chimique	Mode d'action	Références
Agents alkylants	 <p>Chlorambucil</p>	Composés qui se fixent sur 2 sites proches situés sur les chaînes d'ADN. cette fixation provoque la formation des ponts intra- et inter caténares et à la séparation des 2 brins d'ADN et induit l'arrêt de la réplication, la transcription et donc la synthèse protéique	(ESPINOSA et al., 2003)
Les antis métabolites	 <p>Méthotrexate</p>	Blocage de la synthèse de l'ADN soit en inhibant la biosynthèse des nucléotides, soit par l'incorporation de ces antis métabolites dans l'ADN comme étant des analogues structuraux des bases nucléiques.	(LANSIAUX, 2004 ; COUDERT, 2018).
Les inhibiteurs des topoisomérases	 <p>Topotécan</p>	Stabilisation du complexe ADN-Topo isomérases (enzyme induisant des cassures et relégations lors de la réplication des brins d'ADN conduisant à l'apoptose.	(GOLDWASSER, 2007).

2.2.3. Action sur de la tyrosine kinase

Les régulateurs du cycle cellulaire sont considérés comme des cibles privilégiées d'inhibiteurs sélectifs et puissants (MEIJER, 2003). L'action principale de ces inhibiteurs compétitifs s'effectue au niveau du site de phosphorylation des protéines kinases par l'introduction d'un composé mimique à l'ATP (POUCI *et al.*, 2012). Parmi ceux-ci on distingue :

➤ La quercétine

La quercétine est l'un des flavonoïdes les plus répandus dans les végétaux incluant les oignons rouge et jaune, les pommes, les brocolis, les baies et certaines graines et fruits oléagineux, c'est un polyphénole fut découvert en même temps que la vitamine C par Albert en 1937, c'est une molécule possédant 5 groupe hydroxyle (OH). Elle est insoluble dans l'eau froide, peu soluble dans l'eau chaude et très soluble dans l'alcool et les lipides. L'activité anticancéreuse de la quercétine a été largement étudiée.

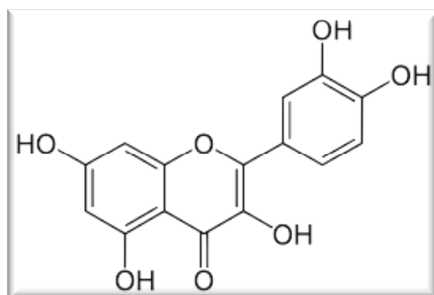


Figure 11: structure de Quercetine (COULOUNGA BIANCATELLI *et al.*, 2020).

La quercétine inhibe la CDK (la CDK est une enzyme importante dans la catalyse des protéines cibles jouant un rôle dans le processus du cycle cellulaire : fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN dans l'avancement du cycle...etc.) en introduisant un composé semblable à l'ATP au niveau du site de phosphorylation de l'enzyme en question (CHEN *et al.*, 2010 ; POUCI *et al.*, 2012).

D'autres propriétés thérapeutiques ont également été attribuées à la quercétine, à savoir les propriétés antioxydants (HALLIWELL, 2011), anti-inflammatoires et antivirales (COULOUNGA BIANCATELLI *et al.*, 2020).

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthodes

L'étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Cette étude porte sur deux espèces de plante médicinales : *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. L'objectif est d'évaluer l'effet antiprolifératif et cytotoxique des fractions d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L., sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

- Des feuilles de plantes *Verbascum sinuatum* L. et *Peganum harmala* L., ont été récoltées au mois d'avril et Mai 2019 respectivement. L'échantillonnage a été effectué au sud de la wilaya de Laghouat, plus exactement dans la région de Timizert pour *peganum harmala* L. tandis que les feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ont été récoltés dans la région d'Adekar Assif el Hammam à Bejaïa. Les feuilles récoltées, ont été nettoyées, séchées à une température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière, puis réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres obtenues sont conservées dans des boîtes en verres à l'abri de la lumière et servent ensuite à la préparation des fractions.
- Levure boulangère *Saccharomyces cerevisiae* commercialisée est un organisme modèle étudié dans les laboratoires de biologie pour étudier les eucaryotes (SHWETA *et al.*, 2012) en raison de sa croissance rapide, facile à manipuler et de faible coût.

1.1.2. Matériels du laboratoire

Les différents appareillages, verrerie et autres matériels utilisés dans notre étude sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 9 : Appareillage, verreries et autres matériels utilisés.

Appareillage	Verrerie	Autres matériels
Evaporateur rotatif Autoclave Microscope optique Centrifugeuse Micropipette	Becher Erlenmeyer Entonnoir Fiole jaugée Eprouvette Ampoule à décanter	Filtre Papier Wattman Lamelles et lames Cellules de Malassez

- La cellule de Malassez (ou Hématimètre de Malassez) est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Elle possède un quadrillage spécifique, comportant 100 rectangles dont 25 rectangles sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage (Figure 12). Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1.

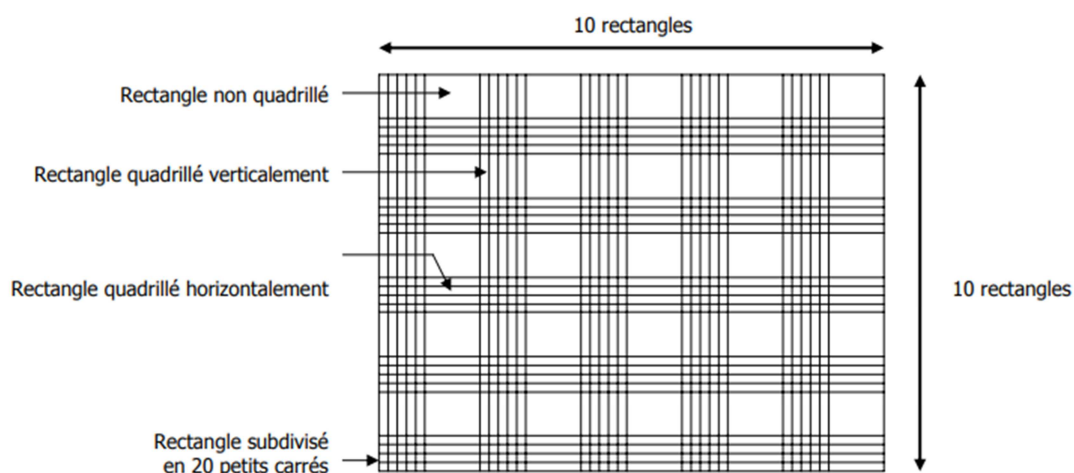


Figure 12 : cellules de Malassez.

1.1.3. Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants utilisés dans cette étude sont représentés ci-dessous :

Tableau 10 : Réactifs et solvants.

Composés	Concentration	Fonction
Ether de pétrole	Pur	Délipidation
Méthanol	99,7 %	Extraction
Chloroforme	Pur	Extraction
HCL	5%, pH=3	Acidification
Na ₂ CO ₃	5%	Basification
Colchicine	1mg/ml	Témoin positif
Bleu de méthylène	0.1%	Coloration et visualisation des cellules
Eau distillée	/	Témoin négatif

1.1.4. Préparation de milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth)

Le PDB est utilisé comme milieu de culture pour la croissance des levures. Dans cette étude, la levure utilisée est *Saccharomyces cerevisiae*.

- Faire bouillir 100g de pommes de terres tranchés dans l'eau distillée pendant 15 minutes ;
- Récupérer le bouillant de pomme de terre, en le filtrant à travers un filtre blanc dans une fiole jaugée (100ml), y rajouter 10 g de glucose ;
- Ajuster le mélange à 100 ml avec de l'eau distillée, homogénéiser et chauffer sur une plaque chauffante ;
- Repartir le mélange dans des flacons ;
- Stérilisation par autoclave à 120C°, pendant 20 minutes ;
- Conserver le milieu dans un réfrigérateur à 4 °C.

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des fractions d'alcaloïdes des feuilles de *P.harmala* L. et *V.sinuatum* L.

La préparation des fractions consiste à extraire des alcaloïdes à partir des poudres de feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L., par la méthode de HARBONNE (1998). L'extraction est basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et en milieu basique, ils vont ainsi pouvoir être séparés des autres constituants du végétal. Les principales étapes d'extraction des alcaloïdes sont résumées dans la figure suivante.

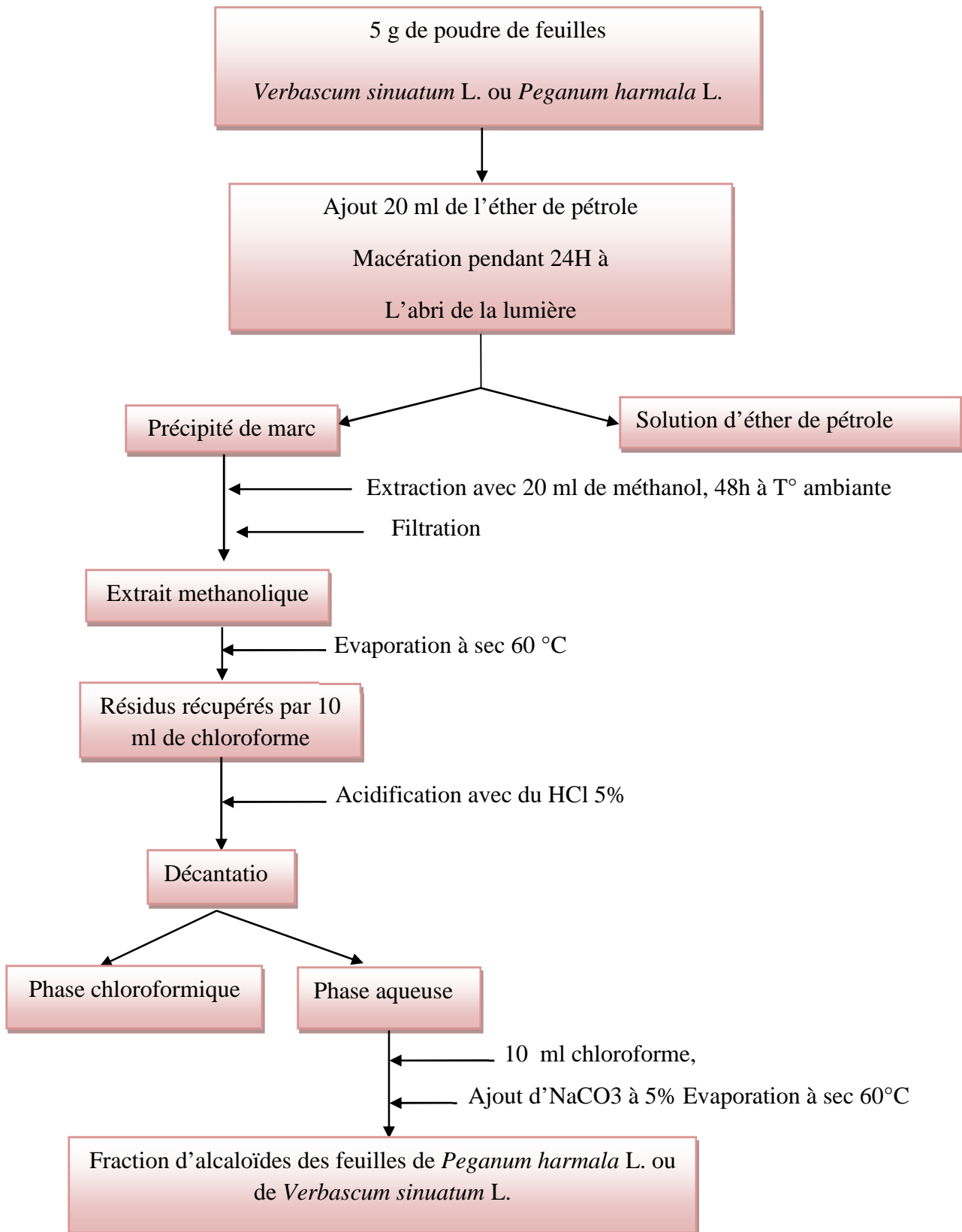


Figure 13 : schéma d'extraction des alcaloïdes totaux (HARBONE, 1998).

1.2.2. Evaluation *in vitro* de l'activité antiproliférative des fractions d'alcaloïdes des plantes étudiées

Le teste anti prolifératif a été effectué suivant le protocole de SHWETA *et al.* (2012) avec quelques modifications. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme modèle d'étude, en raison de nombreux avantages qu'elle possède : pouvoir prolifératif rapide, facilité de manipulation, prix moindre.

1.2.2.1. Préparation de l'inoculum de *Saccharomyces cerevisiae*

A partir d'une culture de 1g de *Saccharomyces cerevisiae* dans le milieu PDB, incubé à 30°C pendant 24h, nous avons préparé une solution mère de densité optique Une solution mère de 0,1 à une longueur d'onde 650 nm.

1.2.2.2. Test antiprolifératif

Pour mettre en évidence l'activité antiproliférative des alcaloïdes extraits de *Verbascum sinuatum* L. et *Peganum harmala* L., on a utilisé la méthode de bleu de méthylène adoptée par le protocole de SHWETA *et al.* (2012), optimisé par nos soins.

1.2.2.2.1. Action de bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est une molécule organique de formule brute C₁₆H₁₈CIN₃S. Il est utilisé comme indicateur de coloration : sous forme oxydé il est bleu, sous forme réduite, est incolore.ces propriétés sont utilisées pour évaluer l'activité cytotoxique des alcaloïdes sur les cellules *Saccharomyces cerevisiae*. Dans une cellule vivante le bleu de méthylène est réduit (car les cellules vivantes ont un environnement réducteur) présente des enzymes actives donc la cellule apparait incolore, en revanche, dans une cellule morte, le bleu de méthylène est oxydé, donc la cellule apparait en bleu. Le pourcentage de la viabilité est obtenu par la formule suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{\text{Nombre de cellules mortes}}{(\text{Nombre de cellules mortes} + \text{nombre de cellules vivantes})} * 100.$$

La figure suivante récapitule les différentes étapes suivies lors de la réalisation du test antiprolifératif.

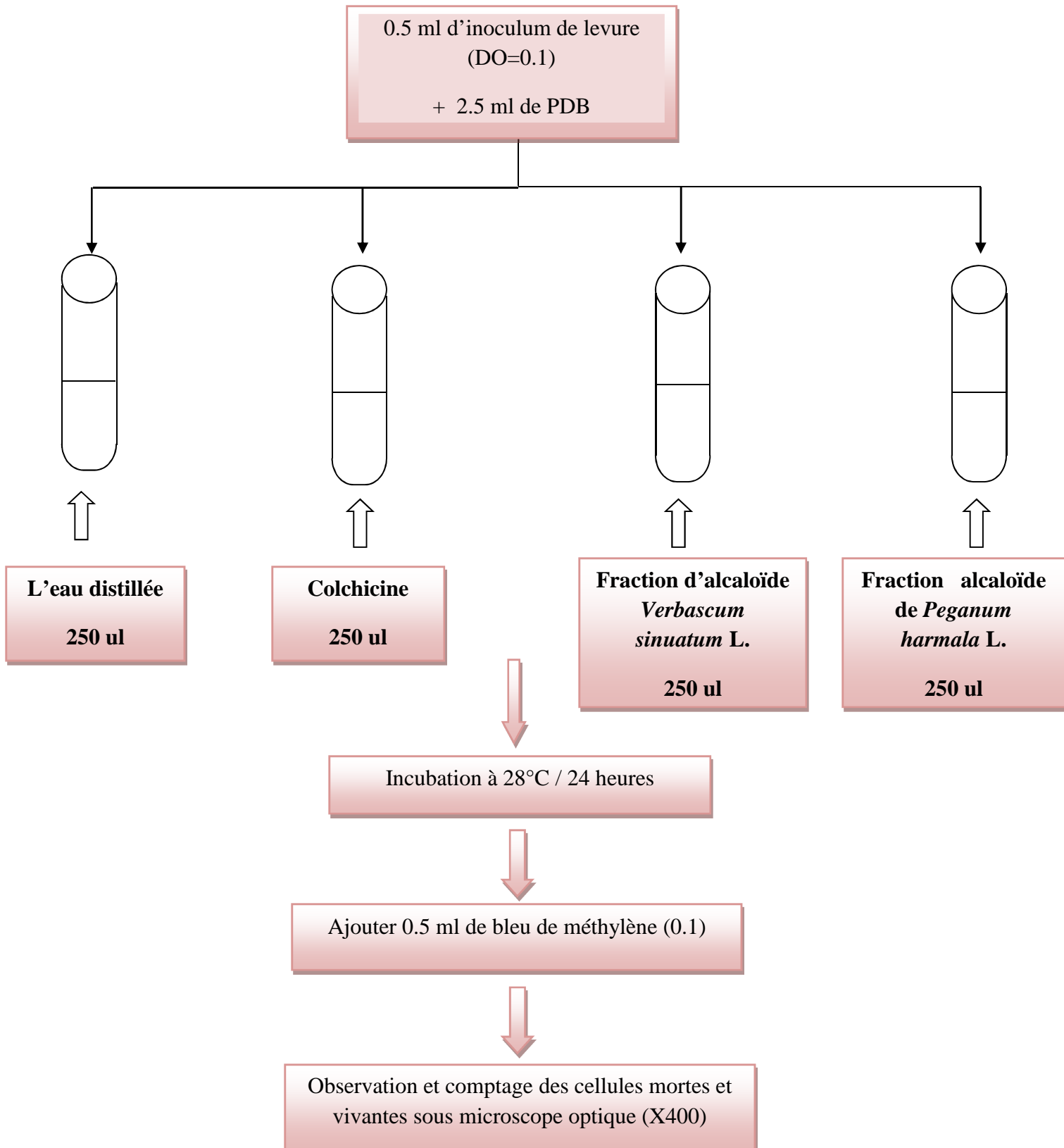


Figure 14 : les différentes étapes du test antiprolifératif.

1.2.3. Etude statistique

Pour notre étude, des analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test d'analyse de variance ANOVA à un facteur avec le logiciel STAR.BOX, ayant pour but de comparer la moyenne d'une variable quantitative correspondant au pourcentage de cytotoxicité selon un facteur qualitatif qui représente nos fractions. Ce test permet de mettre en évidence l'existence des différences significatives entre les fractions et le standard (colchicine). Un test complémentaire de comparaisons des moyennes a été fait pour classer les différentes fractions testées en groupes homogènes.

2. Résultats et discussion

Dans notre étude, on a utilisé la méthode de HARBORNE. (1998) pour la réalisation des fractions d'alcaloïdes à partir des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. et de *Peganum harmala* L., ceci par la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et en milieu basique, ils vont ainsi pouvoir être séparés des autres constituants du végétal. L'acidification entraîne les alcaloïdes sous forme de sels soluble et élimine ainsi l'impureté solubles dans les solvants organiques (lipides, résine, chlorophylle). Par contre la solution alcaline de l'ammoniac pH=9 permet la libération des alcaloïdes (BRUNETON, 1999).

L'effet antiprolifératif est révélé par la méthode de coloration au bleu de méthylène qui permet l'observation de cellules mortes et du phénomène de nécrose cellulaire au niveau des levures traités par la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L. et du standard (colchicine).

L'action antiproliférative et cytotoxique des différentes fractions (la fraction d'alcaloïde des feuilles de *Peganum harmala* L. et la fraction d'alcaloïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L.) sur la prolifération des levures *Saccharomyces cerevisiae*, est mise en évidence en la comparant à l'action de l'eau distillée qui est considérée comme témoin négatif et un témoin positif qui est la colchicine (1mg/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité.

Les différents pourcentages de cytotoxicité de la levure en présence la fraction d'alcaloïde des feuilles de *Peganum harmala* L. et la fraction d'alcaloïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Les différents pourcentages de cytotoxicité : des fractions d’alcaloïdes testées, le standard et le témoin négatif.

Fraction	Moyenne \pm Erreur standard
Témoin négatif	0.0 \pm 0.00
Colchicine (1mg /ml)	55.70 \pm 5.170
Fraction d’alcaloïde des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.	67.292 \pm 2.629
Fraction alcaloïde de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	76.359 \pm 2.056

➤ **Action de la colchicine**

Le pourcentage de cytotoxicité de la colchicine est estimé à 55.70 \pm 5.170 %. Les résultats des analyses de variance entre le témoin négatif (l’eau distillée) et la colchicine ont donné une $p < 0.001$, ce qui révèle une différence hautement significative entre les pourcentages de ces derniers. La colchicine est un alcaloïde connue pour son activité antimototique qui est responsable de son effet antiprolifératif, elle a été utilisée dans le traitement des cancers mais en raison de sa forte toxicité, on l’a abandonné. La colchicine cible les microtubules, elle empêche leur polarisation conduisant à l’arrêt mitotique et la mort cellulaire (POUCI *et al.*, 2012).

En comparant le résultat de ce standard à ceux obtenues par les fractions, à savoir la fraction d’alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et celles de *Verbascum sinuatum* L., nous a permis d’évaluer le potentiel antiprolifératif et cytotoxique de ces derniers.

➤ **Action de la fraction d’alcaloïde des feuilles de *Peganum harmala* L.**

La fraction de *Peganum harmala* L. a montré une action antiprolifératif sur les cellules de la levure *Saccharomyces cerevisiae* traduite par un pourcentage de cytotoxicité estimé à 67.292 \pm 2.629%. Le test ANOVA entre le témoin positif et la fraction a révélé une p value inférieure à 0.001, ce qui indique leur action cytotoxique différentes sur la prolifération cellulaire.

➤ **Action de la fraction d'alcaloïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L.**

Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction alcaloïde de *Verbascum sinuatum* L. est estimé à $76.359 \pm 2.056\%$. L'analyse ANOVA a montré une différence hautement significatif entre les pourcentages de cytotoxicité du témoin positif et la fraction d'alcaloïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a $p < 0.001$, ce qui prouve qu'ils ont une action cytotoxique différente sur la prolifération cellulaire.

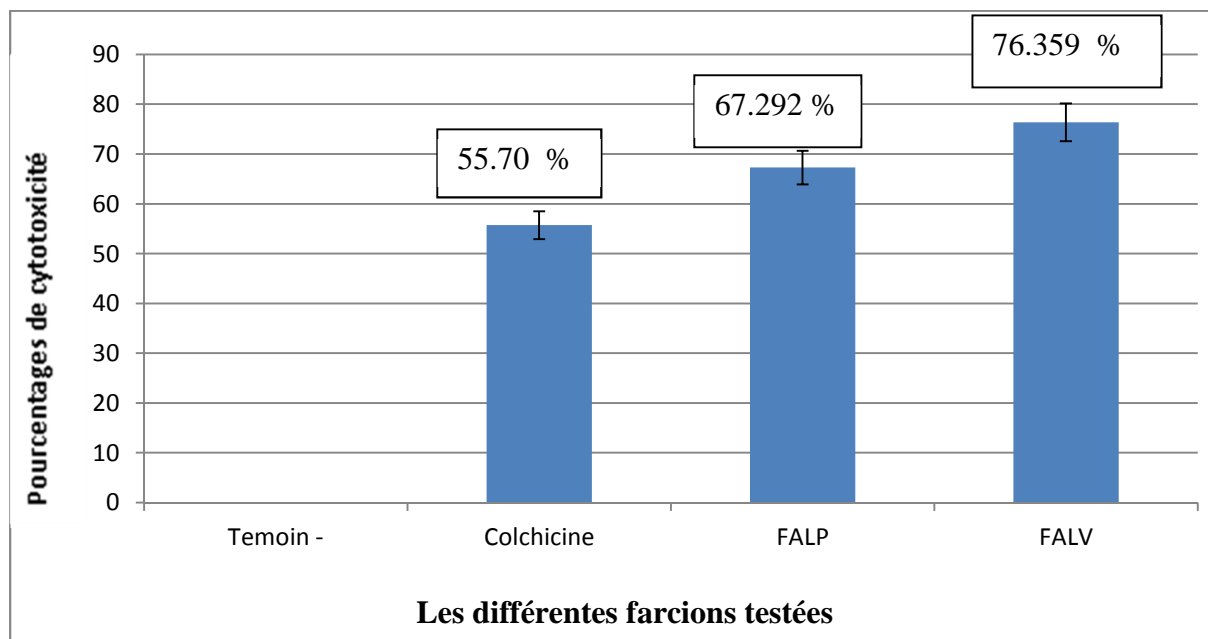


Figure 15 : pourcentages de cytotoxicité de différentes fractions testées (Annexe 1).

FALP : fraction d'alcaloïdes de *Peganum harmala* L. ; FALV : fraction d'alcaloïdes de *Verbascum sinuatum* L. ; Témoin - : témoin négatif (l'eau distillée).

2.1. Synthèse des résultats

Des travaux en parallèle ont été effectués au laboratoire de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) sur l'action anti proliférative des fractions de flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. et *Peganum harmala* L. (la phase aqueuse et la phase butanolique) sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De ce fait, un test de variance ANOVA a été fait, suivie d'un test de comparaison des différentes moyennes des pourcentages de cytotoxicité (teste Newman-keuls) qui révèle la présence de différents groupes homogènes (Annexe 3).

L'ANOVA réalisées entre le témoin négatif représenté par l'eau distillée et les deux témoins positifs (la colchicine et la quercetine) pris comme standards, ainsi que les différentes fractions testés, montrent une différence hautement significative entre ces mesures ($p=0,00$)

(Annexe 2). Ceci confirme que ces derniers possèdent des effets antiprolifératif et cytotoxique différents. Les comparaisons multiples des moyennes ont révélé la formation de sept groupes homogènes (annexe 3). Le groupe A regroupe respectivement le témoin négatif (l'eau) et la fraction aqueuse des flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. . Le groupe B est représenté par la fraction aqueuse de *Peganum harmala* L.. Le groupe BC est représenté par la quercétine. La colchicine appartient au groupe BCD.la fraction butanolique des flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. appartient au groupe CDE. Le groupe DE est représenté par la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L.et enfin le groupe E regroupe respectivement la fractions butanolique des feuilles de *Peganum harmala* L. et la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L.

D'après ces résultats, la fraction aqueuse des flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. (45.297%) et le témoin négatif (0.00), ont un effet cytotoxique similaire correspondant aux effets antiprolifératif les plus faibles. Contrairement à la phase butanolique de flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. dont l'effet prolifératif est estimé à 63,650%, cela signifie que la phase butanolique de *Verbascum sinuatum* L. est plus riche en molécules bioactifs responsables de l'effet cytotoxique et qu'elle est plus cytotoxique que les deux témoins alcaloïde et quercétine qui présentent respectivement un pourcentage de 55.70% et 47.026%, mais elle ne dépasse pas celle de la fraction alcaloïde de *Peganum harmala* L. dont la cytotoxicité est de 67.292%. En outre, la fraction butanolique des flavonoïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et de la fraction alcaloïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L., ont donné respectivement un pourcentage de cytotoxicité de 74.218et de 76.359.Ils présentent un effet antiprolifératif le plus élevé, cela peut être justifié par le fait que ces deux fractions contiennent des métabolites secondaires toxiques responsable de la perturbation de l'activité de l'ADN polymérase et de l'ADN topo isomérases, ce qui génère des mutations (GOLDWASSER, 2007).

Des études similaires rapportant sur l'effet antiprolifératif des extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L. ont été réalisés au niveau du LABAB par ATTOUCHE et MAHMOUD (2020). Les résultats ont révélés que l'extrait aqueux de *Verbascum sinuatum* L. et celui de *Peganum harmala* L. ont donné respectivement un pourcentage de cytotoxicité de 62.73 ± 1.09 % et de 73.08 ± 12.74 %.Cependant leur association au témoin positif (colchicine) a fait changer l'effet antiprolifératif. L'association de l'extrait aqueux avec la colchicine a révélé un effet cytotoxique plus élevé présenté par un pourcentage de 76.08 ± 2.48 %, contrairement à l'association à la quercétine où l'effet anti

prolifératif a diminué jusqu'à $64.47 \pm 5.64\%$. L'effet chimio protecteur de la quercetine a été mis en évidence dans des études rapportées par ISHAKAWA et KITAMURA (2000) qui ont démontré l'effet apoptotique de la quercetine suite à l'induction de l'apoptose par un traitement au peroxyde d'hydrogène.

L'association de l'extrait aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L. avec la colchicine a révélé un effet synergique où le pourcentage de cytotoxicité a augmenté jusqu'à $78.02 \pm 4.72\%$ or la combinaison avec la quercetine a révélé un effet antagoniste dont le pourcentage de cytotoxicité a diminué jusqu'à $72.38 \pm 2.62\%$.

Dans la chimiothérapie anticancéreuse un compromis entre différentes interactions peut être réalisé. Ce compromis vise à utiliser les combinaisons ayant un pourcentage de cytotoxicité permettant d'inhiber la prolifération des cellules tumorales tout en protégeant les cellules saines.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a concerné l'évaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif et cytotoxique des fractions d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. sur des cellules eucaryotes : la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La mise en évidence du pouvoir antiprolifératif et cytotoxique des fractions d'alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L., est réalisée par la méthode de coloration de bleu de méthylène en utilisant la colchicine comme standard.

Les résultats obtenus ont montré que les différentes fractions d'alcaloïdes testées, ont révélé un effet antiprolifératif et cytotoxique, sur le développement cellulaire de la levure avec des pourcentages cytotoxique différents. La fraction d'alcaloïdes *Peganum harmala* L. a entraîné un effet antiprolifératif et cytotoxique avec un pourcentage de (67.292%) qui est inférieur comparativement à celui de la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. (76,359%), ce qui indique que la fraction d'alcaloïdes *Peganum harmala* L. a une activité antiprolifératif et cytotoxique moins importante. Les analyses de type ANOVA faites entre la fraction des feuilles de *Peganum harmala* L. et la colchicine a révélé une différence hautement significative ($p < 0.001$), ce qui indique qu'elles ont un effet antiprolifératif différent, il en est de même entre la fraction d'alcaloïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. et la colchicine ($p < 0.001$).

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine végétale biologiquement actives. D'autres études doivent être réalisées pour obtenir une vue plus approfondie sur l'activité anti proliférative et cytotoxique des différentes fractions des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. et *Peganum harmala* L., pour cela il est nécessaire de mettre en œuvre d'autres investigations et perspectives tel que :

- isolement, caractérisation et identification des composés actifs par des méthodes spécifiques comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
- réalisation des tests *in vivo* sur les cellules saines et cancéreuses afin de mettre en évidence leur mode d'action ;
- étude d'autres activités biologiques tel que antalgiques, anti-inflammatoire ;
- réaliser des combinaisons avec des principes actifs, et les tester sur des lignées cellulaires cancéreuses.

Références Bibliographiques

- AIT ALI BRAHAM H. et BOUKHOUFANE T. (2020).** Evaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif de l'association des extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. Mémoire master. Université de Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.
- AKROUM S. (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse doctorat. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ; Université Mentouri de Constantine, Algérie.
- ALPIEVA K. I; ORHAN I.E. and GEORGIEV M.I. (2014).** Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochemistry Reviews*, 3,417-444.
- AI QURAN S. (2008).** Taxonomical and pharmacological survey of therapeutic plants in Jordan. *J Nat Prod*, 1, 10-26.
- AL YAHYA M. (1986).** Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia*. 52 (3), 17.
- AMOS L.A. (2004).** Microtubule structure and its stabilisation .*Organic Bimolecular Chemistry*, 15 (2) , 2153-2160.
- ANISWESKI T. (2007).** Definition, typology and concurrence of alkaloids; in: <<alkaloids-secrets of life>>.Elsevier,1-59.
- ASHTON A. Q. (2012).** Mixed function oxygenases: Scholarlybrief: advance in research and application . Scholarly, Georgia, Atlanta, 55p.
- ASTULLA A, ZAIMA K, MATSUNO Y, HIRASAWA Y, EKASARI W, WIDYAWARUYANTI A. (2008).** Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities, 470 p.
- BABA AISSA F. (2000).** Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie Moderne, Alger.
- BAHATTACHARYYA B., PANDA D., GUPTA S. et BANERJEE M. (2008).** Anti mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal Research Reviews*, 1(28), 155-183.
- BAKKALI A. (1997).** Contribution à la synthèse de la myricidine et de la dihydromyricidine, alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique.
- BEZANGER B., PINKAS M., TROTIN M. (1980).** Médicinal plants of temperate régions.
- BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et Documentation, 3^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

- CAUDRON F. (2007).** Des microtubules détyrosinés : quelles conséquences pour la cellule. Thèse de doctorat. Université de JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1. France.
- CHEEZMAN I.M. and DESAI A. (2008).** Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface .Molecular cell biology, 9(1), 33-46.
- CHEN C., ZHOU J. et JI C; (2010).**Quercetin: A potential drug to reserve multidrug resistance. Life Sciences, 87 (11-12), 333-338.
- CHOPRA I .C.ABRAL B.K et HANDA K.L. (1960).** Les plants médicinales des régions arides considérées du point de vue botanique. UNESCO, p.97.
- CORREIA J.J. et LOBERT S. (2001).** Aspects of Tubulin-Interacting Antimitotic Drugs. Current Pharmaceutical Design, 13(7), 1213-1228.
- COUDERT P. (2018).** Cancers cutanés et chimiothérapie. Elsevier Masson, 581, 32-36.
- COULOUNGA BIANCATELLI R.M., BERRILL M., CATRAVAS J.D., MARIK P.E.(2020)** .Quercetine and vitamin C :An experimental, synergistic therapy for prevention and treatment SARS-COV-2 Related Disease (COVID-19). Front. Immunol, 1451 (11),1-11.
- DANE F. et YILMAZ G. (2009).** A new natural hybrid of *Verbascum* (Scrophulariaceae) from European Turkey. Phytologia Balcanica, 15 (2), 181-184.
- DERBEL S. (2005).**Les phytonutriments et leur impact sur la santé .Phytothérapie, 3, 28- 34.
- DEWICK P.M. (2002).** Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. 2nd Ed, John Wiley & Sons Ltd, p 346.
- DUMONTE C. (2011).**Les agents antitubulines .Bull Cancer, 98(11) ,1275-1285.
- ESPINOSA E., ZAMORA P., FELIU J. and BARON M.G. (2003).** Classification of anticancer drugs, a new system based on therapeutic targets. Cancer Treatment Reviews, 29, (6), 515-523.
- FARNSWORTH N. K et KASS C .J. (1986).** An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. Bulletin de l’OMS66, 159.
- FAROUK. LAROUBI A., ABOUFATIMA R. BENHARREF A. CHAIT A. (2008).** Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. J Ethnopharmacol, 115,449-54.
- FAURE S. (2010).** Anticancéreux cytotoxique .Actualité pharmaceutique ,49(497) ,51-54.
- FAVRO. et NICOLLE F. (2011).** Biologie cellulaire. Hachette Education, Paris.
- FREIDEL H. (1980).** Dictionnaire de l’écologie et de l’environnement. Larousse, p 284.

- GALAS S., DESCAMPS S. et MARTINEZ A.M. (2008).** Le cycle Cellulaire. De Boeck, Bruxelles.
- GARRETT, R. H., et GRISHAM, C. M. (2000).** Biochimie, 2e éd. Paris: DeBoeck Université, 561-3.
- GOEL N, SINGH N, SAINI R. (2009).** Efficient in vitro multiplication of syrian rue (*Peganum harmala* L.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nat Sci*, 7,129-34.
- GOLDWASSER F. (2007).** Les poisons des topo-isomérases 1. *Oncologie* , 9 (11) ,758-765.
- GROSIOS K., HOLWELL S.E., MCGOWN A.T., PETTIT G.R. et BIBBY M.C. (1999).** *British Journal of Cancer*, 8(81), 1318-1327.
- GUY NESOM L. (2012).** Flora of North America *Verbascum Scrophulariaceae*, taxon eds : Rabeler et freeman , vol. 17,2-10.
- HALLIWEL B. (2011).** Free radicals and antioxidant-quo vadis? . *Trends in pharmacological Science*, 32 (3), 125-130.
- HARBONE, J. B. (1998).** A guide to modern techniques of plant analysis. Pytochemical methods, 3rd edition. Published by Chapman and Hall, London.
- HERAIZ T, GONZALEZ D, ANCIN- AZPILICUETA C, ARAN, V. J, GUILLEN H. (2010).** Beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food. Chem. Toxicol* 48(3): 839-45.
- HESS M. (2002).** Alkaloids – Nature’s Curse or Blessing, VHCA, Zürich.
- ISERIN P. (2001).** Encyclopedie des plantes médicinales. 2ème Ed., Larousse. Paris.
- JAMSHIDI6KIA F., LORIGOONI Z., ASGARI S. And KARAMATOLLAH S. (2018).** Iranian species of *Verbascum*: a review of botany, phytochemistry, and pharmacological effect. *Toxin Reveews*, 4 (38), 255-262.
- JARADAT N., MASSOUD B. et ABU-HADID M. (2015).** Screening Antibacterial and Antifungal Activities and Evaluation of the Exhaustive Extractions Yields For *Verbascum sinuatum*. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 6 (1), 105-110.
- JINOUS A, FERESHTEH R.L. (2012).** Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afri. Pharma. Pharmacology* ,6 (22) ,1573-1580.
- KARP G. et WISSOCQ J.C. (2004).** Biologie Cellulaire et Moléculaire. 2^{ème} Ed., De Boeck, Bruxelles.

KARTAL M., ALTUN M.L. et KURUCU S. (2003). HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *Journal of Pharmacological and Biomedical analysis*, 31, 263-269.

KHASHIMOV K. N., TELEZHENETSKAYA M.V., RASHKES Y.V. et YUNUSOV S.Y. (1970). Péganine: A new alkaloid from *Peganum harmala* L. *Khimia prirodnykh soedinenii*, 6(4), 453-455.

KOBLICOVA Z., TURECEK F., NINOVA P., TROJANEK J. et BLAHA K. (1983). Verbaskine, a macrocyclic spermine alkaloid of a novel type from *Verbascum pseudorobile* Stoj. and Stef. (Scrophulariaceae). *Tetrahedron Letters*, 24 (40), 4381-4384.

KUMAR A., SHARMA P.R. and MONDHE D.M. (2007). Potential anticancer role of colchicines-based derivatives : an overview. *Anti-Cancer Drugs*, 28(3), 250-262.

LANSIAUX A. (2007). Quelles nouvelles à propos des antimetabolites en oncologie ? *Oncologie*, 9(11), 746-750.

LENGLET G. (2010). Mécanismes d'actions de nouveaux agents alkylants ciblant de l'AND ou les protéines. Thèse de Doctorat. Université de Droit et de la santé-Lille II, Lille, France.

LINK A., BALAGUER F. et GOEL A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol*, 80(12):1771-92.

MARY H. (2015). Analyse et Modélisation de la Dynamique des Chromosomes durant la Mitose chez la Levure à Fission. Université de Toulouse, France. Thèse.

MAYAD E.H., IDRISSE HASSANI L.M., FERJI Z.CHEBLI B. et EL HADEK M. (2013). Quantitative and qualitative analysis by HPLC of major *Peganum harmala* L. alkaloids at different of Development. *J of Nat.Sci.Res.*, 3(11), 1-9.

MEDDOUR R. (2009). La Flore Médicinale et ses Usages Actuels en Kabylie (wilaya de Tizi-Ouzou, Algérie) : Quelques Résultats d'une Etude Ethnobotanique. *Revue des Régions Arides*, n° Spécial, pp. 181-201. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, Algérie.

MEIJER L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 5, 311-326.

MOGHADAM M.S., MALEKI S., DARABPOUR E., MOTAMEDDI H. et SEYYED NEDJAD S.M. (2010). Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 262-265.

MONSEF H.R., GHOBADI A. et IRANSHAHI M. (2004). Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*, 7, 65-69.

MOSSERAY R. (1935). Matériaux pour une flore de Belgique : IV-le genre *Verbascum*. Royal Botanical Society of Belgium, (68), 88-103.

MOUSAVI S.N.M., DELAZER A., NAZEMIYEH H. and KHODAIE L. (2015). Biological activity and photochemical study of *Scutellaria platystegia*. Iranian journal of Pharmaceutical Research, 14(1), 215-223.

MURBERK S. (1933). Monographie Der Gattung *Verbascum*. Acta Univ. Lund ser, Lund. Vol. 29/2, p.630.

MURRAY K.R., BENDER D.A., BOTHAM K.M., KENNELLY P.J., RODWELL V.W. et WEIL P.A. (2011). Muscle et cytosquelette in Biochimie de Harper, 4ème Edition . Chapitre 49, Editions DE Boeck, ISBN 978-2-8041-6223-8, Bruxelles. 545-565.

NAFISI S, ASHARI M.H., NEZHADI M.A., EKHTIARI M.S. (2011). Possible antidiabetic effect of *Peganum harmala* on streptozocine-induced mouse. World Appl Sci J, 14, 822-4.

NASEHI M, PIRI M, NOURI M, FARZIN D, NAYER-NOURI T, ZARRINDAST MR (2010). Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. Eur J Pharmacol, 634, 77-83.

NEGRE R. (1962). Petite flore des régions arides du Maroc occidental Tome II. Edi. C. N. R.S. Paris VII.

NENAAH G. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* L. Seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 81, 779-782.

NEWMAN M.A. et ERBS G. (2012). The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology*, 13, 95-104.

NORBURY C. and NURSE P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 411-470.

Ozenda P., (1991). Flore du Sahara : contribution à l'étude phytochimique de deux espèces *Pimpinella* et *Peganum*. 2^{ème} Ed. CNRS, p.662.

POLETTI A. (1988). Fleurs et plantes médicinales. 2^{ème} Ed., Delachaux & Niestlé, Suisse.

PUOCI F., MORELLI C., CIRILLO G., PARISI O. I., MARIS. P, SISI D. et PICCI N. (2012). Anticancer activity of a quercetin-based polymer towards HeLa cancer cells. *Anticancer. Res*, 32, (7), 2843-2847.

RHATTAS M. (2016). Etude Ethnobotanique des Plantes Médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif Occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 97, 36- 37 ;

- ROBERT J. (2007).** Les poisons du fuseau. *Oncologie* ,9 11, 766- 772.
- ROGALSKA A., MISIEWICZ K. et MARCZAK A. (2015).** Inhibitors of microtubule polymerization-new natural compounds as potential anti-cancer drugs .*Postepy Hig Med Dosw* , 69 , 517-585.
- SHWETA S., KHADABADI S. et GANESH T.G. (2012).** In vitro antimitotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanolextract of *Revia hypocrateriformis*. *AsianPacific Journal of Tropical Disease*, 503-506.
- SAEED S.A.FFARNAZ S, SIMJEE R.U. MALIK A. (1993).** Triterpenes and B-sitosterol from piper betle: Isolation, antiplatelet and anti-inflammatory effects. *Biochem Soc Trans*, 21,462S.
- SENATORE Felice. RIGANO Daniela., FORMISANO Carmen., GRASSIA Armando., BASILE Adriana. et SORBO Sergio. (2007).** Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*, *Fitoterapia*, 78, 244-247.
- SOBHANI A.M. , EBRAHIMI S.A. , MAHMOUDIAN M. (2002).** An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *J Pharm Pharm Sci*, 5, 19-23.
- SPERANZA L., FRANCESCHELLI S., PESCE M., REALE M., MENGHINI L., VINCIGUERRA I., DE LUTIS M.A., FELACO M., et GRILLI A. (2010).** Anti inflammatory Effects in THP-1 cells Treated with *Verbascoside*. *Phytotherapy Research*, 24 (9), 1398-1404.
- TATLI I.I. and AKADEMIR Z.S (2004).**Chemical constituents of *Verbascum* L. species *FABAD journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(2), 93-107.
- WAKI H, PARK K.W. , MITRO N, Pei L, DAMOISEAUX R, WILPITZ D.C.(2007).** The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR ssssgamma expression. *Cell Metab* , 5,357-70.
- WATSON R.R ., PATEL V.B. and PREEDY VR .(2011).** Nuts and seeds in health and disease prevention. Elsevier, Burlington, p. 597.
- WIHELMINA FEEMSTER JASHAMSKI. (1999).** Apampeian herbal, ancient and modern medicinal plants, 1ere édition, University Texas. p.35.
- YARNELL E. (2007).** Plant chemistry in veterinary medicine.Medicinal constituents and their mechanisms of action. In: «Veterinary herbal medicine» ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- YOUSEFI., GHAFFARIFAR., DALIMI A.A. (2009) .**The Effect of *Alkannatin cturia* and *Peganum harmala* Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Iranian Journal of Parasitology* ,4, 40-47.

ZHAREKEEV B, KHASHIMOV K, TELEZHENETSKAYA M et YUNUSOV S. (1974). New alkaloids from *Peganum harmala*. *Chem Nat Compd*, 10,282-283.

ZHANG Y., MA Z., HU C., WANG L., Li L. et SONG S. (2012). Saponines triterpéniques cytotoxiques des feuilles d'*Aralia elata*. *Fitoterapia*, 83, 806-811.

Annexes

Annexe 1: Tableaux de pourcentage de cytotoxicité obtenue pour les trois observations des fractions testées et la colchicine.

Fraction	Les essais	Moyenne Ecart type
colchicine	66.190 56.600 44 .31	55.700 ±5.17
Eau	0.00 0.00 0.00	0.00± 0.00

(A): Tableau pourcentage de cytotoxicité obtenue pour les trois observations de la colchicine.

Fraction	Les essais	Moyenne Ecart type
Fraction d'alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i> L.	67.021 61.855 73	67.292± 2.628
Eau	0.00 0.00 0.00	0.00± 0.00

(B) : Tableau pourcentage de cytotoxicité obtenue pour les trois observations de la Fraction d'alcaloïdes de *Peganum harmala* L.

Fraction	Les essais	Moyenne Ecart type
Fraction d'alcaloïdes de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	74 73.684 81.395	76.359± 3.756
Eau	0.00 0.00 0.00	0.00± 0.00

(C) : tableau pourcentage de cytotoxicité obtenue pour les trois observations de la Fraction d'alcaloïdes de *Verbascum sinuatum* L.

Annexe 2 : Résultats obtenus de l'analyse des pourcentages de cytotoxicité par le test ANOVA à un facteur.

	ddl	SC	CM	F	Proba
Fraction	8,00	18262,19	2282,77	65,84	0,00
Var.résiduelle	18,00	624,08	34,67		
Total	26,00	18886,26			

(A) : comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre les différentes fractions testés.

Eau colchicine Effect	Univariate Tests of Significance for activité (Spreadsheet34) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept		1	4653,735	77,37455	0,000921
fraction	4653,735	1	4653,735	77,37455	0,000921
Error	240,582	4	60,146		

(B) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre le témoin négatif (l'eau distillée) et la colchicine.

FAIV et Col Effect	Univariate Tests of Significance for activité (Spreadsheet34) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	26158,44	1	26158,44	375,5227	0,000042
fraction	640,05	1	640,05	9,1883	0,038734
Error	278,64	4	69,66		

(C) : comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre le témoin négatif (l'eau distillée) et la Fraction d'alcaloïdes de *Verbascum sinuatum* L.

FAIP COL Effect	Univariate Tests of Significance for activité (Spreadsheet34) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	22689,81	1	22689,81	299,6810	0,000065
fraction	201,49	1	201,49	2,6613	0,178155
Error	302,85	4	75,71		

(D) : comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre le témoin négatif (l'eau distillée) et la Fraction d'alcaloïdes de *Peganum harmala* L.

Annexe 3 : résultat du test de Newman -keuls (classement en groupes homogènes).

Fraction	Groupe
Eau distillée	A
La phase aqueuse de la Fraction des flavonoïdes de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	A
La phase aqueuse de la Fraction des flavonoïdes des feuilles <i>Peganum harmala</i> L.	B
Quercetine	BC
Colchicine	BCD
La phase butanolique de la Fraction des flavonoïdes des feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	CDE
La fraction d'alcaloïdes des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.	DE
La phase butanolique de la Fraction des flavonoïdes des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.	E
La fraction d'alcaloïdes des feuilles de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	E