

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



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Biochimie de la nutrition

Thème

**Evaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif des flavonoïdes des feuilles de
Verbascum sinuatum L.**

Rédigé par :

ABDALLAH Katia

CHERFI Dalila

Soutenu devant le jury :

M^r HOUALI K.	Professeur	UMMTO	Président
M^{me} AICHE-IRATNI G.	Maître de conférences B	UMMTO	Promotrice
M^{me} OUZID Y.	Maître de conférences B	UMBB	Co-promotrice
M^r MOUALEK I.	Maître de conférences A	UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Monsieur HOUALI K, professeur en microbiologie à l'université de MOULOUD MAMMERI de TIZI-OUZOU de nous avoir accueillies au sein de son laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB).

Nous sommes très reconnaissante à Madame AICHE-IRATNI GHENIMA, maître de conférences classe B à l'UMMTO d'avoir accepté d'encadrer ce travail ainsi que sa gentillesse et ses conseils.

Nous désirons aussi exprimé toute notre gratitude à Dr OUZID YASMINA, pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité à tout moment et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous tenons également à remercier Mr MOUALEK I, maître de conférences classe A pour avoir accepté d'examiner notre travail.

On tient également à remercier M^{me} RABEHI HOURIA, l'ingénieur de laboratoire pour sa gentillesse.

On remercie aussi tout le personnel de laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB).

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui m'ont encouragé à être ce que je suis, et pour leur sacrifices. Et à ma grand-mère.

A mes chères sœurs et mon cher frère.

DALILA

Dédicace

A mon très cher papa « MOHAMMED » que DIEU t'accueille dans son vaste paradis.

A ma mère pour ses sacrifices.

A mon oncle RABAH « deuxième père ».

A mon mari pour son soutien et son encouragement.

A toute ma famille et ma belle famille.

A tous mes amis.

KATIA

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
--------------------	---

Partie bibliographique

1.1 Description botanique de <i>Verbascum sinuatum</i> L	2
1.2 Classification systématique	3
1.3 Usages traditionnel	3
1.4 Métabolites secondaire de <i>Verbascum sinuatum</i> L	4
1.4.1 Les flavonoïdes de <i>Verbascum sinuatum</i> L	5
1.4.2 Autres métabolites secondaires	6
1.4.2.1 Les composés terpénique	6
1.4.2.2 Les alcaloïdes	7
2.1 Les phases du cycle cellulaire	8
2.1.1 L'interphase	8
2.1.2 La mitose	9
2.2 Action des métabolites secondaires sur le cycle cellulaire	11
2.2.1 Action sur l'ADN	11
2.2.2 Action sur les microtubules : poisons du fuseau mitotique	13
2.2.3 Action sur les enzymes (inhibiteurs des kinases cycliques-dépendante)	15

Partie expérimentale

1 Matériel et méthodes	18
1.1 Matériel	18
1.1.1 Matériel Biologique	18
1.1.2 Solvants et réactifs	19

1.1.3 Matériel de laboratoire.....	19
1.2 Méthodes	19
1.2.1 Extraction des fractions flavonoïdes.....	19
1.2.2 Préparation du milieu de culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.2.3 Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antiproliférative.....	21
1.2.4 Analyse statistique.....	24
2 Résultats et discussion.....	24
2.1 Extraction des flavonoïdes	24
2.2 Activité antiprolifératif des flavonoïdes de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	25
2.2.1 Action de la quercétine sur la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.2.2 Action de la fraction butanolique des flavonoïdes sur la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.2.3 Action de la fraction aqueuse sur la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.3 Synthèse d'étude sur l'effet antiprolifératif et cytotoxique de <i>Verbascum sinuatum</i> L.....	29
Conclusion	30
Références bibliographiques	31
Annexes	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine-Triphosphate

CDK : Kinases dépendantes des cyclines

EDS: Eau distillée stérile

G1: Gap 1 (intervalle 1).

G2: Gap 2 (intervalle 2).

GDP: Guanosine diphosphate

GTP: Guanosine triphosphate

HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance

OMS: Organisation mondiale de la santé.

PDB: Potato Dextrose Broth

SM : Spectroscopie de masse

T⁺: Témoin positif

T⁻: Témoin négatif

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Les différentes parties de <i>Verbascum sinuatum L.</i>	2
2	Les 3 principales classes de métabolite secondaire.	4
3	Structure de base des flavonoïdes	5
4	Structure chimique des différentes classes de flavonoïdes	6
5	Structure de la Verbacine	7
6	Les différentes phases du cycle cellulaire	8
7	Structure des microtubules	13
8	Structure et localisation du site de la colchicine dans la beta tubuline	14
9	Mécanisme d'action des inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes	16
10	Structure de la quercétine	17
11	Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction des fractions flavonoïque	20
12	Courbe d'étalonnage de nombre de cellule de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction de la densité optique	22
13	Les différentes étapes du test antiprolifératif	23
14	Extrait méthanolique (A), les deux fractions aqueuse et butanolique(B)	25
15	Action des fractions des feuilles de <i>Verbascum sinuatum L.</i> sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sous microscope optique (X400)	25

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
1	Les différentes étapes qui constituent la mitose	10
2	Les principaux agents ciblant l'ADN	12
3	Les principales molécules inhibitrices d'assemblage et désassemblage de la tubuline en microtubule.	15
4	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
5	Solvants et réactifs utilisés	19
6	Le pourcentage de cytotoxicité de la quercétine	26
7	Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction butanolique.	27
8	Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction aqueuse	27
9	Résultats du classement des moyennes des pourcentages de cytotoxicité (%) par le test Newman-Keuls.	28

Résumé

Les plantes médicinales sont une source très importante de métabolites bioactifs naturels. Ces derniers, sont à l'origine de plusieurs activités biologiques, principalement antiproliférative, anti-inflammatoire et antimittotique. C'est dans cette optique que nous sommes intéressées à une plante du bassin méditerranéen très utilisée en médecine traditionnelle : *Verbascum sinuatum* L. La présente étude vise à évaluer l'effet antiprolifératif et cytotoxique de deux fractions de flavonoïdes (aqueuse et butanolique) des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. La méthode utilisée est celle de la coloration au bleu de méthylène utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote. La quercétine est utilisée comme un flavonoïde de référence.

Les deux fractions de flavonoïdes (aqueuse et butanolique) ont inhibé la croissance cellulaire. Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction aqueuse des flavonoïdes de *Verbascum sinuatum* L. est estimé à $7.837 \pm 2.262\%$. Contrairement à la fraction butanolique des flavonoïdes qui possède un pourcentage de cytotoxicité plus élevé 63.650 ± 1.607 . Le test statistique type ANOVA a révélé des différences hautement significatives entre les fractions et notre témoin. Un test complémentaire de Newman keals a mis en évidence la présence de trois groupes homogènes.

Mots clés : *Verbascum sinuatum* L., fraction aqueuse des flavonoïdes, fraction butanolique des flavonoïdes, *Saccharomyces cerevisiae*, effet antiprolifératif et cytotoxicité.

Abstract

Medicinal plants are a very important source of natural bioactive metabolites. The latter are at the origin of several biological activities, mainly antiproliferative, anti-inflammatory and antimutagenic. It is in this perspective that we are interested in a plant of the Mediterranean basin very used in traditional medicine: *Verbascum sinuatum* L. The present study aims at evaluating the antiproliferative and cytotoxic effect of two fractions of flavonoids (aqueous and butanolic) of the leaves of *Verbascum sinuatum* L.. The method used is methylene blue staining using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a eukaryotic cell model. Quercetin is used as a reference flavonoid.

Both flavonoid fractions (aqueous and butanolic) inhibited cell growth. The percentage cytotoxicity of the aqueous flavonoid fraction of *Verbascum sinuatum* L. is estimated to be $7.837 \pm 2.262\%$. In contrast to the butanolic fraction of flavonoids which has a higher percentage of cytotoxicity 63.650 ± 1.607 . The ANOVA type statistical test revealed highly significant differences between the fractions and our control. A complementary Newman Keuls test showed the presence of three homogeneous groups.

Keywords: *Verbascum sinuatum* L. aqueous flavonoid fraction, butanol flavonoid fraction, *Saccharomyces cerevisiae*, antiproliferative effect and cytotoxicity.

De l'antiquité à nos jours, l'Homme s'est toujours donné les moyens de combattre la douleur ; ces moyens efficaces ou non lui sont souvent fournis par son environnement naturel et sont essentiellement à base de plantes. Les extraits des plantes étaient, déjà, connus et utilisés par les égyptiens, les romains et les grecs, pour leurs propriétés odorantes et médicinales (DIALLO et DIOUF, 2000). Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments (MOHAMMEDI, 2013).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2006), le cancer représente une cause majeure de décès dans le monde, plus que le nombre de décès causés par le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme réunis. Dans les pays industrialisés, le cancer constitue la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Néanmoins, différents types de traitements sont possibles comme la chimiothérapie. De plus, elles présentent de nombreux effets indésirables du fait de son mécanisme d'action peu sélectif. Ce qui doit motiver la recherche et le développement de nouvelles molécules afin de proposer des thérapies beaucoup plus spécifiques des maladies cancéreuses (OMS, 2006).

A ce sujet, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale algérienne : *Verbascum sinuatum* L. pour ces nombreux effets et vertus thérapeutiques. Cette plante présente une mine de composés bioactifs très intéressants (ZHANG et WANG, 2008). Cependant les flavonoïdes font partis des métabolites secondaires les plus étudiés en raison de leur utilisation dans le domaine pharmaceutique et médicinal pour leurs effets bénéfiques pour la santé et leur capacité de prévenir un grand nombre de pathologies (AVIGNON *et al.*, 2010).

Notre travail est basé sur l'évaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif et cytotoxique de la fraction flavonoïque (fraction aqueuse et butanolique) des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur *Saccharomyces cerevisiae*.

Le genre *Verbascum* communément appelé «mullein» appartient à la famille *Scrophulariaceae* et à l'ordre des Lamiales, connue sous le nom «thisira thisraou» en arabe (SERVAIS PASCAL et SEBA PIERRE, 2017), avec environ 2500 espèces dans le monde (TATLI I *et al.*, 2004), et 360 espèces hybrides (QUEZEL et SANTRA, 1963). *Verbascum* est largement distribué dans le nord tempéré de l'Europe, l'Asie et l'Afrique. C'est une plante méditerranéenne, elle est commune dans le tell algérien. Elle se développe dans les champs et les pelouses, sur les terres en friche, au bord des chemins, dans les jardins et sur les sols arides (BRAY, 2011).

Description botanique de *Verbascum sinuatum* L.

Verbascum sinuatum L. présente généralement des feuilles qui sont disposées en rosette basale ou alternées couvertes de poils étoilés (SERVAIS PASCAL et SEBA PIERRE., 2017). Les fleurs sont irrégulières, à corolle de cinq pétales répartis en deux lèvres. Avec des étamines postérieures fréquemment avortées et remplacées par une écaille (RIAZ *et al.*, 2013). Le fruit est une capsule portant des graines (MOSSERY, 1935). Ces différentes parties sont représentées dans la figure 1.

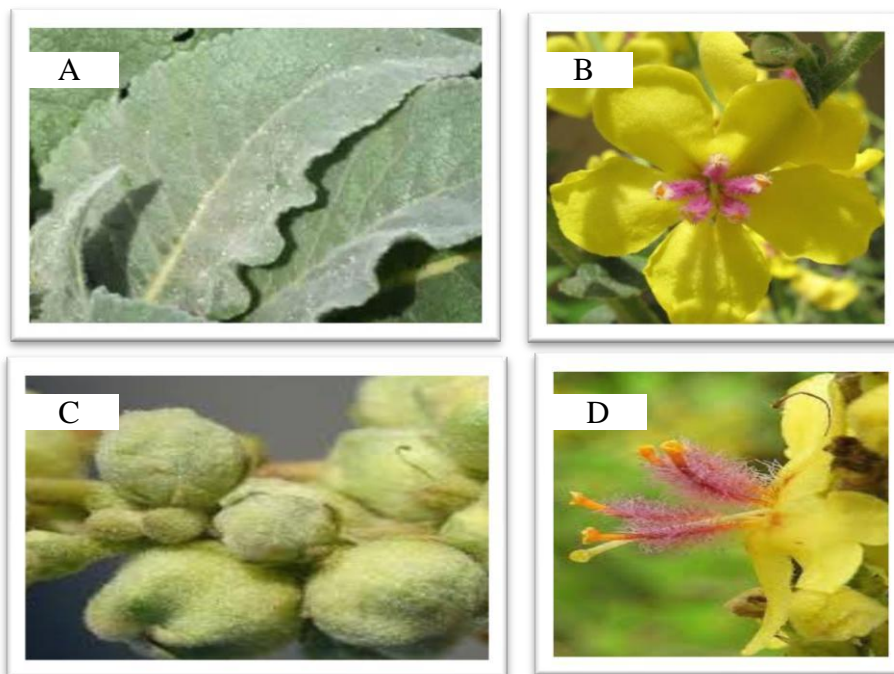


Figure 1: les différentes parties de *Verbascum sinuatum* L. (TISON et FOUCAULT, 2014).

A: feuilles. **B:** fleurs. **C:** étamine. **D:** fruit

Classification systématique

La classification systématique de *Verbascum sinuatum* est résumée ci-dessous. Selon SOTOODEH (2015).

Super-Embranchement	Spermatophytes
Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotyledones
Sous-classe	Asteridées
Ordre	Lamiales
Famille	Scrophulariacées
Tribu	Verbascées
Genre	<i>Verbascum</i>
Espèce	<i>Verbascum sinuatum</i>

Usages traditionnel

Les différentes parties de *Verbascum* ont été utilisées dans la médecine traditionnelle, elles ont une importance pharmacologique potentielle. Ces différents usages sont les suivants :

- ✓ Les fleurs servent à apaiser le mal de l'oreille. Elles peuvent être également appliquées dans le traitement de l'eczéma et d'autres types de maladies de la peau. Elles servent également pour soulager les douleurs abdominales (TATLI et AKDERMIR., 2006) ;
- ✓ Les feuilles et les racines de *Verbascum sinuatum* L. sont utilisées contre les maladies oculaires. Elles présentent aussi des activités antiseptiques, antispasmodique, antihistaminique et antioxydant (SENATORE *et al.*, 2007) .Les huiles essentielles des feuilles de *Verbascum Sinuatum* L. ont un effet antibactérien. Elles sont utilisées contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* et *Klebseilla pneumoniae* agents pathogènes responsables d'affections pulmonaires, gastriques et dermatologiques (SENER et DULGER 2009).

Métabolites secondaires de *Verbascum sinuatum* L.

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, dont la structure chimique est souvent complexe. Le métabolite secondaire de cette plante révèle la présence de nombreux constituants chimiques : les poly phénols (flavonoïdes), les composés terpéniques et les alcaloïdes (TATLI et AKDEMIR, 2004). La figure 2 schématise ces 3 principales classes du métabolite secondaire.

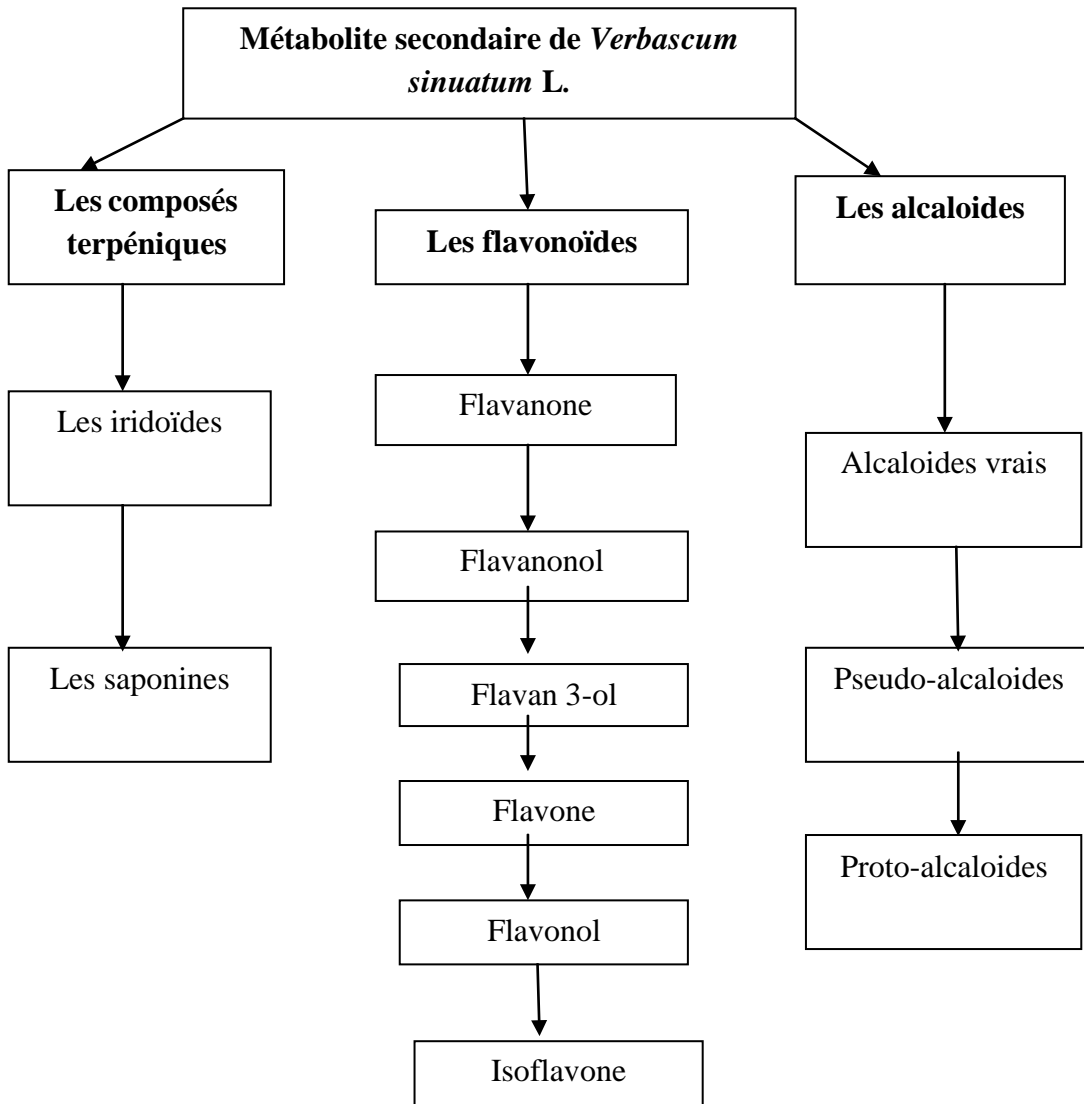


Figure 2: les 3 principales classes de métabolites secondaires.

Les flavonoïdes de *Verbascum sinuatum* L.

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base représentée par deux cycles aromatiques A et B reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C. La figure suivante représente la structure de base des flavonoïdes.

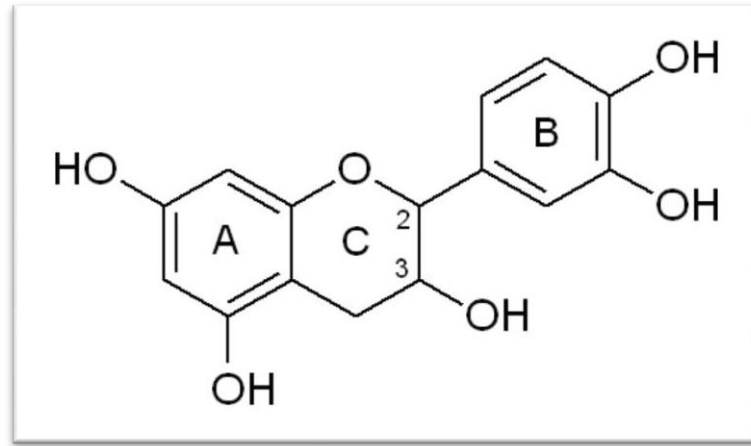


Figure 3 : structure de base des flavonoïdes (DACOSTA, 2003).

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund I 2004). Le terme flavonoïde dérive du mot grec flavus qui veut dire jaune (WOLLENWEBER, 1980). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Ils possèdent de nombreuses vertus médicinales, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales et des effets protecteurs sur le foie.

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : flavones, flavonones, flavonols, anthocyanes (D'ARCHIVO, 2007) présentés dans la figure ci-dessus.

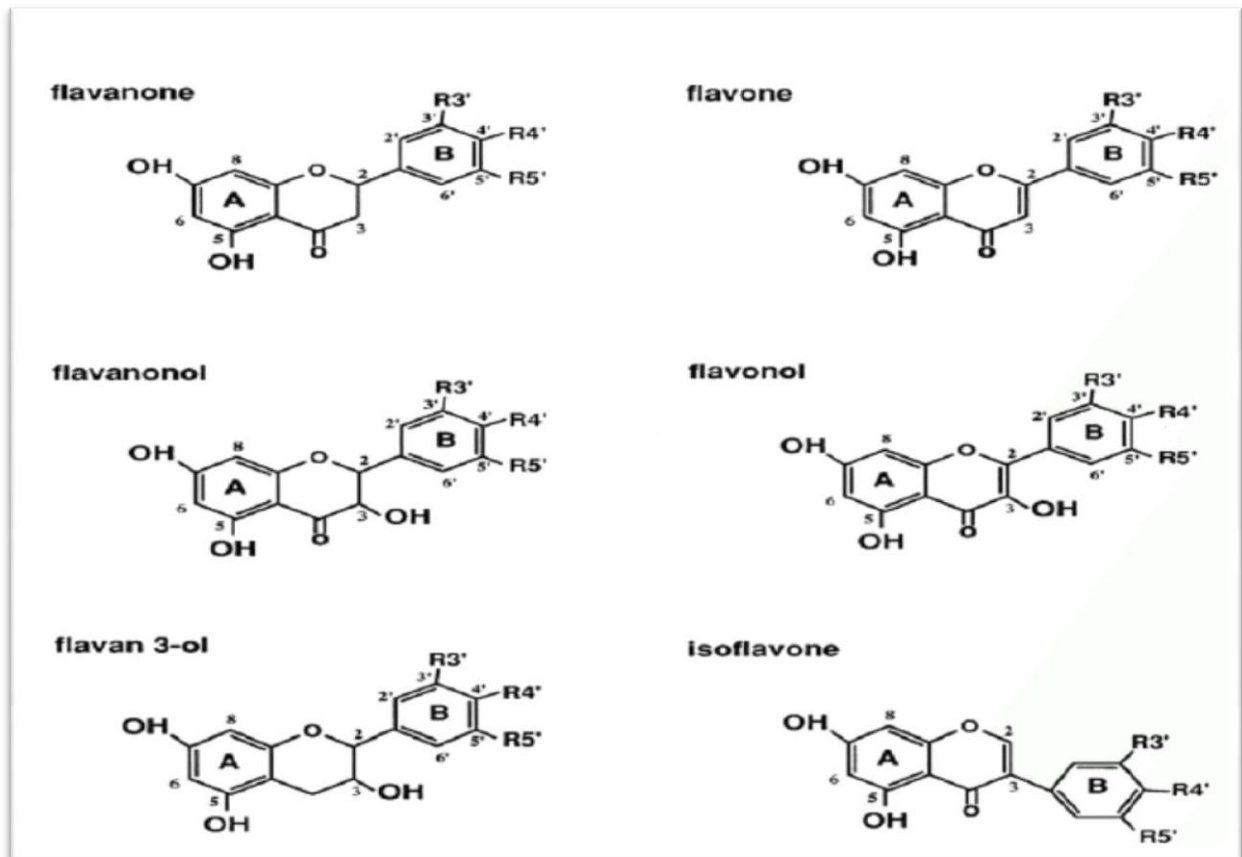


Figure 4 : structure chimique des différentes classes de flavonoïdes (D'ARCHIVO, 2007).

Autres métabolites secondaires

Les composés terpénique

Les terpénoides constituent la plus large classe de composés secondaires. Ce sont des molécules à nombre de carbones multiple de 5, et dont le précurseur est l'isoprène. Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA, ce sont donc des molécules hydrophobes. Les iridoïdes et les saponisides sont les principaux composés terpéniques du genre *Verbascum* (BIANCO *et al.* 1980) parmi ces composés on distingue :

✓ Les iridoïdes

Les iridoïdes qui représentent un groupe important de monoterpénoides, sont des constituants naturels d'un grand nombre d'espèces de *Verbascum*. Les espèces de *Verbascum* contiennent surtout des iridoïdes de type aucubine et catalpol et leurs dérivés acylés sont modifiés par des acides aliphatiques et aromatiques.

✓ Les saponines

C'est l'un des principaux groupes du genre *Verbascum*. Les études photochimiques sur ces espèces ont révélé la présence de saponines triterpéniques de type oléane, généralement monodesmosidiques, et dont les fragments de sucre sont fixés en C-3 (OH).

Les alcaloïdes

Les alcaloïdes dérivant de spermine sont les plus fréquemment rencontrés dans le genre *Verbascum*, ils sont en général des composés présentant un squelette macrocyclique. Ils comportent un ou plusieurs substituants, soit sur un atome d'azote, soit sur un atome de carbone du cycle (BAKKALI, 1997). La Verbacine (figure 5) constitue un exemple de ce type d'alcaloïdes.

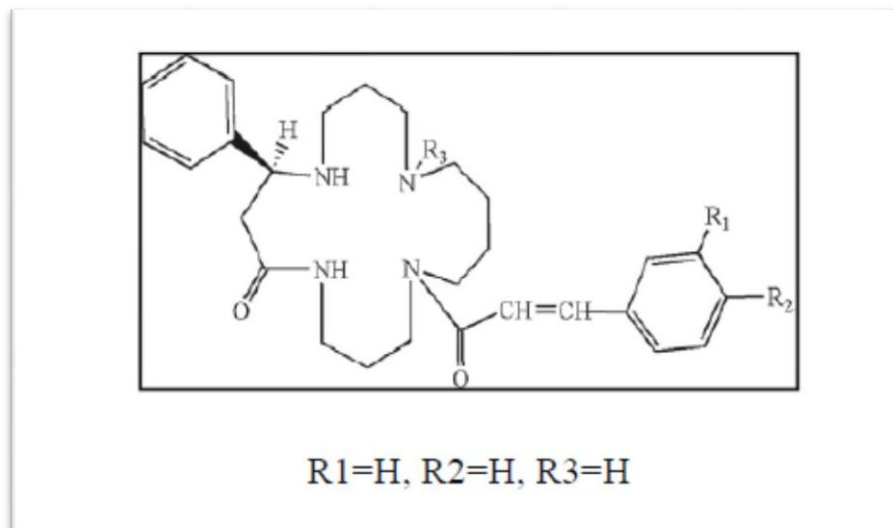


Figure 5 : structure de la Verbacine (ALIPIEVA *et al.*, 2014).

La vie de la plupart des cellules se déroule selon un mode cyclique caractérisé par l'alternance de mitoses, et de phases inter mitotiques dites encore interphases, pour donner deux cellules filles (CAU et SEITE, 2009).

Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de deux grandes étapes, l'interphase qui comporte 3 phases : G1, S, G2 et la mitose (phase M). Ces phases sont représentées dans la figure 6.

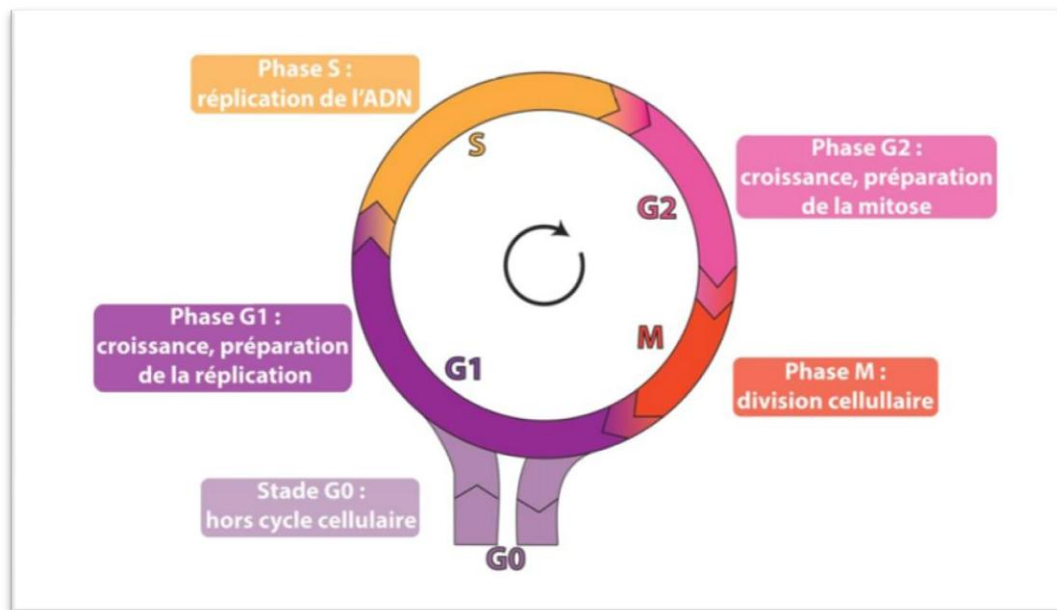


Figure 6 : les différentes phases du cycle cellulaire (CLAUDE *et al.*, 2004).

L'interphase

Cette phase représente généralement 90% de la durée du cycle, elle comporte trois phases distinctes appelées G1, S, G2 (VALLOT, 2017) :

- ✓ La phase G1 (G = gap, intervalle)

Une phase de croissance durant laquelle la cellule va augmenter en taille et accroître son volume cellulaire. C'est aussi durant cette période qu'elle va synthétiser l'ensemble des protéines spécifiques (MAILLET, 2002).

✓ la phase S (s pour synthèse)

Phase caractérisée essentiellement par la réplication d'ADN, à la fin de laquelle chaque chromosome dupliqué sera constitué de deux chromatides sœurs. Durant cette étape à lieu également la duplication des centrosomes (FAVRO et NICOLLE, 2011).

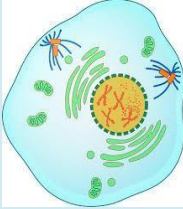
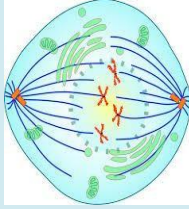
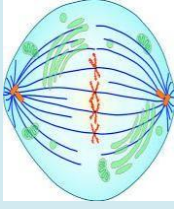
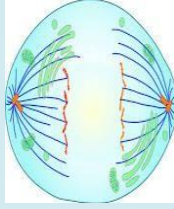
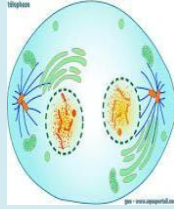
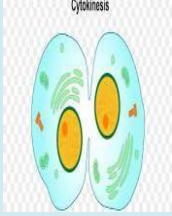
✓ La phase G2

La phase G2 est une phase courte, d'une durée de 4 à 5 heures, débutant dès que la réplication d'ADN est achevée, c'est une période durant laquelle la cellule fabrique les protéines nécessaires à la division cellulaire comme la tubuline (NORBURY et NURSE, 1992).

La mitose

La mitose est la phase la plus courte du cycle cellulaire; elle dure environ 1heure. Il s'agit de la phase au bout de laquelle, une cellule se divise pour donner deux cellules filles. Elle est généralement composée de 5 phases : la prophase, la pro métaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (tableau I) (GHRAM, 2018).

Tableau I : Les différentes étapes qui constituent la mitose (VALLOT, 2017).

Prophase	pro métaphase	Métaphase	anaphase	Télophase	cytokinèse
					
<p>-L'ADN se condense et les chromosomes deviennent visibles (chacun est formé de 2 chromatides sœurs)</p> <p>-les fibres du fuseau mitotique se forment entre les deux centrosomes de la cellule</p> <p>-l'enveloppe nucléaire se désagrège</p> <p>-les centrosomes se déplacent vers les pôles opposés de la cellule.</p>	<p>-L'ADN des chromosomes continue à se condenser</p> <p>-les kinétochores se forment sur les centromères des chromosomes</p> <p>- des microtubules s'allongent à partir des 2 centrosomes et vont s'attacher aux kinétochores.</p>	<p>- les chromosomes sont localisés au milieu de la cellule, formant la plaque métaphasique .</p> <p>- les chromatides sœurs sont attachées à des microtubules différents venant de pôles opposés.</p>	<p>- le centromère de chaque chromosome est coupé en deux</p> <p>- les chromatides sœurs s'éloignent l'une de l'autre, tirée chacune vers l'un des pôles de la cellule. Elles sont maintenant appelées chromosomes des cellules filles</p> <p>-les fibres de fuseau mitotique s'étirent et allongent la cellule.</p>	<p>- les chromosomes arrivent aux pôles de la cellule et leur ADN commence à se décondenser</p> <p>- des membranes nucléaires s'organisent autour de chaque groupe de chromosomes</p> <p>- les microtubules reliés aux kinétochores se désagrègent</p> <p>- les fibres du fuseau mitotique continuent à écarter les pôles l'un de l'autre.</p>	<p>- cas des cellules animales : un sillon de clivage se forme pour séparer les deux cellules filles</p> <p>- cas des cellules végétales : une nouvelle paroi se forme au milieu de la cellule mère et elle finit par être divisée en deux.</p>

Action des métabolites secondaires sur le cycle cellulaire

Aujourd'hui, la recherche de produits antimétabolites à des fins thérapeutiques s'appuie sur l'utilisation directe de régulateurs du cycle cellulaire comme cibles (POMMIER et KOHN, 2003). Les agents antimétabolites représentent des substances qui, à faible ou relativement faible concentration, sont capables de perturber ou d'inhiber la mitose (CHEVREMONT, 1979). Ils peuvent agir sur la réplication de l'ADN, sur la polymérisation ou la dépolymérisation des microtubules et sur les enzymes de cycle cellulaire.

Action sur l'ADN

Il existe de nombreuses molécules bioactives d'origine végétale qui ciblent l'ADN pour bloquer sa transcription et empêcher sa réplication (LENGLET., 2010). Les principaux agents sont classés dans le tableau suivant :

Tableau II : Les principaux agents ciblant l'ADN.

Agents ciblant l'ADN	Mode d'action	Exemple	référence
Les agents alkylants	Groupe d'agents chimique, possède la propriété de fixer un groupement alkyl sur les acides nucléiques. Ils se fixent sur deux sites proches pour créer des ponts (intra ou inter brins) dans les chins d'ADN bloquant ainsi la transcription et la réplication de ce dernier.	-L'homoharringtonine -Les dérivés du platine (Cisplatine, Carboplatine).	-(ESPINOSA <i>et al.</i> , 2003)
Les agents scindants	Agents d'origine naturelle en se fixant sur l'ADN et provoquent des cassures et des délétions chromosomiques.	-la bléomycine	(FOLLEZOU et POUILLART, 1980).
Les antimétabolites	Molécules qui interfèrent dans la synthèse des acides nucléiques par : -inhibition de la biosynthèse des nucléotides ; et ou par incorporation dans l'ADN comme analogues structuraux des bases nucléiques.	- les antis foliques (le méthotrexate) -les analogues des purines (le 6-mercaptopurine). -Les analogues des pyrimidines (la capécitabine).	(LANSIAUX, 2004).
Inhibiteurs des topoisomérases	Molécules qui stabilisent le complexe ADN-topo-isomérases (enzyme qui induisent des cassures transitoires puis des relégations lors de la réplication et la transcription) empêchant ainsi la relégation des brins d'ADN conduisant à l'apoptose de la cellule.	-les inhibiteurs des topo-isomérases I (la camptothécine) -les inhibiteurs des topoisomérases II (les dérivés de la podophyllotoxines).	(GOLDWASSER, 2007).

Action sur les microtubules : poisons du fuseau mitotique

La tubuline est une protéine de 50kDa existe sous forme d'hétéro dimères associant une molécule de tubuline α et une molécule de tubuline β . Au cours du processus de polymérisation, les hétéro dimères constitués de tubuline α β , disposé de façon polarisée, sont capable de se lier pour former des protofilaments (figure 7). Ils ont un rôle structural et participent à la constitution du micro squelette cellulaire et du fuseau mitotique intervenant dans les fonctions de sécrétion, de motilité, de transport axonal et la migration des chromosomes cours de la mitose (ROBERT, 2007).

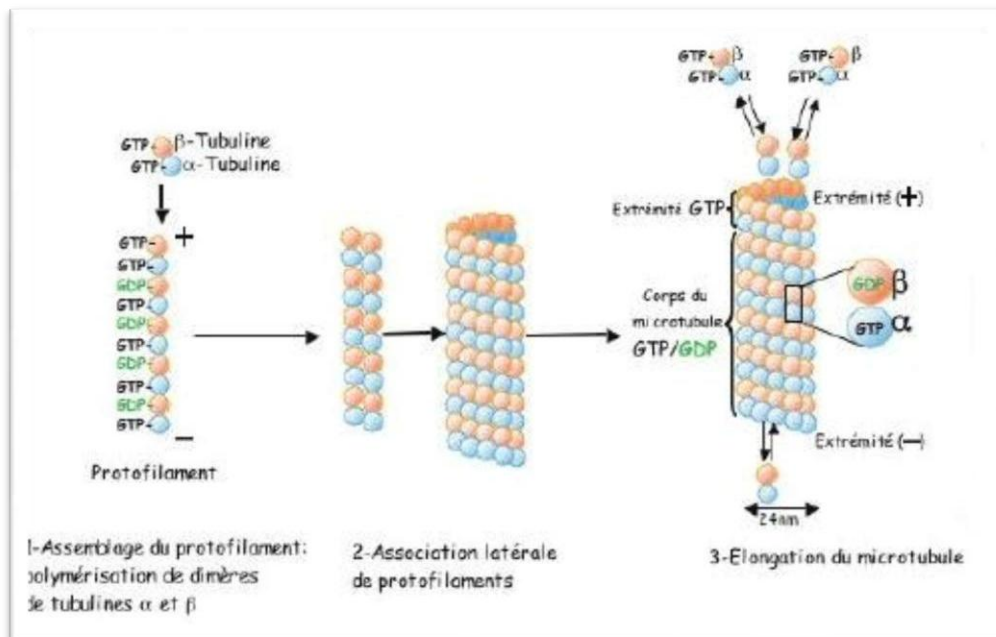


Figure 7 : structure des microtubules (ROBERT, 2007).

Dans un cycle mitotique il ya deux moments favorables à l'action des poisons du fuseau (MAUSSANG, 2005) :

- ✓ au cours de la polymérisation des tubulines en microtubules ce qui correspond à l'action des inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules (alcaloïdes de vinca ; colchicine ; podophyllotoxines).
- ✓ au moment de la dépolymérisation des microtubules en tubuline ce qui correspond à l'action des inhibiteurs de désassemblage des microtubules en tubulines (taxoïdes).

Plusieurs substances ont la capacité d'inhiber l'assemblage de la tubuline en microtubules, on site :

La colchicine qui est un alcaloïde extrait des tiges souterraines charnues du colchique *colchicum autumnale* L. (Liliaceae), qui en se fixant sur une molécule de la tubuline empêche sa polymérisation en microtubules. Le domaine de liaison de la colchicine, se situe entre les deux sous-unités d'un même dimère (RAVELLI *et al*, 2004). On se liant à ce dimère, la colchicine forme un complexe faiblement réversible avec la tubuline. Ce complexe adopte une configuration incurvée défavorable à la polymérisation des microtubules.

L'absence ou l'insuffisance des microtubules entraine le blocage de la division cellulaire au stade métaphase : l'inhibition de la motilité cellulaire et le transport intracellulaire des vésicules et des organites (GARRETT et GRISHAM, 2000).

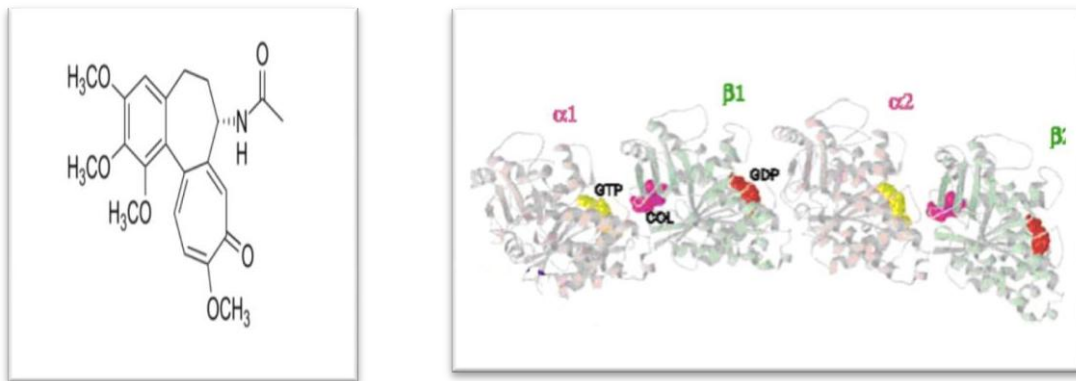


Figure 8 : structure et localisation du site de la colchicine dans la beta tubuline (FIELD *et al.*, 2013).

Autres molécules inhibitrice d'assemblage et désassemblage de la tubuline en microtubules sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau III : les principales molécules inhibitrices d'assemblage et désassemblage de la tubuline en microtubule.

	Molécule	Source	Mode d'action	Références
Inhibiteurs d'assemblage	Vinca alcaloïdes (vinblastine, vincristine, vinorelbine, vindésine).	<i>Catharanthus roseus</i>	Ils se lient à l'interface entre deux hétéro dimères, dans une région proche du site d'échange GDP/GTP. Après liaison, elles exercent leur activité en inhibant la polymérisation de la tubuline en microtubules et bloquent la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau et la dispersion des chromosomes.	(MARTINO <i>et al.</i> , 2018)
	Les podophyllotoxines	<i>Podophyllum peltatum</i>	L'effet inhibiteur est dû à sa fixation à la tubuline qui se traduit par la modification de la structure de cette protéine en la rendant impropre à la formation de microtubules.	(LEE et XIAO, 2005)
Inhibiteurs de désassemblage	Les taxanes	<i>Taxus brevifolia</i>	Le domaine de liaison des taxanoïdes se situe sur la tubuline β . Les taxanoïdes en se liant aux tubulines, facilitent leur polymérisation, inhibant ainsi la dépolymérisation des microtubules, ils empêchent donc la formation et la disparition des fuseaux mitotiques	(KOTSAKIS <i>et al.</i> , 2016 ; OUDARD <i>et al.</i> , 2017)

Action sur les enzymes (inhibiteurs des kinases cycliques-dépendante)

Les CDKS sont des sérine-thréonine kinases, enzymes qui catalysent la phosphorylation de protéines cible jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire (fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN ...), ou dans l'avancement du cycle. L'action principale des inhibiteurs s'effectue au niveau du site de phosphorylation des protéines kinases par l'introduction d'un composé mimique à l'ATP (figure 9) (GORDON *et al* ; 2005).

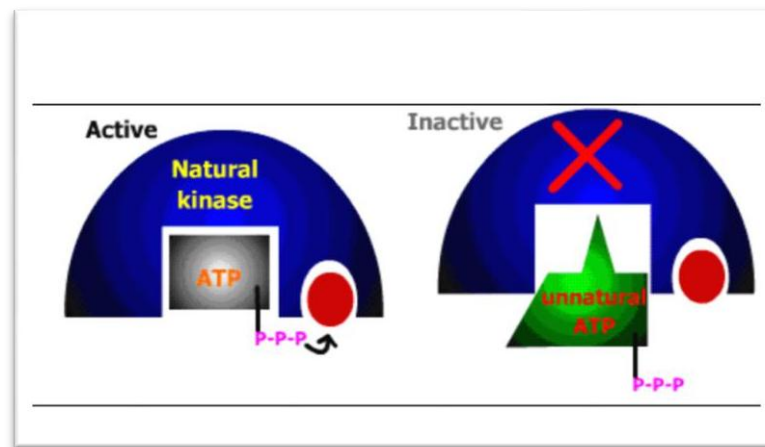


Figure 9 : mécanisme d'action des inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes (CDK) (GORDON, 2005).

Les inhibiteurs des kinases cycliques-dépendantes ont des propriétés antimitotiques et induisent l'apoptose (la mort cellulaire) (MEIJER *et al* ; 2001).

La quercétine est l'un des flavonols le plus répandu dans les végétaux (les oignons rouges, les pommes, le thé...) notamment dans les parties aériennes du genre *Verbascum*. L'activité anticancéreuse de la quercétine a été largement étudiée. Ce flavonoïde est responsable de l'inhibition de la CDK en introduisant un composé semblable à l'ATP au niveau du site de phosphorylation de cette dernière, bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire en G1 (MEIJER *et al.*, 2001).

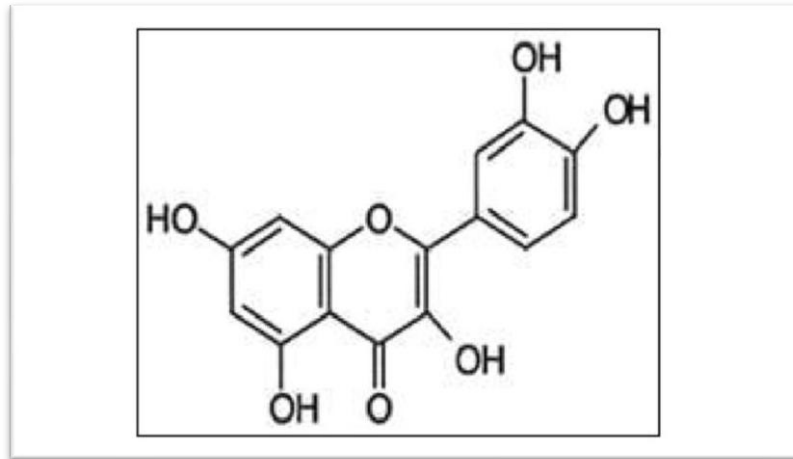


Figure 10 : structure de la quercétine (HEIM *et al.*, 2002).

Autres substances d'origine végétale inhibent l'action du CDK tel que : La roscovitine et le flavopiridol.

1 Matériel et méthodes

Au cours de cette étude nous sommes intéressés à une fraction de métabolites secondaires qui sont les flavonoïdes, nous avons évalué les effets antiprolifératifs de cette fraction sur *Saccharomyces cerevisiae*. Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LBAB) du département Biologique et Agronomique de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Matériel

Matériel Biologique

Le matériel biologique est constitué de :

-Les feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ont été récoltées dans la région d'Adekar El Hammam à Bejaia en Mai 2017. Ces dernières ont été séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité et broyées en fine poudre pour des usages ultérieures.

-levures boulangère *Saccharomyces cerevisiae* commercialisée, qui présente les caractéristiques morphologiques et physiologiques représentées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Saccharomyces cerevisiae* (GUIRAUD et GALZY, 1998).

Caractéristiques	
Température optimale de croissance	28-30°C
pH optimale de croissance	4-4.5
Temps de génération	1-2 heures
Mode respiratoire	Aérobie anaérobie facultatif
Mode de reproduction	Sexué et asexué
Métabolite	Production d'éthanol par voie fermentaire
Forme	Sphérique plus ou moins arrondie

Solvants et réactifs

Les différents solvants et réactifs utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau V : solvants et réactifs utilisés.

Composés	Concentration	Fonction
Méthanol	99.7%	Solvant d'extraction
N-butanol	99.5%	
Acétate d'éthyle	99.5%	
Eau distillée	--	Témoin négatif
Quercétine	1mg/ml	Témoin positif : inhibe la prolifération des cellules et bloque la progression du cycle cellulaire en G1 (agent antiprolifératif)
Bleu de méthylène	0.1%	Colorant bleu à l'état oxydé et incolore à l'état réduit

Matériel de laboratoire

Parmi les appareils utilisés on cite :

Rotavapeur pour éliminer les solvants, centrifugeuse et spectrophotomètre, Bain Marie.

Parmi la verrerie de laboratoire utilisée on peut citer une ampoule à décanter utilisée dans l'extraction des fractions de flavonoïdes.

Méthodes

Extraction des fractions flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée à partir de la poudre de feuilles de *Verbascum sinuatum* L. par la méthode (liquide-liquide) décrite par BEKKARA *et al.*,(1998). Les différentes étapes sont décrites ci-dessous

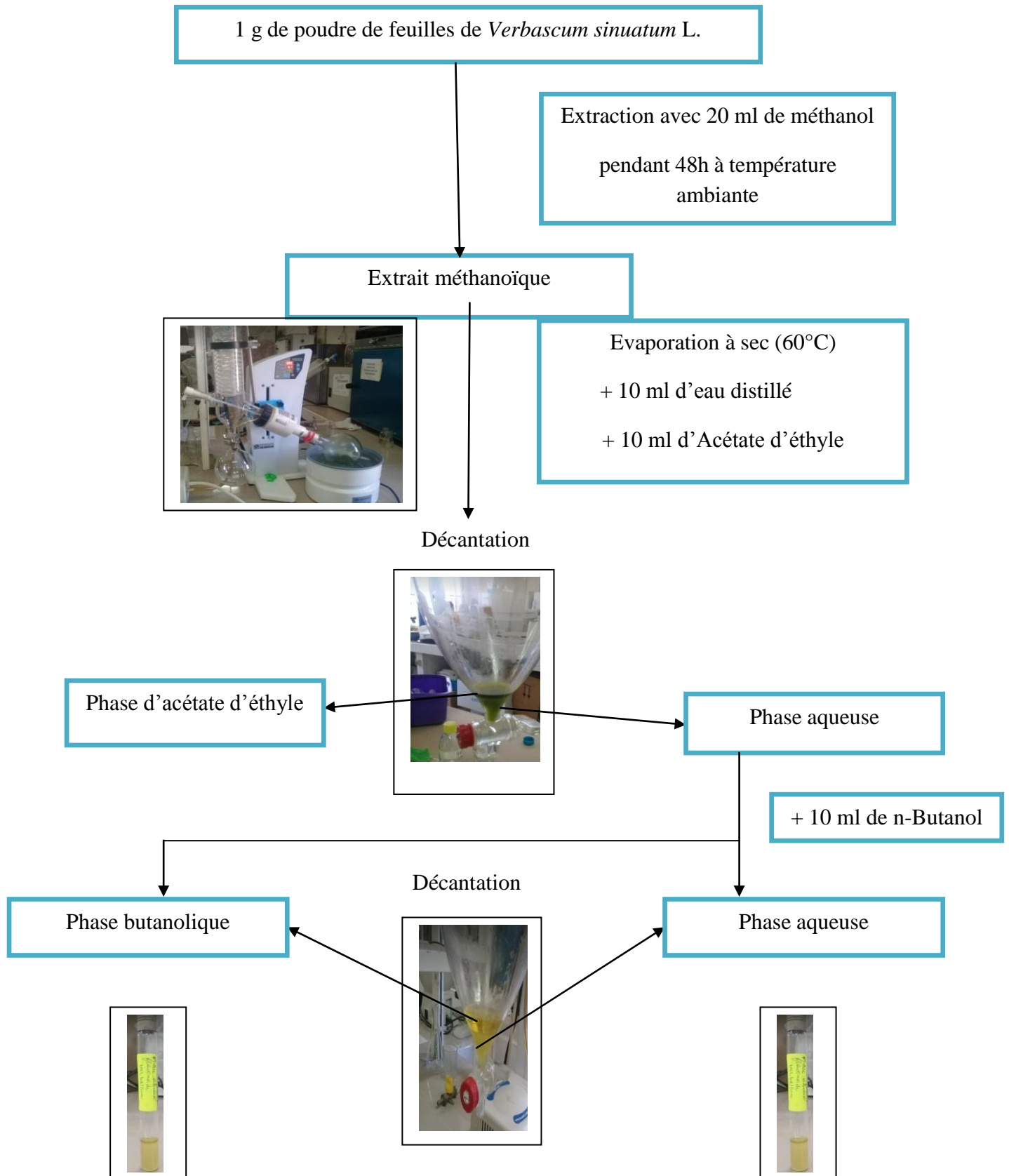


Figure 11 : schéma récapitulatif des étapes de l'extraction des fractions (aqueuse et butanolique)

Préparation du milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae*

Le milieu de culture utilisé pour la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est le milieu PDB (Potato Dextrose Broth), préparé comme suit :

-200 g de pomme de terre épluchés et coupés en petits morceaux sont portés à ébullition dans 200 ml d'eau distillée pendant 30 min, suivie d'une filtration.

-Après filtration, on récupère un filtrat auquel est rajouté 20 g de glucose et on complète à 1000 ml avec l'eau distillée.

Après homogénéisation, le bouillon obtenu a été réparti dans plusieurs flacons, puis autoclavé pendant 20 minutes à 120°C afin d'éliminer tous les germes et spores éventuellement présents.

Evaluation *in vitro* de l'activité antiproliférative

Le test antiprolifératif a été effectué suivant le protocole de SHWETA et *al.* (2012), optimisé par OUZID et *al.* (2019) utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un modèle d'étude possédant de nombreux avantages : croissance rapide, préparation de milieu de culture facile, conservation des caractères biochimiques, pouvoir prolifératif rapide (DJOS, 2014).

Préparation de l'inoculum de *Saccharomyces cerevisiae*

Pour la mise en culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 2 g de cette dernière ont étéensemencé dans 125 ml du milieu PDB stérile, puis incubé à 30°C pendant 24 heures. Ces différentes étapes se sont déroulées dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination pouvant fausser les résultats.

Evaluation de la population cellulaire

La détermination de la population cellulaire dans le milieu de culture a été réalisée par spectrophotométrie (lecture des densités optiques (DO) à 650 nm). Une gamme d'étalonnage est préparée en effectuant des dilutions de demi en demi à partir d'une solution mère de levures d'une DO proche de 1. A partir des résultats obtenus représentés en annexe 1, une courbe d'étalonnage ($DO=f(\text{nombre de cellules/ml})$) a été tracée annexe 5.

Etude de la viabilité cellulaire par la méthode de coloration au bleu de méthylène**✓ Principe**

La méthode de bleu de méthylène est une méthode qui permet de faire une estimation rapide du taux de viabilité et mortalité cellulaires. Les cellules de levures vivantes possèdent une enzyme qui décolore le bleu de méthylène contrairement aux cellules mortes. Lorsque les cellules d'un échantillon de levures sont suspendues dans le colorant, ce dernier pénètre dans toutes les cellules mais n'est réduit que par celles vivantes. Il est par conséquent simple de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes en les observant sous microscope optique : les cellules mortes sont colorées en bleu et les cellules vivantes sont incolores (PAINTING et KIRSOP, 1990).

✓ Mode opératoire

La figure suivante récapitule les différentes étapes suivies lors de la réalisation du test antiprolifératif de la fraction de flavonoïdes (aqueuse et butanolique)

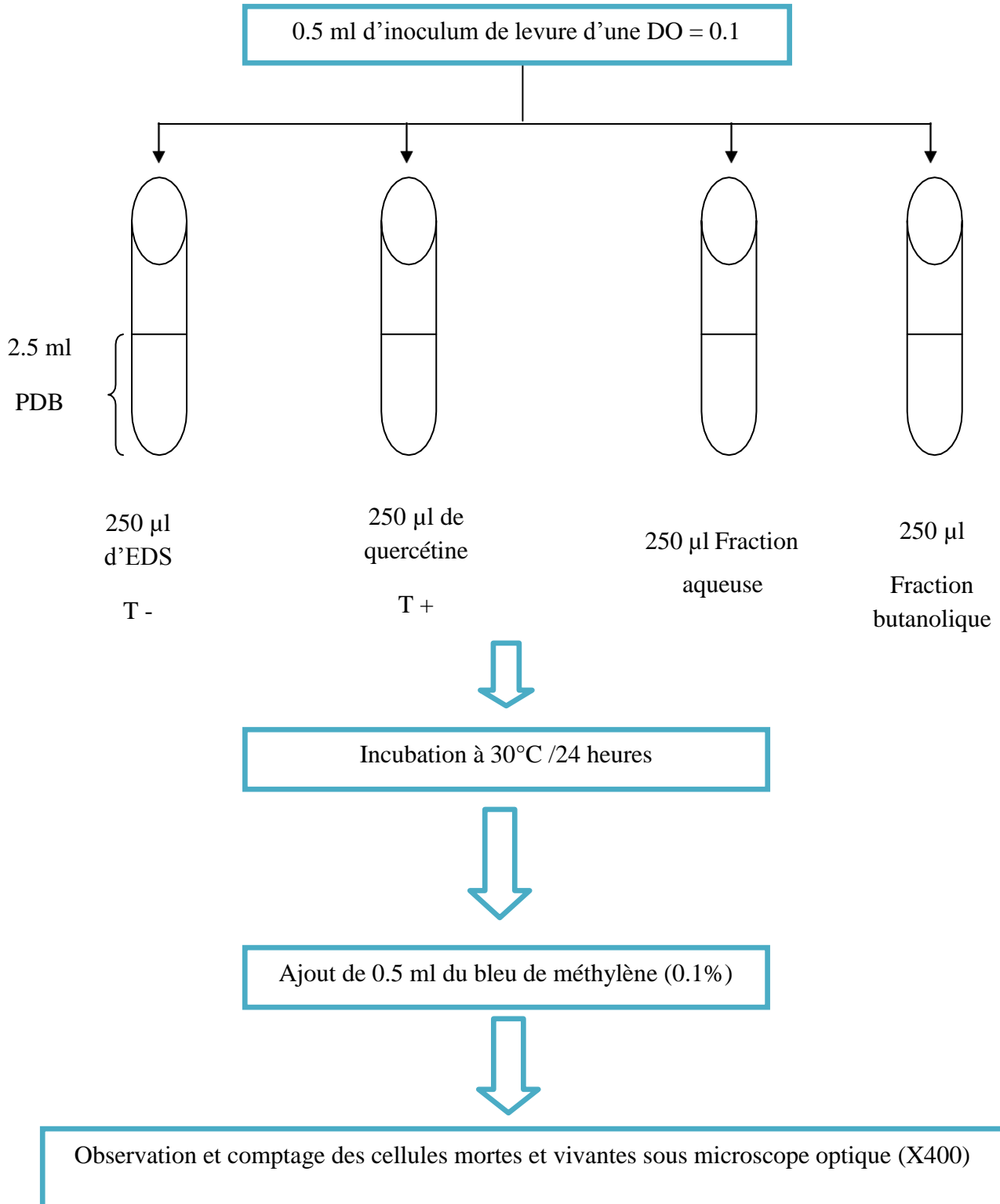


Figure 13 : les différentes étapes du test antiprolifératif.

A l'aide de la cellule de Malassez (annexes 2) un comptage des cellules vivantes et mortes a été effectué dans 16 chambres. Trois observations ont été faites pour chaque tube. Le pourcentage de cytotoxicité est estimé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{\text{nombre de cellules mortes}}{\text{nombre de cellules mortes} + \text{nombre de cellule vivantes}} \times 100$$

Analyse statistique

Pour cette étude des analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test d'analyse de variance (ANOVA) pour mettre en évidence la signification des différences obtenues entre les fractions étudiées, et les standards utilisés. Un test complémentaire de comparaison multiple de moyennes (test de Newman-Keuls) a été réalisé pour classer les différentes associations et les fractions testées en groupes homogènes.

2 Résultats et discussion

Extraction des flavonoïdes

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés bioactifs existants dans le matériel végétal. Ce procédé vise à extraire certains constituants présents dans les plantes. C'est une opération de séparation solide/liquide : un corps solide (le végétal) est mis en contact d'un fluide (le solvant). Les composés d'intérêts biologiques sont alors solubilisés et contenus dans le solvant.

Le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur leur degré de solubilité dans les solvants organiques (BRUNETON, 1999 ; KEBIECHE *et al.*, 2011). Cette extraction se fait avec le méthanol pour solubiliser les flavonoïdes. Un extrait méthanolique (Figure 14) a été récupéré pour subir une évaporation à sec, et laisser à décanter. Après décantation on récupère 2 phases : phase d'acétate d'éthyle, et une phase aqueuse à qui on a ajouté le n-butanol, afin de récupérer deux phases (phase aqueuse et butanolique) (Figure 14).

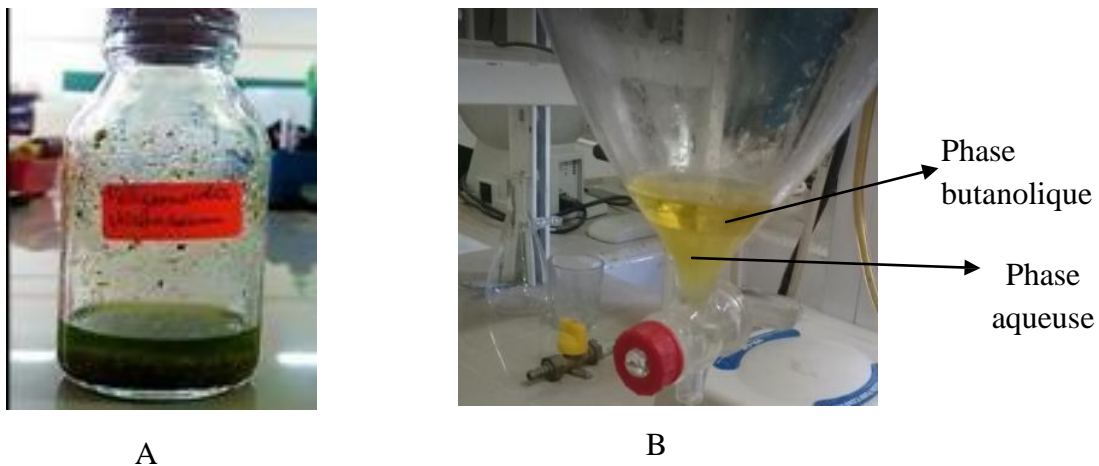


Figure 14 : extrait méthanolique (A), les deux fractions aqueuse et butanolique(B)

La phase d'acétate d'éthyle a été éliminée dans le but de débarrasser les composés non flavonoïdes présentés dans l'extrait méthanolique. A la fin du protocole, nous avons récupéré la phase butanolique et la phase aqueuse. La phase butanolique contient des flavonoïdes di et tri glycosidiques et la phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires (KEBIECHE *et al.*, 2011 ; FEKNOUS *et al.*, 2014 ; ALILOU *et al.*, 2014) et des anthocyanes (ALILOU *et al.*, 2014).

Activité antiproliférative des flavonoïdes de *Verbascum sinuatum* L.

Nos essais antiprolifératifs sur *Saccharomyces cerevisiae* montrent une inhibition de la croissance et une diminution de la viabilité cellulaire pour les échantillons traités par le témoin positif (la quercétine) ainsi que pour ceux traités par la fraction aqueuse flavonoïde et la fraction butanolique flavonoïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. en utilisant le bleu de méthylène pour distinguer les cellules vivantes des cellules mortes en les observant sous microscope optique : les cellules mortes sont colorées en bleu et les cellules vivantes sont incolores (figure 15).

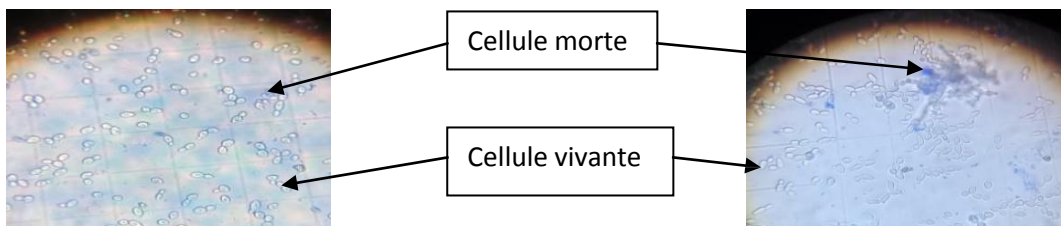


Figure 15 : action des fractions des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. sur *Saccharomyces cerevisiae* sous microscope optique (*400)

A : témoin positif (quercétine) **B** : levure traitée avec la fraction aqueuse.

2.2.1 Action de la quercétine sur la viabilité de *saccharomyces cerevisiae*

La quercétine (témoin positif) est un flavonoïde très commun trouvé dans de nombreuses plantes médicinales, elle possède des effets toxiques et génotoxiques (SILVA *et al.*, 2002 ; SOARES *et al.*, 2006 ; ENGEN *et al.*, 2015). Elle présente une forte affinité de liaison avec l'ADN, ce qui induit des dommages au niveau de l'ADN et des chromosomes dans les cellules cancéreuses (CANTERO *et al.*, 2006). La quercétine est un flavonol faiblement acide et soluble dans les lipides, elle peut diffuser librement à travers la membrane cellulaire et s'accumuler à l'intérieur des cellules tumorales. Ce témoin positif de référence a été mis en contact avec *Saccharomyces cerevisiae*. Les différents pourcentages de mortalité de *Saccharomyces cerevisiae* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VI : pourcentages de cytotoxicité de la quercétine

	% de cytotoxicité	Moyenne \pm ES
Eau distillée	0.000	0.000 \pm 0.000
	0.000	
	0.000	
Quercétine	52.110	47.026 \pm 2.262
	40.000	
	48.970	

ES : erreur standard

La quercétine est une molécule connue pour son activité antiproliférative. D'après nos résultats, la quercétine présente un pourcentage de cytotoxicité de $47.026 \pm 2.262\%$, tandis que l'eau distillée n'a aucun effet cytotoxique sur la prolifération de la levure. Le test type ANOVA réalisé entre le témoin négatif et la quercétine montre une différence hautement significative ($P=0.00$) (annexe 4), cela confirme l'effet antiprolifératif et cytotoxique du témoin positif.

Action de la fraction butanolique des flavonoïdes sur la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*

Les pourcentages de la cytotoxicité de la fraction butanolique sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau VII : les pourcentages de cytotoxicité de la fraction butanolique.

	% de cytotoxicité	Moyenne \pm ES
Eau distillée	0.000	0.000 \pm 0.000
	0.000	
	0.000	
Fraction butanolique flavonoïde	66.666	63.650 \pm 1.607
	64.285	
	60.000	

Ces résultats montrent un pourcentage de cytotoxicité de $63.650 \pm 1.607\%$ pour la fraction butanolique flavonoïde, par contre l'eau distillée n'a aucun effet cytotoxique sur la prolifération de la levure.

Le test type ANOVA réalisé entre la fraction butanolique et la quercétine montre une différence hautement significative ($P=0.003$) (annexe 4), cela confirme l'effet antiprolifératif et cytotoxique de la quercétine et de la fraction butanolique.

2.2.3 Action de la fraction aqueuse flavonoïdes sur la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*

Les pourcentages de cytotoxicité de la fraction aqueuse sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : le pourcentage de cytotoxicité de la fraction aqueuse.

	% de cytotoxicité	Moyenne \pm ES
Eau distillée	0.000	0.000 \pm 0.000
	0.000	
	0.000	
Fraction aqueuse flavonoïde	4.500	7.837 \pm 2.185
	13.131	
	5.882	

Ces résultats montrent un pourcentage de cytotoxicité de 7.837 ± 2.185 pour la fraction aqueuse flavonoïde par contre l'eau distillée n'a aucun effet cytotoxique sur la prolifération de la levure.

Des ANOVA réalisés entre la quercétine et la fraction aqueuse montre une différence significative ($P=0.001$) (annexe 4), cela confirme l'effet antiprolifératif et cytotoxique entre la quercétine et la fraction aqueuse.

La quercétine, prise comme standard avait exercé un effet cytotoxique sur les levures. Son pourcentage de cytotoxicité est estimé à $47.026 \pm 2.262\%$. Ce résultat s'avère être proche de celui rapporté par Madame OUZID *et al* (2019) dans leur test antiprolifératif des extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* L. utilisant la quercétine comme standard. Cette dernière présente un indice de $48.160 \pm 1.800\%$, comme le montre le tableau suivant.

Tableau VIII : résultats du classement des moyennes des pourcentages de cytotoxicité (%) par le test Newman-Keuls.

Fractions testés	M \pm ES
Témoin négatif	0.000 \pm 0.000 A
Témoin positif	47.026 \pm 2.262 B
Fraction aqueuse	7.837 \pm 2.185 A
Fraction butanolique	63.650 \pm 1.607 BC

M : moyenne, ES : erreur standard

En comparant à la quercétine, le pourcentage de cytotoxicité de fraction aqueuse de *Verbascum sinuatum* L. est de $7.837 \pm 2.185\%$ et celui de la fraction butanolique est estimé à $63.650 \pm 1.607\%$. Cela montre que la fraction butanolique des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. possède une cytotoxicité élevée par rapport à la quercétine utilisée comme standard.

Des ANOVA réalisées entre le témoin négatif, le standard et les fractions montrent une différence hautement significative ($p = 0.00$) (annexe 4) ce qui explique une différence de cytotoxicité. Ceci nous amène à réaliser des comparaisons multiples par le test Newman-Keuls. Nous avons obtenu 3 groupes homogènes qui sont représentés dans le tableau VIII. Le groupe A est représenté par le témoin négatif et fraction aqueuse. Le groupe B est représenté par le témoin positif (quercétine). Par ailleurs le groupe BC correspond à la fraction butanolique.

2.3 Synthèse d'étude sur l'effet antiprolifératif et cytotoxique de *Verbascum sinuatum* L.

En comparant nos résultats avec des études courantes réalisées sur l'effet antiprolifératif et cytotoxique de la fraction alcaloïde des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a démontré que nos deux fractions (butanolique et aqueuse) des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. présentent un pourcentage de cytotoxicité moins que celle des alcaloïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ($76.359 \pm 2.056\%$) ce qui nous laisse suggérer que l'effet antiprolifératif des feuilles de *Verbascum sinuatum* L est dû aux alcaloïdes.

L'extraction des alcaloïdes à partir de la poudre de feuilles de *Verbascum sinuatum* L. basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide a travers une acidification (HCL) et en milieu alcalin a travers une basification

Une étude réalisée ultérieurement sur l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. au niveau du LABAB par ATTOUCHE et MAHMOUD (2019) a démontré que l'extrait a présenté un pourcentage de cytotoxicité de ($62.370 \pm 1.090\%$) proche de celle de la fraction butanolique ($63.650 \pm 1.607\%$). Ces résultats montrent que la cytotoxicité réside dans la fraction butanolique.

Au terme du test antiprolifératif des fractions flavonoïque (fraction aqueuse et butanolique) des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. réalisé sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* par la méthode de coloration au bleu de méthylène. La détermination de la cytotoxicité par ce test est une méthode fiable, peu couteuse et rapide qui peut être considéré comme une étape préliminaire dans l'étude de l'effet cytotoxique et antiprolifératif sur des cellules eucaryotes.

Nos résultats ont révélé que nos deux fractions ont un effet sur la prolifération des levures. le pourcentage de cytotoxicité de la fraction butanolique ($63.650 \pm 1.607\%$) est plus important que celui obtenu avec la fraction aqueuse ($7.837\% \pm 2.185\%$) comparativement à la quercétine ($47.026 \pm 2.262\%$) utilisé comme standard, ces résultants révèlent une différence hautement significative ($P=0.00$) (annexe 4).

La recherche actuelle a révélé que les composés flavonoïque sont d'excellents acteurs dans le traitement de la croissance cellulaire. De cet effet et pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- déterminer *in vitro* sur des cultures cellulaires et *in vivo* l'effet antiprolifératif ;
- Extraire d'autres fractions avec d'autres solvants ;
- identifier la nature de ces molécules par des techniques de haute performance comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), la spectroscopie de masse (SM) ;
- purifier les molécules bioactives.

- ALILOU H., BENCHARKI B., HASSANI L.M.I. et BARKA N. (2014).** Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus*. *Afrique Science*, 10 (3), 316-328.
- ALIPIEVA I., ORHAN I., KOSTADINOV P-E. et MILEN I.(2014).** Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnologies of mulleins. *Phytochem review*, (13), 417-444.
- Anonyme. (2007).** La rousse des plantes médicinales identification, préparation soins la rousse P: 15 294 292.
- BADR A., GHAREEB A. et EL-DIN H.M. (1992).** Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells os vicia faba roots. *Egyptian Journal of Applied Siences*, 7, 457-468.
- BAKKALI A. (1997).** Contribution à la synthèse de la myricoidine et de la dihydromyricoidine, alcaloïdes macrocycliques dérivés de la spermidine. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique.
- BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. et TROGOLO C.(1980).** 6-0- β -D-xylopyranosylaucubin from verbascum sinuatum. *Phytochemistry*. 19 (4). 571.573.
- BRAY L. (2011).** In Guide illustré de la flore algérienne.
- BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie-plantes médicinales-3^{ème} Edition Techniques et documentations. Paris. ISBN 2-7430-0315-4.
- CANTERO G., CAMPANELLA C., MATEOS S. et CORTES F. (2006).** Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis*, 21 (5), 321-325.
- CAUDRON F. (2007).** Des microtubules détyrosinés : quelles conséquences pour la cellule. Thèse de doctorats. Université de JOSEPH FOURIER- GRENOBLE 1. France.
- CAU P et SEITE R. (2007).** Cours de biologie cellulaire. Ellipses, éd., Paris.
- CHEVREMENT M. (1980).** Cytologie et histologie. Maloine, éd, Paris. I : 686.

- D'ARCHIVO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGUILO R., GIOVANNI C. et MASELLA R. (2007).** Polyphénols, dietary sources and bioavailability. *Ann- Ist Super Sanita*, 43 (4).348-61.
- DAVID L. (2016).** Etude de nouvelles fonctions de la protéine Checkpoint kinase 1 (Chk1) au cours de la différenciation myéloïde normale et leucémique. Thèse de doctorat : oncologie. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier). Toulouse.
- DIALLO B. et DIOUF A. (2000).** Etude de l'activité analgésique du *pilostigma reticulatum* (Nguiguis). *Odonto-Stomatologie Tropicale*. N°92.
- DJOS C. (2014).** Caractérisation des propriétés antiprolifératives d'une substance naturelle et rôle de la signalisation calcique dans la différenciation des photorécepteurs. Thèse de Doctorat. Université de Poitiers, France, 204p.
- ENGEN A., MAEDA J., WOZNAK D., BRENTS C. A., BELL J.J., UESAKA M., AIZAWA Y., et KATO T.A. (2015).** Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 785, 15-22.
- Erlind I (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology, *Nutrition Reviews* 24:851-74.
- ESPINOSA E., ZAMORA P., FELIU J. et BARON M.G. (2003).** Classification of anticancer drugs, a new system based on therapeutic targets. *Cancer treatment Reviews*, 29 (6), 515-523.
- FAVRO C. et NICOLLE F. (2011).** Biologie cellulaire. Hachette Education, Paris.
- FEKNOUS S., SAIDI F. et MOHAMED SAID R. (2014).** Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature et Technologie*, 11, 7-13.
- FIELD J., DIAZ J.F. et MILLER J.H. (2013).** The binding sites of microtubule-stabilizing agent. *Chemistry and biology*, 20(3), 301-315.
- FOLLEZOU J.Y. et POUILLART P., 1980.** Précis de chimiothérapie anticancéreuse. Doin éd., Paris, p.44683.
- GARRETT R.H et GRISHAM C.M. (2000).** Biochimie. 2ème Edition, De Boeck, USA.

ISBN 2744500208.

GOLDWASSER F. (2007). Les poisons des topo-isomérases I. oncologie, 9(11), 758-765.

GHRAM M.(2018). Staufen 1 est un régulateur post-transcriptionnel du cycle cellulaire. Thèse de doctorat : médecine. Université de Montréal. Montréal.

HEIM K E., TAGLIA FERRO A R. et BOBILYA DJ.(2002). Flavonoid antioxydants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.J. nutr. Biochem. 13,572-584.

KEBIECHE M., LAKROUN Z., MARAIHI Z. et SOULIMANI R. (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, 9(5), 1-9.

KOTSAKIS A., MATIKAS A., KOINIS F., KENTEPOZIDIS N., VARTHALITIS I. I., KARAVASSILIS V., SAMANTAS E., KATSAOUNIS P., DERMITZAKI E. K., HATZIDAKI D., MAVROUDIS D. et GEORGOULIAS V. (2016). A multicenter phase II trial of cabazitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer progressing after docetaxel-based chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 115 (7), 784-788.

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

LEE et XIAO., 2005. Podophyllotoxins and analogs. In Cragg G.M., Kingston D.G.I., Newman D.J., 2005.

MAILLET M. (2002). Biologie cellulaire. Masson, éd., paris. P. 257-274.

MARTINO E., CASAMASSIMA G., CASTIGLIONE S., CELLUPICA E., PANTALONE S., PAPAGNI F., RUI M., SICILIANO A.M.et COLLINA S. (2018). Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28 (17), 2816-2826.

MAUSSANGG. (2005). Rapport ENS. <http://www.eleves.ens.fr/home/maussang/index.html>.

MEIJER L., KNOCKAERT M.et DAMIENS E. (2001). Prévention par un inhibiteur de kinases cyclines-dépendantes, de l'alopécie induite par la chimiothérapie. *Bulletin du cancer*, 88(4), 347-350.

- MOHAMMEDI Z. (2013).** Etude phytochimique et activités biologique de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat : biologie. Université Aboubakr Belkaid. Tlemcen.
- MOSSERAY R. (1935).** Matériaux pour une flore de Belgique : IV-le genre *Verbascum*. *Royal Botanical Society of Belgium*, (68), 88-103.
- NORBURY C. et NURSE P. (1992).** Animal cell cycles and their control. *Annual review of biochemistry*, 61, 441-470.
- OUZID Y., SMAÏL SAADOUN N. et HAOUALI K. (2019).** Aantimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of *Peganum Harmala* L. from dayate aiat (laghouat, Algeria). *Journal of Fundamental and applied Sciences*, 11 (2), 587- 604.
- PAINTING K. et KIRSOP B. (1990).** A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6 (3), 346-347.
- POMMIER Y et KOHN KW. (2003).** Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine sciences*, 19 :173-186.
- QUEZL P. SANTA S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. TH. CNRS : Paris.
- RAVELLI R.B.G.,GIGANT B., CURMI P.A., JOURDAIN I., LACHKAR S. et SOBEL A. (2004).** Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*.428 (6979), 198-202.
- ROBERT J. (2007).** Les poisons du fuseau. *Oncologie*, 9(11), 766-772.
- Roux D. et Catier O.(2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie.3^{ème} édition. Ed. Wolters Kluwer, Dalian China.141p.
- SCALBERT A. et WILLIAMSON G., (2000).**Dietary intake and bioavailability of polyphénols. *Journal of Nutrition*. Volume 130: 2073 – 2085.

- SCHAUENBERG P., et PARIS F. (2005).** Guide des plantes médicinales .Analyse, description et utilisation de 400 plantes. 2^{ème} édition. Ed. Delachaux et Nestlé, Neuchâtel. Suisse.396p.
- SENATORE F. , RIGAND D. , FORMISANO C., GRASSIA A., BASIL F, A. et SORDO S. (2007).**Phytogroth- inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*, *Fit.78: (3) : 244-247.*
- SENER A et DULGER B: 2009.**Antimicrobial activity of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. on microorganisms isolated from urinary tract infection. *African Journal of Microbiology Research* 3(11):778-781.
- SHWETA S, KHADABADI S. et TAPADIYA GANESH G.(2012).** *In vitro* evaluation of antimitoyic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extracts of *Revia hypocrateriforis*. *Asian Pacific Journal if Tropical Disease*, 2 (1), S503-S508.
- SILVA J.D., HERRMANN S.M., HEUSER V., PERES W., MARRONI N.P.,GONZALEZ-GALLEGO J. et ERDTMANN B. (2002).** Effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (7), 941-947.
- SOARES E.A., VARANDA B., et RADDI B. (2006).** Basal cytotoxicity and metabolic mediation of flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 835-838.
- SOOTODEH A., (2015).** Histoire biogéographique et évolutive des genres *Verbascum* et *Artemesia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire. Thèse de Doctorat. Disciplines Ecologie fonctionnelle. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.
- TATLI I ET AKDERMIR Z.(2004).** Chemical constituents of *Verbascum* L. spieces. *FABAD J Pharm Sciees* 29:93-107.
- TATLI I.I. et AKDEMIR Z.S. (2006).** Traditional uses and biological activities of *Verbascum species*. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(2), 85-96.
- TISON et FOUAULT B. (2014).** Flora gallica.flore de France. Société botanique de France biotope édition.paris.

VALLOT A. (2017). Quels sont les signaux détectés par le point de contrôle du fuseau lors de la méiose dans l'ovocyte de souris ?. Thèse de doctorat : Biologie. Université Pierre et Marie Curie. Paris.

WOLLENWERER. et GURBUZ I. (1980). Biochem. Syst. Et Ecol.8, 21.

ZIEGLER J. et FACCHINI, P.J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. Annu Rev Biol .Vol(59) :735-769.

ZHANG Y.et WANG Z.Z. (2008). Comparative analysis of essential oil components of three phlomis species in qinling mountains of china. Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis, 47 (1),213-217.

<http://www.who.int/médiacentre/factsheets/fs29/fr/print.html>.

Annexe 1

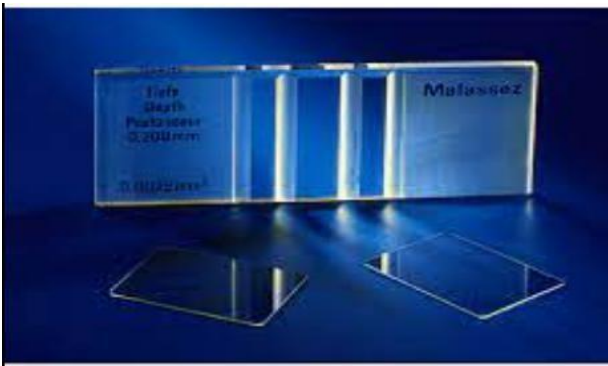
Tableau de la gamme d'étalonnage

Dilution	/	1/2048	1/512	1/128	1/32	1/8
DO	0	0.034	0.048	0.105	0.486	1.073
Nombre de cellules/ml	0	560000	860000	3480000	18240000	65920000

Annexe 2

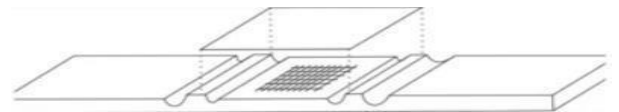
Description de la cellule Malassez

La cellule Malassez est un hématimètre. Est une lame de verre spécifique permettant le comptage cellulaire au microscope.

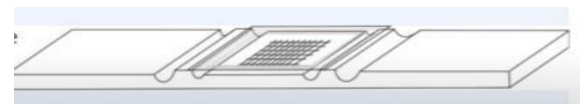


Le principe

-Poser la cellule sur une surface bien horizontale, puis placer une lame sur la cellule.



-Coller la lame sur la cellule, et vitrifier la bonne adhésion cellule-lamelle.



-Entre la cellule et la lamelle laisser rentrer, par capillarité une goutte d'échantillon à énumérer grâce à une pipette.



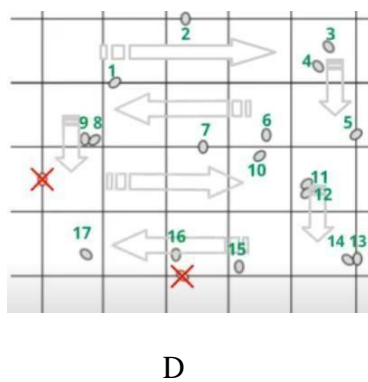
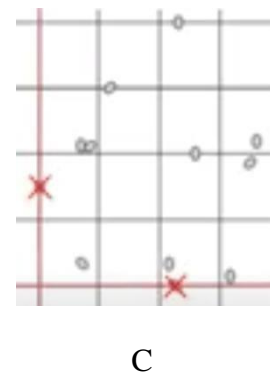
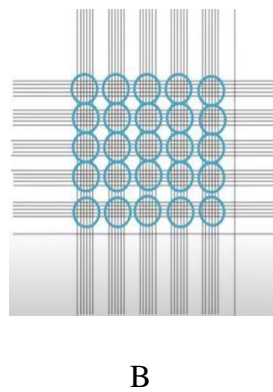
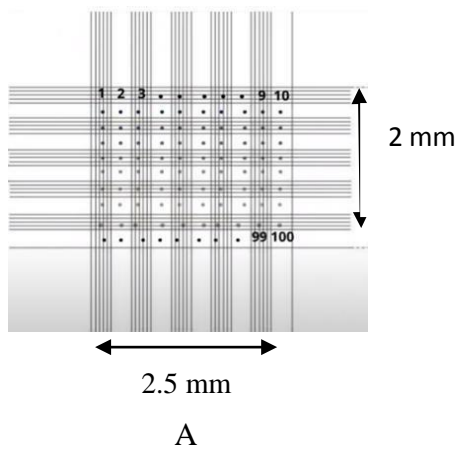
Le calcul

A : les bandes verticales et horizontales se chevauchent pour délimiter 100 rectangles

B : la lecture se fait uniquement sur les rectangles chevauchés (25 rectangles)

C : ne comptez aucun élément qui chevauche les lignes à gauche et en bas

D : lecture en créneau de la lame



Annexe 3

Tableau des pourcentages de cytotoxicité (%) obtenus pour les trois observations

Extrait testé	Pourcentages de cytotoxicité (%)		
	Témoin négatif (eau distillé)	0.00	0.00
Témoin positif (quercétine)	52.11	40	48.97
Fraction aqueuse	4.5	13.131	5.882
Fraction butanolique	66.666	64.285	60

Annexe 4

Résultats obtenus de l'analyse des pourcentages de cytotoxicité (%) par le test ANOVA à un facteur

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Fraction	5,00	14412,21	2882,44	75,21	0,00
Var.résiduelle	12,00	459,89	38,32		
Total	17,00	14872,10			

(A) : tableau d'analyse de variance avec P value = **0.00**

<i>Comparaison multiple</i>		
Variance moyenne utilisée: 25,55		
Valeur seuil: 18,45		
	Groupe	Moyenne
Niveau Eau	A	0,00
Niveau FAqV	A	7,84
Niveau Quer.	B	48,03
Niveau Col.	B	55,70
Niveau FBV	BC	63,65
Niveau FA1V	C	76,36

(B) : résultats obtenus du test Newman-Keuls (classement en groupes homogènes)

Eau et Q Effect	Univariate Tests of Significance for activité (Spreadsheet34) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	P
Intercept	3459,841	1	3459,841	119,8308	0,000396
fraction	3459,841	1	3459,841	119,8308	0,000396
Error	115,491	4	28,873		

(C) : comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre témoin négatif (eau) et la quercétine

Q et FAqV	Univariate Tests of Significance for activité (Spreadsheet34) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	P
Intercept	4681,068	1	4681,068	118,1550	0,000407
fraction	2422,854	1	2422,854	61,1553	0,001443
Error	158,472	4	39,618		

(D) : comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre le témoin positif (quercétine) et la fraction aqueuse *Verbascum sinuatum* L.

Q et FBV	Univariate Tests of Significance for activité (Spreadsheet34) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	P
Intercept	18706,40	1	18706,40	541,1544	0,000020
fraction	365,98	1	365,98	10,5873	0,031263
Error	138,27	4	34,57		

(E) : comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre le témoin positif (quercétine) et la fraction butanolique *Verbascum sinuatum* L.

Annexe 5

