

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD 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 Appliquée

Thème

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

Rédigé par :

ATTOUCHE Ania

MAHMOUD Thanina

Soutenu le 25/10/2020 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 BARIZ K.	Maître de conférences B	UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur HOUALI K., professeur à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) et pour avoir accepté de présider le jury.

Nous tenons à remercier Madame AICHE-IRATNI G., maître de conférences classe B à l'UMMTO pour nous avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent aussi à Madame OUZID Y., maître de conférences classe B à l'UMBB pour nous avoir guidées et encouragées pendant toute la durée de notre travail.

Nous tenons à remercier également Monsieur BARIZ K., maître de conférences classe B pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Ça a été un honneur pour nous de travailler avec vous. Ça n'a pas duré longtemps malheureusement, mais c'était suffisant pour que nous puissions découvrir votre modestie et gentillesse et surtout apprendre l'importance du travail d'équipe.

Enfin, toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À ma très chère maman, pour son dévouement, ses sacrifices et ses encouragements incessants.

À ma très chère grand-mère « Ayou », qui m'accompagne avec ses prières, son amour et tendresse. Que dieu nous la garde encore plus longtemps.

À tous ceux qui m'aiment.

Thanina

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents, pour leurs sacrifices, leur amour et soutien inconditionnel.

À ma chère sœur et mes chers frères.

À ma chère cousine Hanane pour son aide et son soutien moral.

À tous mes amis pour lesquels j'exprime ma sympathie.

Ania

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

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

Partie bibliographique

I. Données bibliographiques sur <i>Verbascum sinuatum</i> L.	2
1.1 Présentation du genre <i>Verbascum</i>	2
1.2 Espèce <i>Verbascum sinuatum</i> L.....	2
1.2.1 Noms vernaculaires et classification systématique	2
1.2.2 Description et répartition botanique	3
1.2.3 Utilisation traditionnelle	4
1.2.4 Etude phytochimique	4
1.2.5 Activités biologiques reconnues	7
II. Cycle cellulaire et anticancéreux.....	9
2.1 Description du cycle cellulaire	9
2.1.1 Interphase.....	9
2.1.2 Mitose	10
2.2 Anticancéreux et mode d'action	11
2.2.1 Anticancéreux d'origine végétale	13
2.2.2 Composés antioxydants et cancers	16

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes	18
1.1 Matériel.....	18
1.1.1 Matériel biologique.....	18
1.1.2 Matériel de laboratoire.....	18
1.1.3 Solvants et réactifs.....	19
1.1.4 Milieu de culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.2 Méthodes	20
1.2.1 Extraction aqueuse.....	20
1.2.2 Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antiproliférative	22
1.2.2.1 Préparation de l'inoculum de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.2.2.2 Evaluation de la population cellulaire	22

1.2.2.3 Etude de la viabilité cellulaire par la méthode de coloration au bleu de méthylène	23
1.2.3 Analyse statistique	25
II. Résultats et discussion.....	25
Conclusion	29
Références bibliographiques	30
Annexes	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CA-4 : Combrétastatine A4

CA-4P : Combrétastatine A4 phosphate

CDK : Kinases dépendantes des cyclines

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FDA : Food and Drug Administration

G : Gap

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

PDB : Potato Dextrose Broth

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

Liste des figures

Figure 1 : Vue d'ensemble de la plante <i>V. sinuatum</i>	3
Figure 2 : Feuilles basales de <i>V. sinuatum</i>	3
Figure 3 : Fleurs de <i>V. sinuatum</i>	3
Figure 4 : Structure chimique de quelques composés phénoliques isolés des parties aériennes de <i>V. sinuatum</i>	5
Figure 5 : Structure chimique de quelques glucosides d'iridoïdes isolés des parties aériennes de <i>V. sinuatum</i>	5
Figure 6 : Les différentes phases du cycle cellulaire.	9
Figure 7 : Les différentes phases de la mitose.	11
Figure 8 : Les sites d'action des agents anticancéreux au niveau du cycle cellulaire.	11
Figure 9 : Structure chimique de quelques molécules anticancéreuses isolées des végétaux	13
Figure 10 : Structure chimique de l'homoharringtonine.	15
Figure 11 : Structure chimique de la combrétastatine A4 et la combrétastatine A-4P.	15
Figure 12 : Structure chimique de la curcumine.	17
Figure 13 : Cellule de Malassez.	19
Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction aqueuse.	21
Figure 15 : Courbe d'étalonnage.	22
Figure 16 : Les différentes étapes du test antiprolifératif.	24
Figure 17 : Action de l'extrait aqueux des feuilles de <i>V.sinuatum</i> sur <i>Saccharomyces cerivisiae</i> sous microscope optique (X 400).	28
Figure 18 : Cellule de Malassez sous microscope optique (X400).	38

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents métabolites secondaires isolés de <i>Verbascum sinuatum</i> L.....	6
Tableau II : Les métabolites secondaires de <i>Verbascum sinuatum</i> L. et leurs activités biologiques.	8
Tableau III : Les types d'anticancéreux cytotoxiques et leurs modes d'action.....	12
Tableau IV : Les molécules anticancéreuses d'origine végétale utilisées en thérapeutique et leurs mécanismes d'action.	14
Tableau V : Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Tableau VI : Solvants et réactifs utilisés.	19
Tableau VII : Moyennes des pourcentages de cytotoxicité (%) des différents extraits testés.	25
Tableau VIII : Résultats du classement des moyennes des pourcentages de cytotoxicité (%) par le test de Newman-Keuls.	27

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes médicinales constituent une source importante d'isolement de médicaments pour traiter de nombreuses maladies humaines (KUMAR *et al.*, 2015). Les propriétés thérapeutiques de ces plantes sont dues à de molécules synthétisées par celles-ci, connues sous le nom de métabolites secondaires qui sont dotées de plusieurs activités biologiques (activité antioxydante, antiinflammatoire, antitumorale...) (BOURGAUD *et al.*, 2001).

Le cancer figure parmi les principales causes de mortalité dans le monde. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales. Le traitement chimiothérapeutique du cancer repose majoritairement sur l'utilisation de molécules qui agissent en inhibant la division cellulaire (antimitotiques) et en ciblant les cellules à division rapide (antiprolifératifs) tel est le cas des cellules tumorales (RAHHEL *et al.*, 2017). Cependant, la toxicité de ces molécules envers les cellules normales à renouvellement rapide, comme les cellules de la moelle osseuse et le manque de spécificité provoquent un grand nombre d'effets indésirables (FAURE, 2010).

Près de 75 % des médicaments chimiothérapeutiques dérivent de plantes médicinales (KUMAR *et al.*, 2017). Un nombre de composés d'origine végétale tels que la combrétastatine, le paclitaxel, la vincristine sont d'importants agents antimitotiques utilisés en chimiothérapie. Par ailleurs, la prévention joue un rôle important dans la lutte contre le cancer. De nombreuses molécules isolées de plantes ont été utilisées pour traiter et/ou prévenir cette maladie. La plupart sont des composés phénoliques et des flavonoïdes qui grâce à leur action antioxydante diminuent les effets toxiques des espèces réactives de l'oxygène qui est l'une des principales cause des cancers (RAHHEL *et al.*, 2017). Il y a donc toute une richesse à exploiter d'autant plus que la plupart des plantes sont peu ou pas étudiées de point de vue chimique et biologique (BENTABET *et al.*, 2014). Ainsi, les chercheurs ne cessent d'exploiter le monde végétal en quête de nouveaux anticancéreux plus spécifiques et moins toxiques.

Verbascum sinuatum L. communément appelée molène sinuée est parmi les plantes médicinales qui couvrent le territoire Algérien. A notre connaissance, les propriétés antiprolifératives de cette plante ont été peu étudiées si bien que nous nous intéressons dans la présente étude à l'évaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* sur *Saccharomyces cerevisiae*. Nous nous sommes également chargées de combiner cet extrait à des molécules bioactives : la colchicine et la quercétine, puis d'estimer le potentiel antiprolifératif de ces combinaisons.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Partie bibliographique

I. Données bibliographiques sur *Verbascum sinuatum* L.

1.1 Présentation du genre *Verbascum*

Verbascum L. est le deuxième genre de la famille des Scrophulariaceae le plus riche en espèces (REMAL, 2014). Il comprend environ 360 espèces distribuées dans tous les pays autour de la mer méditerranéenne, en Asie et en Afrique, avec pour centre de diversité la Turquie où l'on compte 232 espèces dont 84 % sont endémiques (HUBER-MORATH, 1978).

Les plantes de ce genre sont reconnaissables à leurs fleurs jaunes et aux dimensions de leur tige florale qui peut atteindre, voire dépasser le mètre. Quelques-unes ont des feuilles très velues, d'autres presque glabres (ARRIF, 2004). Elles fleurissent généralement à partir du mois de juin. Ces plantes dicotylédones pour la plupart bisannuelles et par ailleurs facilement hybridables (POLETTI, 1988), sont communément appelées molènes.

1.2 Espèce *Verbascum sinuatum* L.

1.2.1 Noms vernaculaires et classification systématique

Verbascum sinuatum L. est mieux connue sous les noms de « Molène sinuée » en français, « Wavy leaf mullein » en anglais, « Bou çira, Mouçaleh el andar » en arabe et « Thisraou, Thisisra » en kabyle (MEDDOUR *et al.*, 2009 ; DAOUDI *et al.*, 2019). Selon SOTOODEH (2015), la classification botanique de cette espèce est la suivante :

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

1.2.2 Description et répartition botanique

Verbascum sinuatum L. est une plante méditerranéenne très 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 (SOTOODEH, 2015).

Le terme «*Verbascum*» vient de *Barbascum* qui signifie barbu en référence au fait que la plante est couverte d'un duvet cotonneux et que les étamines sont barbues (ALPIEVA *et al.*, 2014), «*sinuatum*» décrit les feuilles en rosette qui sont dentées et ondulées (JARDAT *et al.*, 2015). C'est une plante herbacée bisannuelle de 50 cm à 1m de haut, à tige ramifiée dès le bas (Figure 1). Les feuilles basales disposées autour de la tige sont plates et ondulées (Figure 2), les feuilles supérieures alternes et sans pétiole (DANE et YILMAZ, 2009). Les fleurs, d'un jaune doré, sont rassemblées en groupes de deux à cinq. Les filets des étamines portent des poils violacés (Figure 3). Le fruit est une capsule contenant plusieurs graines (JARDAT *et al.*, 2015).



Figure 1: Vue d'ensemble de la plante *V. sinuatum* (SERVAIS et SEBA, 2017).



Figure 2 : Feuilles basales de *V. sinuatum* (JARADAT *et al.*, 2015).



Figure 3 : Fleurs de *V. sinuatum* (SERVAIS et SEBA, 2017).

1.2.3 Utilisation traditionnelle

Verbascum sinuatum L. est utilisée pour ses vertus thérapeutiques. Les feuilles, les racines et les fleurs sont les organes les plus exploités et la décoction est le mode de préparation le plus courant. Une pincée pendant une semaine est la posologie la plus recommandée pour éviter d'éventuelles intoxications (DAOUDI *et al.*, 2015). Cette plante est utilisée pour traiter des affections oculaires, rhumatismales et dermatologiques (DAOUDI *et al.*, 2019).

Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau qui se manifeste par l'apparition d'épaisses plaques de peau qui desquament. L'utilisation de *Verbascum sinuatum* L. en médecine traditionnelle dans le traitement de cette maladie a été signalée. Les parties aériennes de la plante sont récoltées au printemps puis une décoction est préparée dans de l'alcool à 10 %. Une amélioration importante de la pathologie peut être notée et dans certains cas une récupération complète est observée (AMENTA *et al.*, 2000).

Les fleurs de *Verbascum sinuatum* L. sont indiquées dans le traitement des maladies oculaires. La fleur cueillie le matin avant le lever du soleil ou le soir quand elle est épanouie est triturée à travers une gaze propre, puis le jus obtenu est mis à décanter pendant trois jours et le surnageant est employé en instillation dans les yeux (BOUKEF, 1986).

Les racines peuvent être utilisées en cas de fièvre typhoïde en les macérant avec des graines de pois-chiche (BENKHNIGUE *et al.*, 2010).

Une étude ethnobotanique réalisée au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou a rapporté que les feuilles basales de *Verbascum sinuatum* L. sont utilisées en usage externe pour soulager les douleurs rhumatismales et sciatiques (MEDDOUR *et al.*, 2009).

1.2.4 Etude phytochimique

Les métabolites secondaires regroupent tous les composés produits par les plantes et qui n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de celles-ci, comme la croissance ou la reproduction (CROTEAU *et al.*, 2000). Ce sont des molécules de faible poids moléculaire qui peuvent être hydrophiles ou lipophiles. Elles se caractérisent par une très grande diversité structurale et sont classées en trois grandes classes chimiques : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes (WILLIAMS *et al.*, 1989 ; BORGAUD *et al.*, 2001).

Un grand nombre d'espèces de *Verbascum* ont fait à ce jour l'objet d'études chimiques. Les composés isolés de ce genre ont été classés en huit principaux groupes : les iridoïdes, les saponines, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les stéroïdes, les acides phénoliques, les glycosides monoterpènes et les phénylétanoïdes. La plupart de ces composés ont été isolés des parties aériennes de ces plantes (TATLI et AKDEMIR, 2004 ; ALIPIEVA *et al.*, 2014).

Partie bibliographique

Les études réalisées sur l'espèce *Verbascum sinuatum* L. ont montré la présence de différents composés phytochimiques. Il s'agit notamment de terpénoïdes et de composés phénoliques.

En effet, les parties aériennes de cette plante semblent être une source riche en divers polyphénols : des flavonoïdes glycosylés tel que luteolin 7-O-β-D-glucoside, des phénylétanoïdes tels que verbascoside et poliumoside (Figure 4), des acides phénoliques et des coumarines (SALABIYAH SHAHHAT, 2010). La fraction glucoside d'iridoïde de ces mêmes parties de la plante comprend une grande variété de composés. Il s'agit de molécules monoterpéniques glycosylées tels que l'aucubine qui représente le majeur composé, sinuatol et harpagide (figure 5) (BIANCO *et al.*, 1980). D'autres métabolites secondaires sont également isolés de cette espèce et sont représentés dans le tableau I.

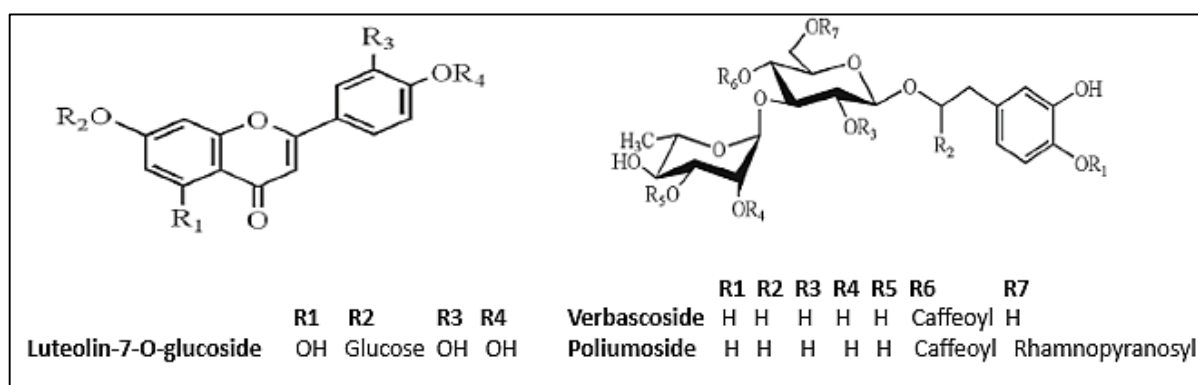


Figure 4 : Structure chimique de quelques composés phénoliques isolés des parties aériennes de *V. sinuatum* (ALIPIEVA *et al.*, 2014).

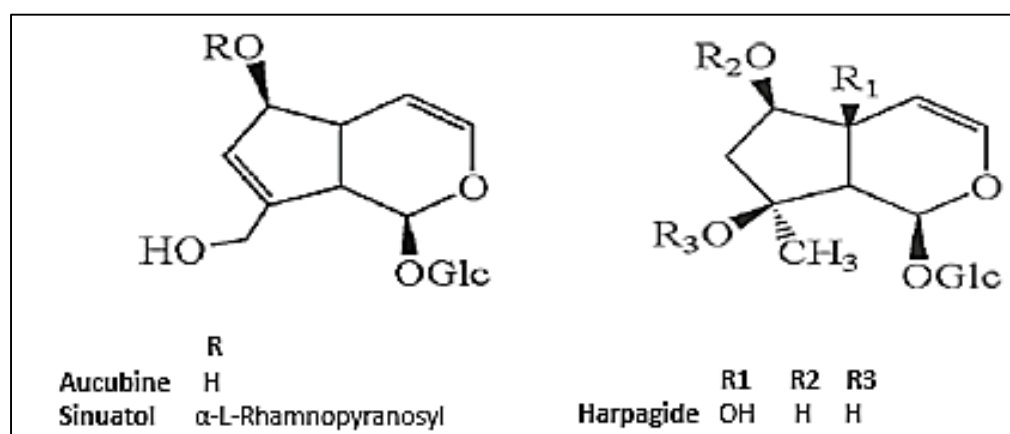
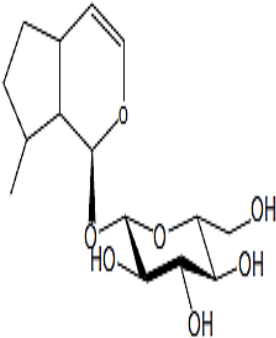
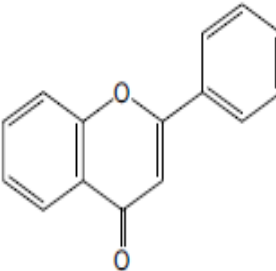
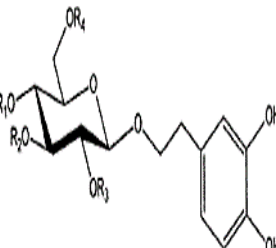
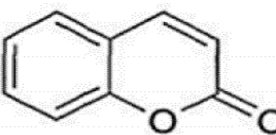
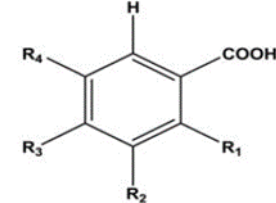


Figure 5 : Structure chimique de quelques glucosides d'iridoïdes isolés des parties aériennes de *V. sinuatum* (ALIPIEVA *et al.*, 2014).

Partie bibliographique

Tableau I : Les différents métabolites secondaires isolés de *Verbascum sinuatum* L.

Classe chimique	Structure chimique de base	Composés isolés	Références
Terpénoïdes : Glucosides d'iridoïdes		- Aucubine - Aucuboside - Sinuatol - Sinuatoside - Catalpol - Harpagoside - Harpagide - Ajugol - 6-O-β-D-glucopyranosyl aucubin - 6-O-β-D-xylopyranosyl aucubin - 6-O-α-L-sinuatosyl aucubin Pulverulentoside I - 6-O-(3''-O-p-coumaroyl)-α-L-rhamnopyranosylcatalpol	(BIANCO <i>et al.</i> , 1980 ; BIANCO <i>et al.</i> , 1981 ; TATLI et AKDEMIR, 2004 ; SENATORE <i>et al.</i> , 2006 ; ALIPIEVA <i>et al.</i> , 2014)
Composés phénoliques : Flavonoïdes		- Luteolin 7-O-β-D-glucoside - Luteolin 7,4'-diglucoside - Apigenin-7-O neohesperidoside - Patuletin-3,7-dirhamnoside - Patuletin-3-neohesperidoside - 5,7-Dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone	SENATORE <i>et al.</i> , 2006 ; SALABIYAH SHAHHAT, 2010)
Glucosides de phényléthanoïdes		- Verbascoside - Poliumoside	(TATLI et AKDEMIR, 2004)
Coumarines		- Asculetin - Scopoletin-7-glucoside	(SALABIYAH SHAHHAT, 2010)
Acides phénoliques	 Acides hydroxybenzoïques	- Gallate de méthyle - Acide 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque - Acide chlorogénique	(SALABIYAH SHAHHAT, 2010)

1.2.5 Activités biologiques reconnues

Les espèces du genre *Verbascum* ont fait l'objet de nombreuses études expérimentales. Diverses activités biologiques sont ainsi révélées, à savoir l'activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, antinociceptive, antitumorale, antispasmodique et cytotoxique. Ces dernières sont dues aux différentes molécules bioactives que contiennent ces plantes (TATLI et AKDEMIR, 2006 ; KÜÇÜK *et al.*, 2016). Le tableau II résume les métabolites secondaires du genre *Verbascum* et leurs activités biologiques.

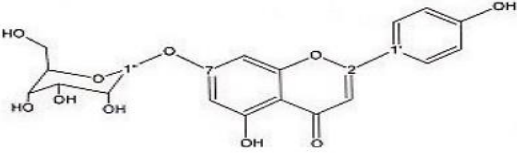
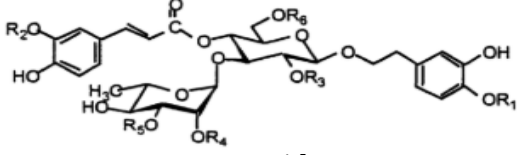
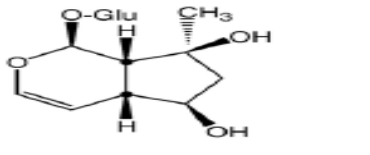
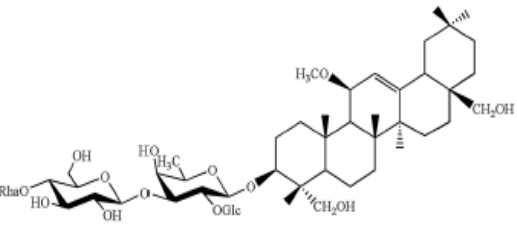
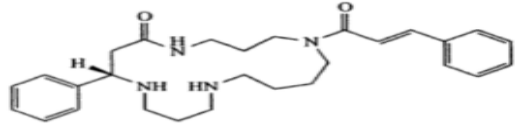
Certaines activités ont été attribuées à l'espèce *Verbascum sinuatum*. En effet, la richesse de cette plante en composés phénoliques lui confère une capacité de chélation des radicaux libres élevée, par conséquent une activité antioxydante importante (MOEIN *et al.*, 2012 ; KARAMIAN et GHASEMLOU, 2013).

En 2006, SENATORE *et al.* ont démontré que l'extrait méthanolique des parties aériennes de cette plante possède un effet inhibiteur vis-à-vis d'un certain nombre de bactéries à gram positif et à gram négatif et que ceci est dû à la présence des composés bioactifs : verbascoside, sinuatol, aucubine et ajugol. L'extrait éthanolique quant à lui a présenté dans une autre étude une activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Candida albicans* (SENER et DULGER, 2009).

D'après KHALEELIAH (2001), l'extrait éthanolique des différentes parties (fleurs, feuilles, racines et jeunes branches) de *Verbascum sinuatum* L. a été testé *in vitro* sur des lignées cellulaires du cancer du sein et de la prostate. Les résultats obtenus ont montré une toxicité élevée sur les cellules ce qui suggère un effet anticancéreux.

Partie bibliographique

Tableau II : Les métabolites secondaires du genre *Verbascum* et leurs activités biologiques.

Métabolites secondaires	Exemples de composés	Structure chimique	Activités biologiques	Références
Polyphénols : Flavonoïdes glycosylés Glucosides de phénylétanoïdes	- Luteolin 7-O-β-D-glucoside -Luteolin 3'-O- β-D-glucoside -Apigenin 7-O- β-D-glucoside	 Apigenin 7-O- β-D-glucoside	Antioxydante, antitumorale, antiinflammatoire et antinociceptive.	(KAHRAMAN <i>et al.</i> , 2012 ; MOUSAVI <i>et al.</i> , 2015 ; JAMSHIDI-KIA <i>et al.</i> , 2018)
	-Verbascoside -Martynoside	 Martynoside	Antioxydante, antiinflammatoire, antinociceptive, cicatrisante antimicrobienne, cytotoxique, neuroprotectrice.	(ÇALIS <i>et al.</i> , 2002 ; KAHRAMAN <i>et al.</i> , 2012 ; ALIPIEVA <i>et al.</i> , 2014)
Terpénoïdes : Iridoïdes Saponines	-Aucubine -Ajugol -Harpagoside	 Ajugol	Antibactérienne, antioxydante, antiinflammatoire, antinociceptive, cicatrisante.	(AKDEMIR <i>et al.</i> , 2004 ; SENATORE <i>et al.</i> , 2006 ; KUPELI <i>et al.</i> , 2007 ; TATLI <i>et al.</i> , 2007)
	-Ilwensisaponine A -Ilwensisaponine C	 Ilwensisaponine C	Diurétique, laxative, expectorante, antiinflammatoire, antinociceptive, antioxydante, antifongique et cytotoxique.	(KAHRAMAN <i>et al.</i> , 2012 ; ALIPIEVA <i>et al.</i> , 2014 ; STOODEH <i>et al.</i> , 2016)
Alcaloïdes	-Verbacine -Verballocine -Verbastatine	 Verbacine	Antiinflammatoire, antalgique, antimicrobienne, antispasmodique et hypotensive.	(BIENZ <i>et al.</i> , 2002 ; ALIPIEVA <i>et al.</i> , 2014 ; JAMSHIDI-KIA <i>et al.</i> , 2018)

II. Cycle cellulaire et anticancéreux

2.1 Description du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une série d'évènements organisés et contrôlés au cours desquels une cellule mère donne naissance à deux cellules filles possédant le même patrimoine génétique (KARP, 2004). Il est composé de deux grandes étapes, l'interphase et la mitose. Lorsque la cellule n'est pas engagée dans le cycle cellulaire, elle se trouve alors dans un état de repos appelé stade G0 (MEIJER, 2003). Les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées dans la figure 6.

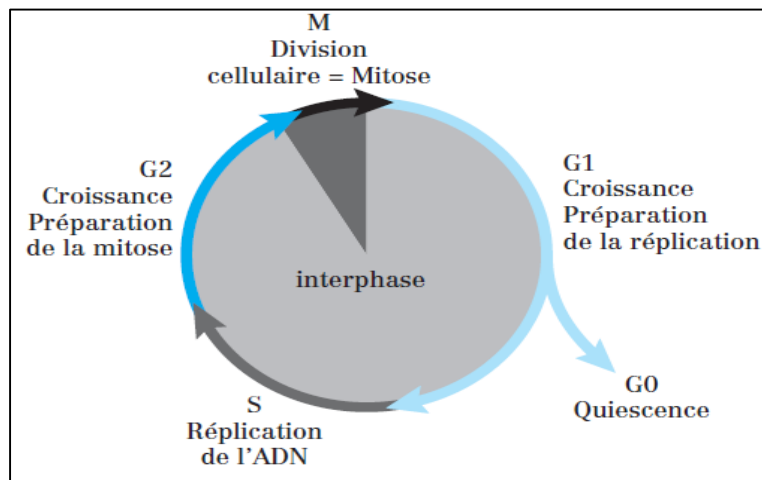


Figure 6 : Les différentes phases du cycle cellulaire (FAVRO et NICOLLE, 2011).

2.1.1 Interphase

Etape préparant la cellule à sa division, elle représente 90% du temps du cycle cellulaire. Elle se décompose en trois phases :

- **La phase G1** (le G vient du mot anglais gap, signifiant pause) : phase de croissance et de reconstitution des réserves, durant laquelle la cellule synthétise des éléments moléculaires nécessaires au bon déroulement des phases suivantes par le biais de transcription et de traduction. On note par exemple, des éléments de structure (acides aminés, nucléotides...), de synthèse (enzymes nécessaires à la transcription des acides ribonucléiques messagers (ARNm) ou à la réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN)) (GALAS *et al.*, 2008 ; FAVRO et NICOLLE, 2011).
- **La phase S** (S pour synthèse) : phase caractérisée essentiellement par la réplication de l'ADN, à la fin de laquelle chaque chromosome dupliqué sera constitué de deux chromatides sœurs. Durant cette étape a lieu également la duplication des centrosomes

Partie bibliographique

(organites non membranueux constituant le centre organisateur des microtubules) (FAVRO et NICOLLE, 2011).

- **La phase G2** : au cours de cette phase la cellule relance la synthèse protéique pour se préparer à sa division. Elle constitue également une phase d'attente et de contrôle permettant de retarder l'entrée en mitose en cas d'éventuels dommages de l'ADN apparus lors de la réplication (NORBURY et NURSE, 1992).

2.1.2 Mitose

La mitose correspond à la division cellulaire qui s'effectue de façon beaucoup plus rapide (environ une heure). Elle comprend quatre phases :

- **Prophase**

Durant cette phase, les chromosomes se condensent et les centrosomes se positionnent de chaque côté du noyau et commencent à nucléer pour former le fuseau mitotique. Ce dernier repousse les deux centrosomes aux pôles opposés de la cellule (GALAS *et al.*, 2008).

- **Métaphase**

L'enveloppe nucléaire est rompue, les chromosomes se trouvent ainsi dans le cytoplasme. Ils se lient aux microtubules du fuseau par l'intermédiaire d'une protéine appelée kinétochore, puis s'alignent sur le plan équatorial de la cellule pour former la plaque métaphasique (COLOMBEL, 2009).

- **Anaphase**

Cette étape correspond à la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Dans un premier temps appelé anaphase A, les microtubules kinétochoriens se dépolymérisent conduisant au déplacement des chromatides vers chacun des pôles. Puis dans un second temps appelé anaphase B, les microtubules polaires s'allongent par polymérisation éloignant de ce fait l'un de l'autre les deux pôles du fuseau (CHEESEMAN et DESAI, 2008).

- **Télophase**

A ce stade, les microtubules kinétochoriens se détachent, les chromosomes se décondensent et retournent à leur état initial de brins d'ADN, deux enveloppes nucléaires se forment autour des chromosomes fils et les autres microtubules s'allongent jusqu'à la formation de deux cellules filles identiques (COLOMBEL, 2009).

Partie bibliographique

Les différentes phases de la mitose sont représentées dans la figure ci-dessous :

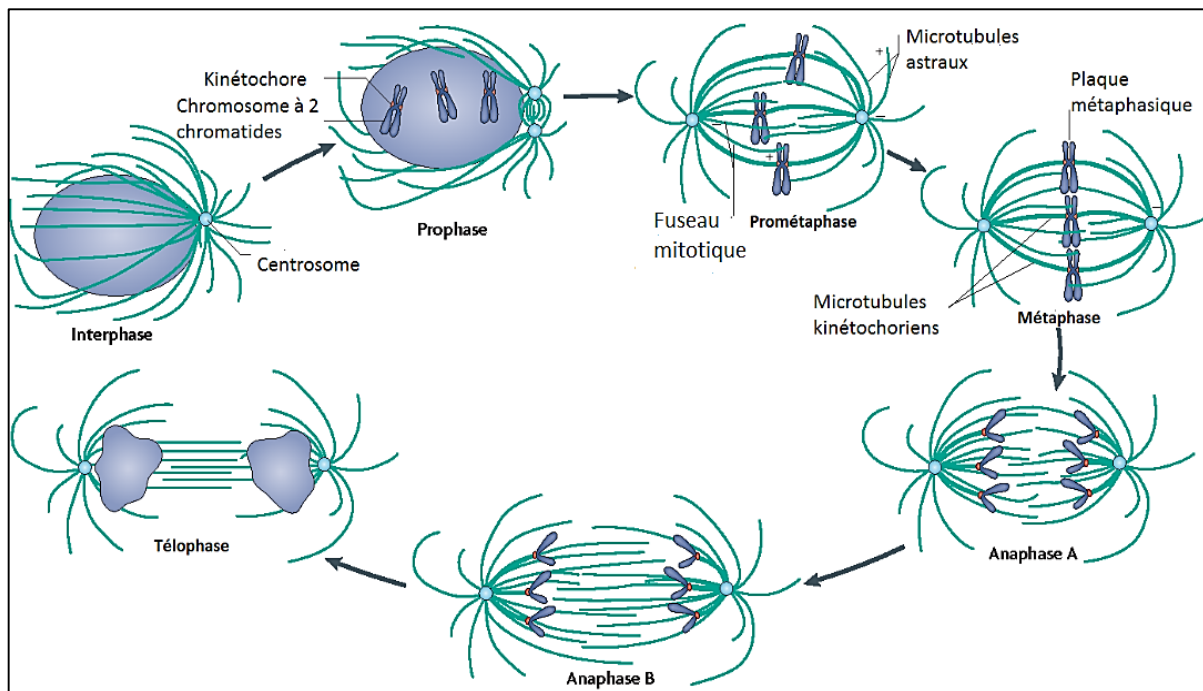


Figure 7 : Les différentes phases de la mitose (WALKZAC *et al.*, 2010).

2.2 Anticancéreux et mode d'action

Les cellules cancéreuses ont la capacité de se diviser beaucoup plus rapidement que les cellules normales. Ainsi, un des moyens de lutte contre le cancer est de limiter le processus de division cellulaire chez ces cellules mutées. Il existe de nombreux anticancéreux qui ont un effet sur la division cellulaire et sont dits «cytotoxiques». Ils sont classés principalement en quatre catégories : les agents alkylants, les antimétabolites, les poisons des topo-isomérases et les antimitotiques. Ces composés agissent à des moments bien précis du cycle cellulaire bloquant ainsi ce dernier à différents stades (Figure 8) selon des mécanismes d'action différents (Tableau III).

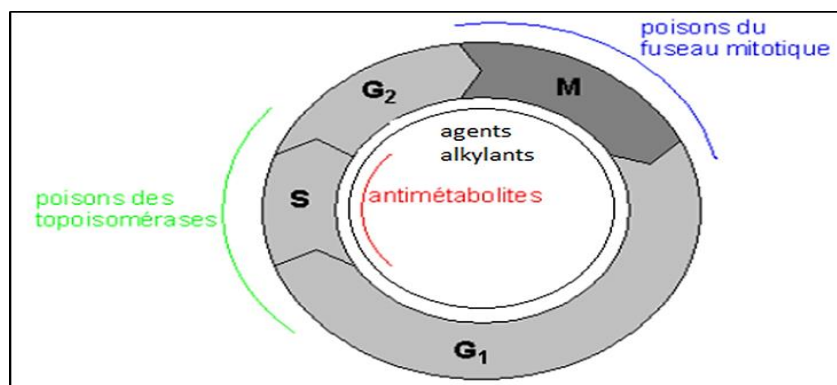


Figure 8 : Les sites d'action des agents anticancéreux au niveau du cycle cellulaire (COLOMBEL, 2009).

Partie bibliographique

Tableau III : Les types d'anticancéreux cytotoxiques et leurs modes d'action.

Classe pharmacologique	Mode d'action	Exemples	Références
Les agents alkylants	Composés capables de fixer un groupement alkyl (R-CH ₂) sur les acides nucléiques. Ils se fixent sur deux sites proches pour créer des ponts (intra ou inter brins) dans les chaînes d'ADN bloquant ainsi la transcription et la réplication de ce dernier.	-Les moutardes azotées (chlorambucil, cyclophosphamide, melphalan). -Les dérivés du platine (Cisplatine, Carboplatine).	(ESPINOSA <i>et al.</i> , 2003)
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 antifoliques (le méthotrexate). -Les analogues des purines (le 6-mercaptopurine). -Les analogues des pyrimidines (la capécitabine).	(LANSIAUX, 2004)
Les poisons des topo-isomérases I et II	Molécules qui stabilisent le complexe ADN-topo-isomérases (enzymes qui induisent des cassures transitoires puis des religations lors de la réplication et la transcription) empêchant ainsi la relication des brins d'ADN conduisant à l'apoptose de la cellule.	-Les inhibiteurs des topo-isomérases I (irinotécan et topotécan). -Les inhibiteurs des topo-isomérases II (étoposide).	(GOLDWASSER, 2007)
Les antimitotiques (Les poisons du fuseau mitotique)	Molécules qui bloquent la mitose en métaphase prolongée par deux mécanismes : - en se fixant sur les tubulines empêchant ainsi leur polymérisation pour former le fuseau mitotique ; -ou bien en se fixant sur les microtubules empêchant leur dépolymérisation en tubuline stabilisant ainsi le fuseau mitotique.	-Les inhibiteurs de la polymérisation des tubulines : vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine, vindésine, vinorelbine), la colchicine et ses dérivés. -Les inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules : taxanes (paclitaxel).	(ROBERT, 2007 ; DUMONTET, 2011)

2.2.1 Anticancéreux d'origine végétale

Le traitement chimiothérapeutique actuel du cancer fait appel à une majorité de produits d'origine naturelle : près de 60% des médicaments antitumoraux proviennent de végétaux (vincristine, paclitaxel), organismes marins (cytarabine, trabectedine) et microorganismes (actinomycine D, temsirolimus) (HELLMAN et VOKES, 1996).

Le règne végétal constitue une source importante de métabolites secondaires avec l'avantage de présenter une grande diversité chimique. En effet, de nombreuses molécules cytotoxiques de propriétés structurales différentes ont été isolées de végétaux et approuvées pour utilisation en chimiothérapie anticancéreuse (SECA et PINTO, 2018) : vincristine, vinblastine, paclitaxel, podophylotoxine et camptothécine (Figure 9). Cependant, ces composés présentent des limites en raison de leur faible solubilité aqueuse, sévérité toxique et leur faible abondance dans les plantes. Pour essayer de remédier à ces problèmes, un certain nombre d'analogues structuraux de ces composés ont été synthétisés par hémisynthèse (CHOUDHARI *et al.*, 2020). Quatre principales classes de molécules anticancéreuses d'origine végétale sont utilisées cliniquement dans le traitement des cancers et sont représentées dans le tableau IV.

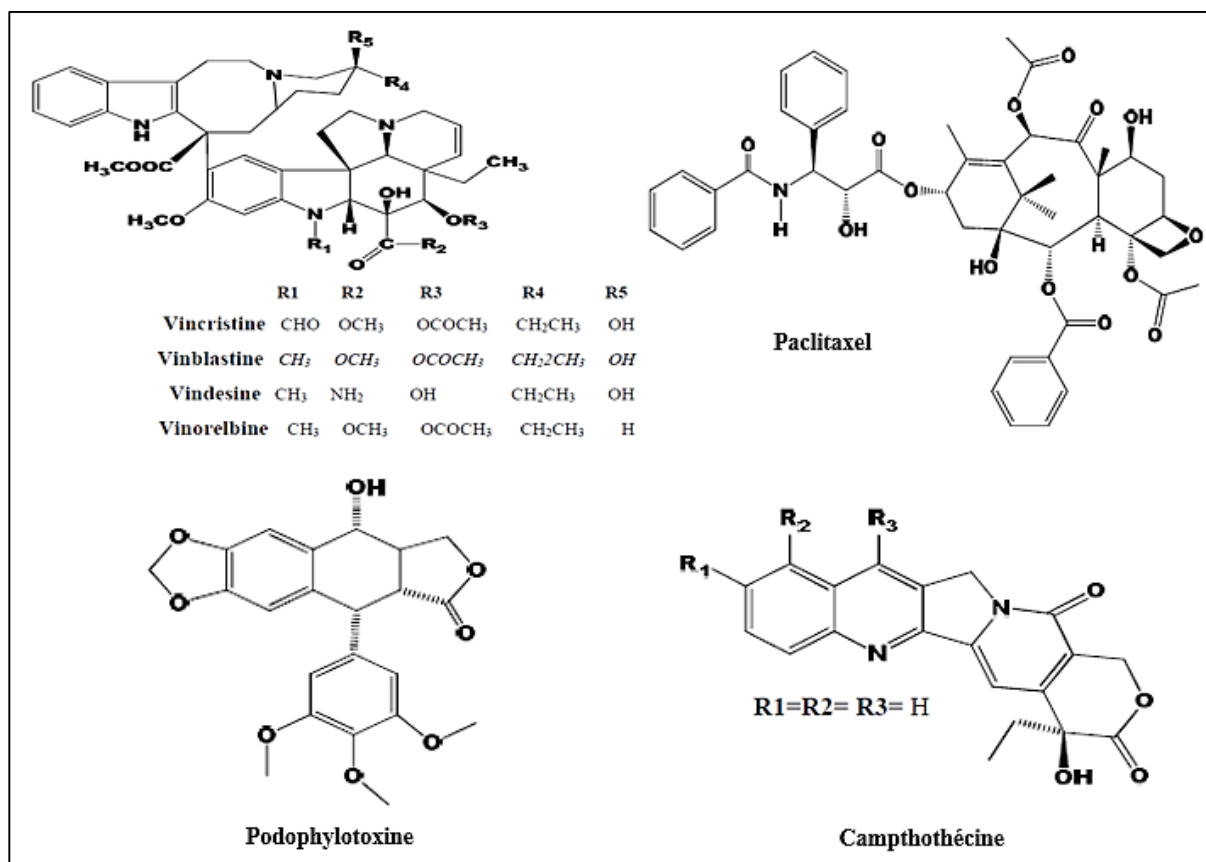


Figure 9 : Structure chimique de quelques molécules anticancéreuses isolées des végétaux (HETIE, 2012).

Partie bibliographique

Tableau IV : Les molécules anticancéreuses d'origine végétale utilisées en thérapeutique et leurs mécanismes d'action.

Molécule	Classe chimique	source	Cible moléculaire	Mode d'action	Références
Vinca-alcaloïdes : Vinblastine Vincristine Vindésine* Vinorelbine*	Alcaloïdes bisindoliques	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubuline	Antimitotiques (inhibent la polymérisation des tubulines en microtubules).	(MARTINO <i>et al.</i> , 2018)
Taxanes : Paclitaxel Docétaxel* Cabazitaxel*	Diterpènes	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubuline	Antimitotiques (inhibent la dépolymérisation des microtubules).	(KOTSAKIS <i>et al.</i> , 2016 ; OUDARD <i>et al.</i> , 2017)
Podophylotoxine : Etoposide* Teniposide*	Lignanes	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomérase II	Inhibent la synthèse d'ADN en formant un complexe avec la topoisomérase II et l'ADN.	(CAO <i>et al.</i> , 2015)
Camptothécine : Irinotécan* Topotécan*	Alcaloïdes	<i>Camptotheca acuminata</i>	Topoisomérase I	Bloquent le complexe de clivage ADN-topoisomérase I avec induction de cassure simple brin.	(HERTZBERG <i>et al.</i> , 1989)

*Dérivés hémisynthétiques.

Partie bibliographique

En plus de ces quatre classes phytochimiques agissant sur des cibles dites «classiques» (tubuline, topoisomérases), d'autres agents anticancéreux d'origine végétale de mécanisme d'action différent sont actuellement utilisés en thérapie anticancéreuse, nous pouvons citer :

- L'homoharringtonine, un alcaloïde (Figure 10) extrait de *Cephalotaxus harringtonia* est approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique. Elle a un mécanisme d'action unique, elle se lie à la grande sous unité ribosomale (site A) et empêche la synthèse protéique bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

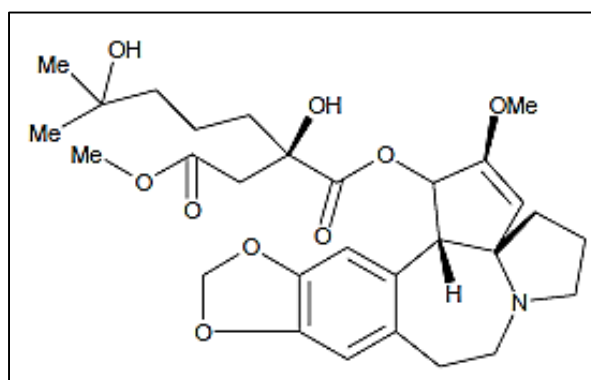


Figure 10 : Structure chimique de l'homoharringtonine (SHOEB, 2006).

- La combrétastatine A4 (CA-4), un cis-stilbène (figure 11) isolé de l'écorce de *Combretum caffrum* présente une activité antiproliférative mais aussi antivasculaire contrairement aux antiméitotiques classiques. La combrétastatine A4 phosphate (CA-4P) (figure 11), un dérivé de CA-4 a été désignée par la FDA en 2003 comme médicament orphelin pour le traitement du cancer anaplasique avancé de la thyroïde. En 2006, elle a été approuvée pour le traitement du cancer de l'ovaire en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel (DA SILVA *et al.*, 2014 ; CHOUDHARI *et al.*, 2020).

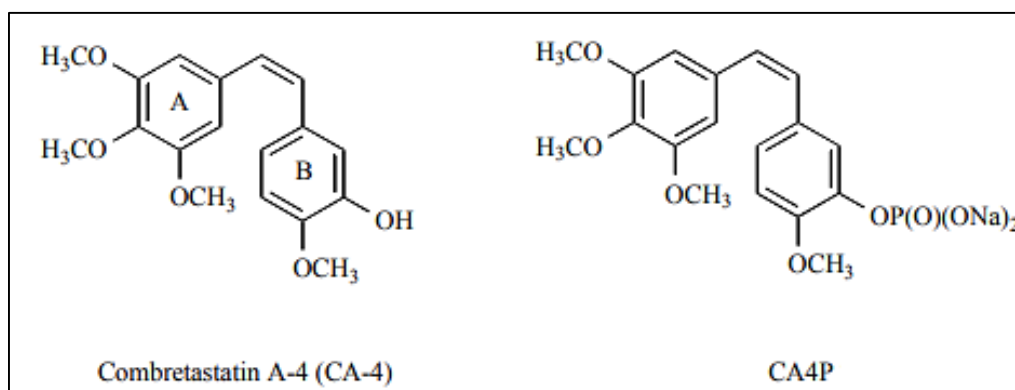


Figure 11 : Structure chimique de la combrétastatine A4 et la combrétastatine A-4P (MARRELLI *et al.*, 2011).

2.2.2 Composés antioxydants et cancers

Ces dernières années les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux antioxydants, composés retrouvés naturellement dans les légumes, les fruits et les plantes médicinales. Ils sont en effet considérés comme une thérapie prometteuse pour la prévention et le traitement des cancers.

Les radicaux libres sont des espèces chimiques extrêmement réactives du fait qu'ils possèdent un électron non apparié dans leur orbitale externe. Ils sont constamment produits dans l'organisme et indispensables au fonctionnement cellulaire. Cependant, si leur quantité excède la capacité du système de défense antioxydant, des dommages oxydatifs se produisent. En effet, l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN est associée à de nombreuses pathologies notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'Alzheimer ainsi que différents types de cancers (leucémie, cancer du sein, de l'ovaire et de l'estomac) (FAVIER, 2006).

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une bonne source d'antioxydants naturels capables d'inhiber l'oxydation des matières oxydables et ainsi prévenir éventuellement les maladies résultantes (SAXENA *et al.*, 2012). Ils exercent leur rôle protecteur par deux principaux mécanismes :

- Piégeage des radicaux libres par transfert d'électrons ou de protons. L'acide gallique, l'épigallocatechine et la quercétine sont d'excellents piégeurs de radicaux libres par don d'hydrogène (LEOPOLDINI *et al.*, 2011).
- Chélation des ions métalliques le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+) notamment par la quercétine et la myricétine. Ces ions sont impliqués dans des réactions qui génèrent des radicaux libres (VERDAN *et al.*, 2011).

Il est bien prouvé expérimentalement que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant les radicaux libres mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en stimulant les gènes récessifs du cancer, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs (PINCEMAIL *et al.*, 1999). Quelques composés phénoliques (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les coumarines) ont montré des activités anticancéreuse, anticarcinogénique et antimutagénique. Les flavonoïdes ont des effets antiprolifératifs et induisent l'apoptose dans différentes lignées cellulaires cancéreuses (ZHOU *et al.*, 2016). De même, des études ont précisé que le piégeage des radicaux libres, caractéristique essentielle des flavonoïdes est partiellement responsable de leurs effets antitumoraux (LEOPOLDINI *et al.*, 2011). Par conséquent, les composés antioxydants présents

Partie bibliographique

dans les plantes médicinales par leur propriété antioxydante et/ ou cytotoxique pourraient jouer un rôle important dans la prévention et/ ou le traitement des cancers.

Aujourd'hui, un certain nombre d'agents promoteurs d'origine végétale tels que la curcumine, l'épigallocatechine gallate, le resvératrol et le sulforaphane font l'objet d'essais cliniques ou précliniques et peuvent être un jour approuvés pour utilisation en thérapie anticancéreuse (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

La curcumine, un polyphénol (Figure 12) extrait à partir du rhizome de *Curcuma longa* L. possède des propriétés anticancéreuses démontrées *in vitro* et *in vivo* contre plusieurs types de cancer (cancer du sein, prostate, colon...). Elle agit selon plusieurs mécanismes d'action, y compris l'induction de l'apoptose, l'inhibition de la prolifération et l'invasion des tumeurs (TOMEH *et al.*, 2019). Actuellement, des essais cliniques sont en cours pour déterminer l'efficacité de la curcumine combinée au paclitaxel dans le traitement du cancer du sein avancé et métastatique (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

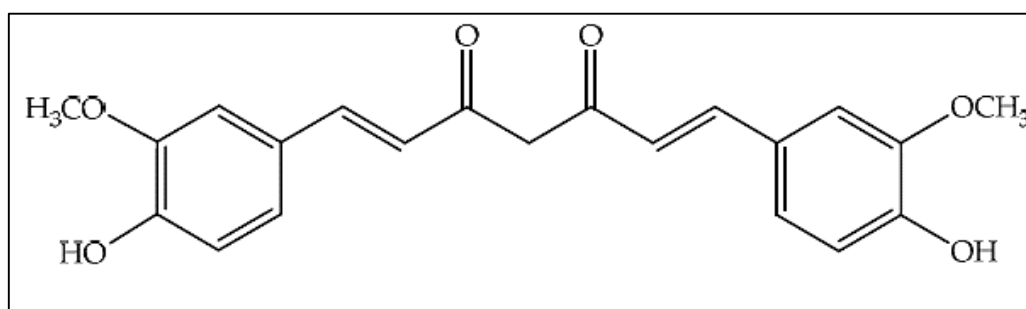


Figure 12 : Structure chimique de la curcumine (SECA et PINTO, 2018).

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

I. 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 Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Son objectif consiste en l'évaluation de l'activité antiproliférative *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. seul et en association respectivement avec la colchicine et la quercétine en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle expérimental.

1.1 Matériel

1.1.1 Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué de :

- feuilles de *Verbascum sinuatum* récoltées dans la région d'Adekar Assif El Hemmam à Bejaia en mai 2017. Ces feuilles ont été nettoyées, séchées puis réduites en une fine poudre qui a été maintenue à température ambiante pour un usage ultérieur ;
- levure boulangère *Saccharomyces cerevisiae* commercialisée. C'est une souche pure ayant les caractéristiques physiologiques et morphologiques représentées dans le tableau suivant :

Tableau V : Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Saccharomyces cerevisiae*.

Caractéristiques	
Température optimale de croissance	28-30°C
PH optimale de croissance	4-4.5
Temps de génération	1-2 heures
Mode de respiration	Aérobie anaérobie facultatif
Mode de reproduction	Sexué et asexué
Forme	Sphérique plus ou moins arrondie

1.1.2 Matériel de laboratoire

En plus du matériel usuel de laboratoire présenté en annexe 1, nous avons utilisés aussi la cellule de Malassez, le microscope optique et le spectrophotomètre UV-visible pour la mise en œuvre de l'activité antiproliférative.

Partie expérimentale

• Description de la cellule de Malassez

La cellule de Malassez est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules (vivantes ou non) en suspension dans une solution. Il s'agit d'une lame en verre (Figure 13) gravée de 100 rectangles dont 25 sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 μl .

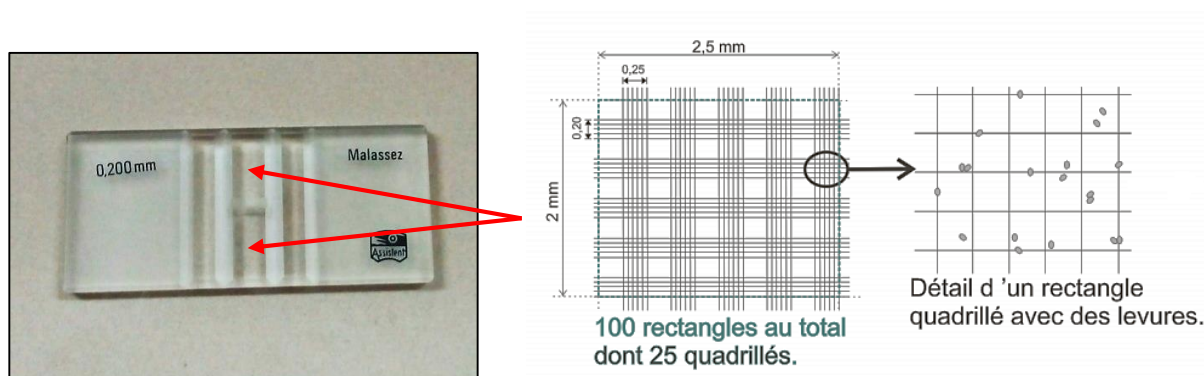


Figure 13 : Cellule de Malassez.

1.1.3 Solvants et réactifs

Les solvants et réactifs utilisés pour réaliser le test antiprolifératif sont énumérés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI : Solvants et réactifs utilisés.

Solvants et réactifs	Concentration	Rôle
Colchicine	1 mg/ml	Témoin positif : inhibe la formation du fuseau mitotique et bloque la division cellulaire en métaphase (agent antimitotique).
Quercétine	1 mg/ml	Témoin positif : inhibe la prolifération des cellules (agent antiprolifératif).
Eau distillée stérile	/	-Témoin négatif. -Solvant (solubiliser la colchicine et la quercétine).
Bleu de méthylène	0.1%	Colorant bleu à l'état oxydé et incolore à l'état réduit.

1.1.4 Milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae*

Le milieu de culture utilisé était du PDB (Potato Dextrose Broth), favorable à la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce milieu a été préparé comme suit :

200 g de pomme de terre épluchées et coupées en petits morceaux sont portés à ébullition dans 200 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Le jus de la pomme de terre est par la suite récupéré dans une fiole jaugée par essorage à travers une gaze. 20 g de glucose sont ajoutés à cet extrait puis le volume est complété avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml. Après homogénéisation, le bouillon obtenu a été réparti dans plusieurs flacons à des volumes connus, puis autoclavé pendant 20 minutes à 120°C afin d'éliminer tous les germes et spores éventuellement présents.

1.2 Méthodes

1.2.1 Extraction aqueuse

L'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. a été préparé par macération de 10g de poudre de feuille dans 200 ml d'eau distillée pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le macéra aqueux obtenu est ensuite filtré successivement à travers une passoire puis un papier Whatman afin d'obtenir un liquide limpide et homogène. Le filtrat récupéré est congelé à -80°C pendant 24 heures en fines couches dans des cristallisoirs puis disposé dans un lyophilisateur. Le lyophilisat obtenu constituant l'extrait aqueux a été conservé à 4°C, à l'abri de la lumière (Figure 14).

Partie expérimentale

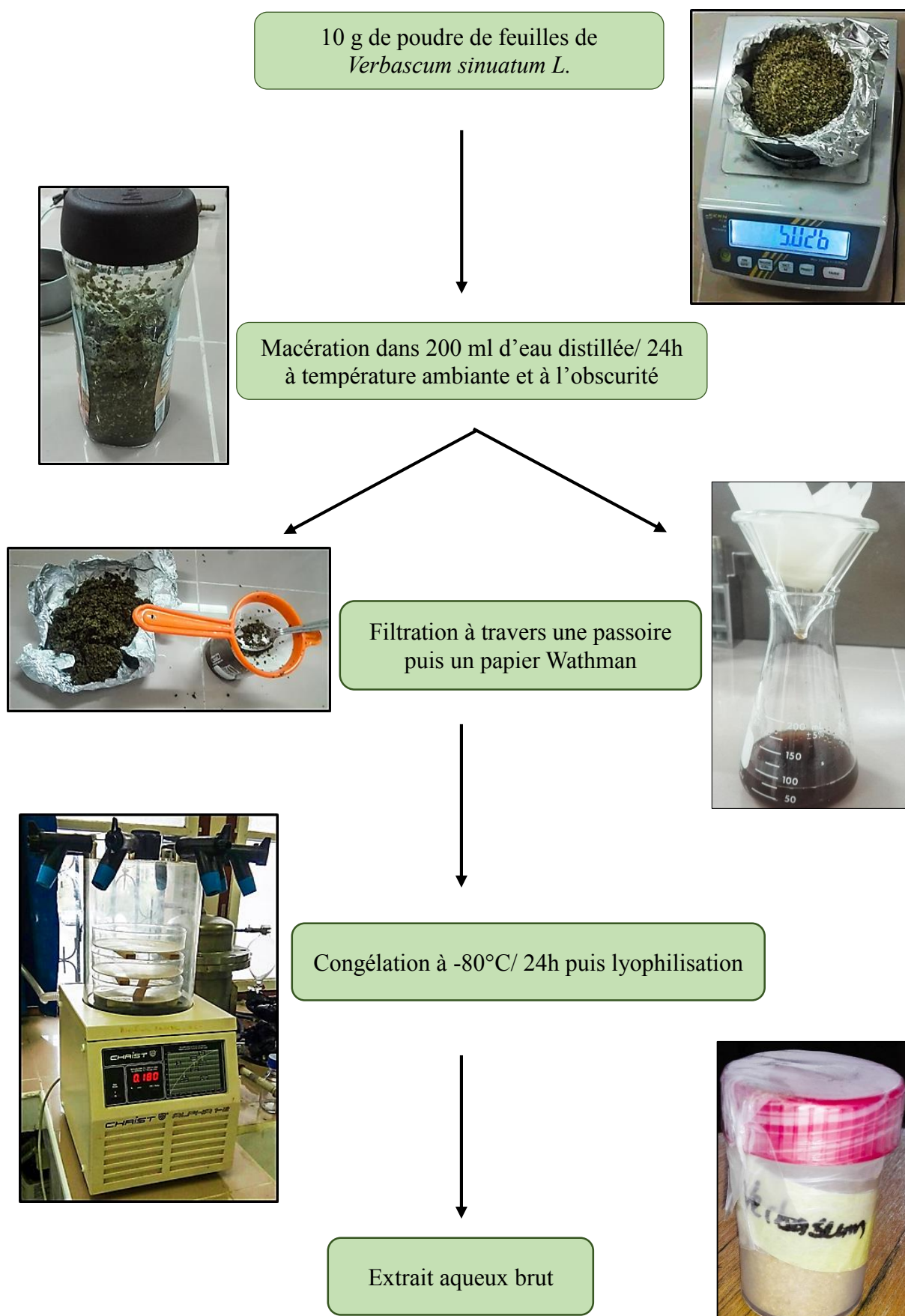


Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction aqueuse.

Partie expérimentale

1.2.2 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 : pouvoir prolifératif rapide, facilité de manipulation et de culture, prix moindre. De plus, les mécanismes moléculaires impliqués dans la division cellulaire sont conservés chez les eucaryotes (DJOS, 2014), ce qui fait d'elle un modèle eucaryote pertinent pour l'étude préliminaire des effets antiprolifératifs et cytotoxiques de l'extrait de notre plante.

1.2.2.1 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.

1.2.2.2 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. Une lecture des DO est faite par la suite avec une numération à l'aide de la cellule de Malassez à partir d'un aliquote de 10 µl pour déterminer la concentration qui correspond à chaque dilution (annexe 2). A partir des résultats obtenus représentés en annexe 3, une courbe d'étalonnage (DO = f (nombre de cellules/ ml)) a été tracée (Figure 15).

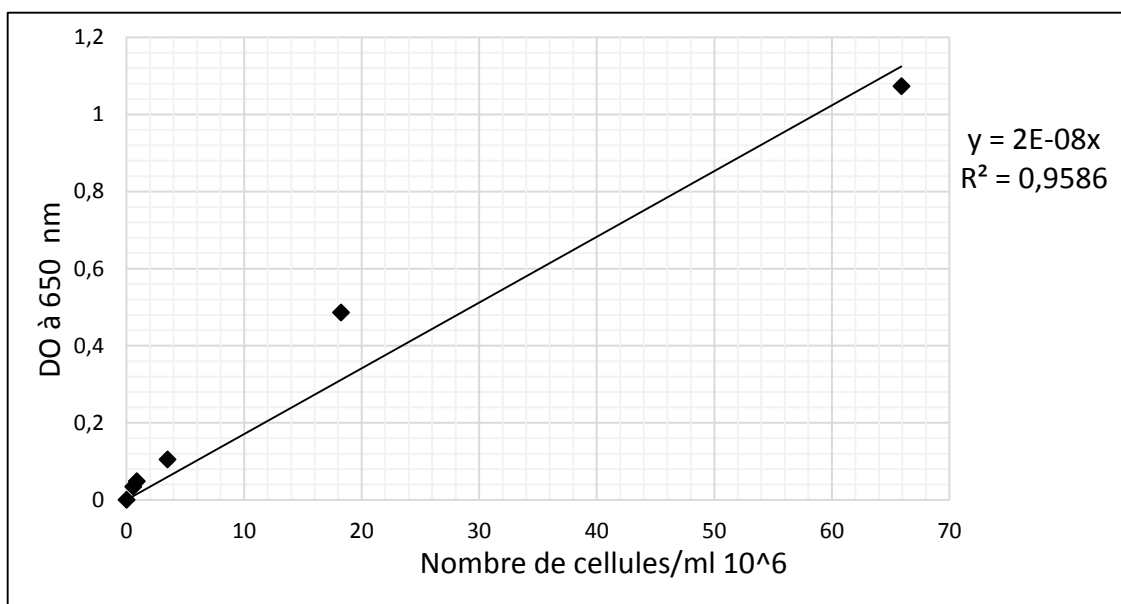


Figure 15 : Courbe d'étalonnage.

Partie expérimentale

L'intérêt de cette courbe est de déceler la concentration idéale en levures qui devrait être utilisée dans le test antiprolifératif pour avoir une bonne visualisation des cellules et faire un dénombrement sans le risque d'erreur.

1.2.2.3 Etude de la viabilité cellulaire par la méthode de coloration au bleu de méthylène

- **Principe**

C'est une méthode de coloration qui permet de faire une estimation rapide du taux de viabilité et mortalité des cellules. 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 qui sont 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).

- **Procédure**

Le test antiprolifératif s'est déroulé dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination pouvant fausser les résultats.

D'abord, une suspension mère de levure d'une DO de 0.1 et une série de sept tubes ont été préparés. 2.5 ml du milieu de culture PDB stérile et 0.5 ml de l'inoculum de levure sont mis dans chacun des tubes, puis sont ajoutés dans le :

- 1^{er} tube (témoin négatif) : 0.5 ml d'eau distillée stérile (EDS) ;
- 2^{ème} tube (témoin positif) : 0.5 ml de colchicine, 1mg/ml ;
- 3^{ème} tube (témoin positif) : 0.5 ml de quercétine, 1mg/ml ;
- 4^{ème} tube : 0.5 ml de l'extrait aqueux de feuilles de *Verbascum sinuatum*, 1mg/ml ;
- 5^{ème} tube : 0.25 ml de colchicine + 0.25 ml de quercétine, 1mg/ml ;
- 6^{ème} tube : 0.25 ml de colchicine + 0.25 ml de l'extrait aqueux, 1mg/ml ;
- 7^{ème} tube : 0.25 ml de quercétine + 0.25 ml de l'extrait aqueux, 1mg/ml.

L'ensemble des tubes sont incubés à 30°C pendant 24 heures. Après le temps d'incubation, 0.5 ml de bleu de méthylène (0.1%) sont ajoutés à tous les tubes, puis sous microscope optique et à l'aide de la cellule de Malassez 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 ensuite en utilisant la formule suivante :

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

Partie expérimentale

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

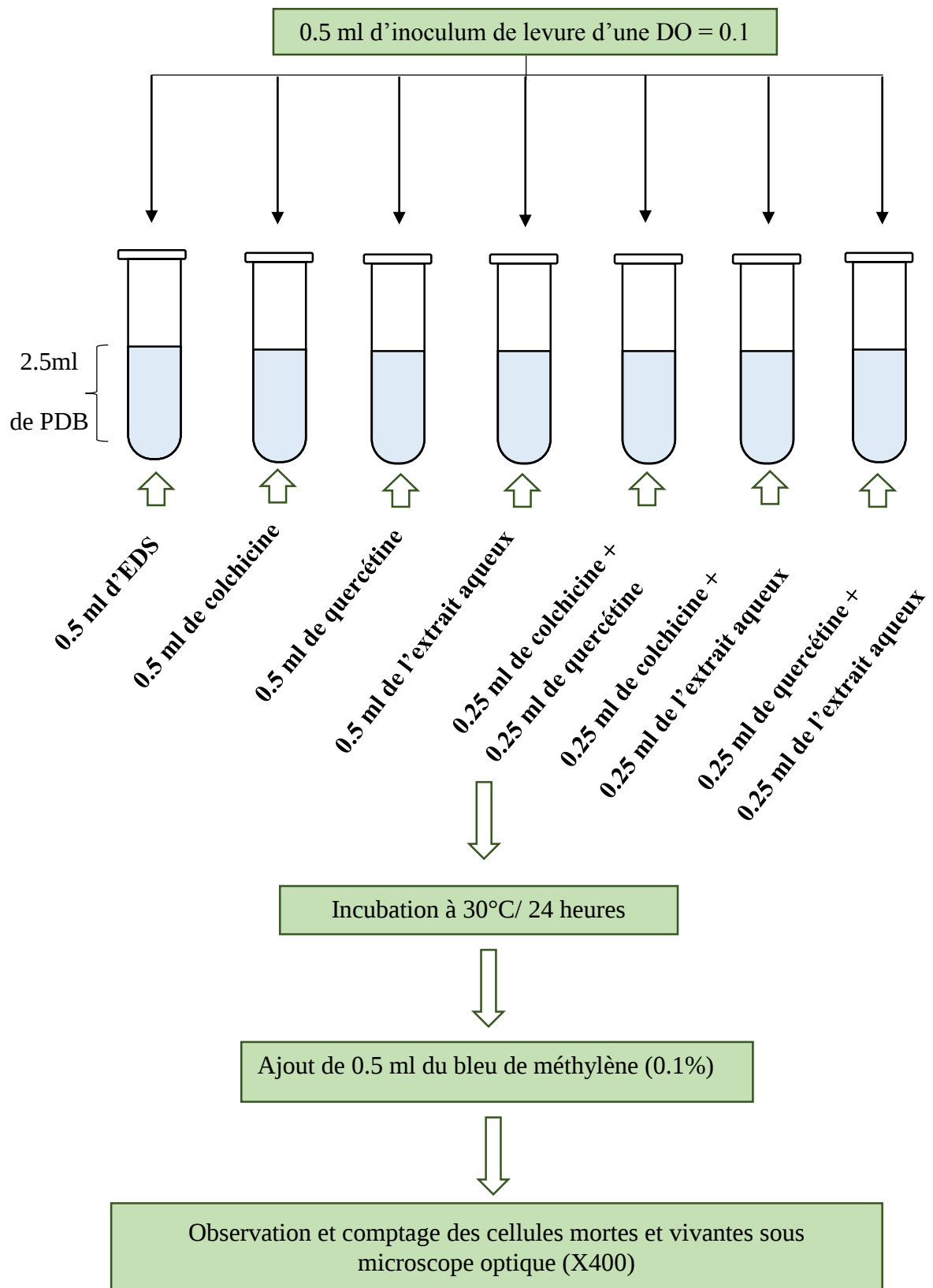


Figure 16 : Les différentes étapes du test antiprolifératif.

Partie expérimentale

1.2.3 Analyse statistique

Les pourcentages de cytotoxicité ont été calculés. Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées afin de mettre en évidence la signification des différences obtenues entre l'extrait étudié, les combinaisons 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 l'extrait testé en groupes homogènes.

II. Résultats et discussion

Nos essais antiprolifératifs sur *Saccharomyces cerevisiae* montrent une inhibition de la croissance et une diminution de la viabilité cellulaire pour les échantillons traités par les témoins positifs (colchicine et quercétine) ainsi que pour ceux traités par l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* et par les combinaisons : extrait aqueux + colchicine, extrait aqueux + quercétine et colchicine + quercétine. Par ailleurs, une croissance cellulaire normale a été observée chez le contrôle négatif. Les moyennes des pourcentages de cytotoxicité retrouvés sont données dans le tableau suivant :

Tableau VII : Moyennes des pourcentages de cytotoxicité (%) des différents extraits testés.

Extraits testés	M ± ES
Témoin négatif	0.00 ± 0.00
Colchicine	61.17 ± 7.06
Quercétine	47.02 ± 2.96
Extrait aqueux	62.37 ± 1.09
Extrait aqueux + colchicine	76.08 ± 2.48
Extrait aqueux + quercétine	34.01 ± 4.72
Colchicine + quercétine	68.19 ± 4.38

M : Moyenne ; **ES :** Erreur standard.

La colchicine et la quercétine, prises respectivement comme premier et second standards avaient exercés un effet cytotoxique sur les levures. Leurs pourcentages de cytotoxicités sont estimés à 61.17 ± 7.06 % pour la colchicine et 47.02 ± 2.96 % pour la quercétine. Ces résultats s'avèrent être proches de ceux rapportés par OUZID *et al.* (2019) dans leur test antiprolifératif des extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* L. utilisant la colchicine et la quercétine comme standards. Ces derniers avaient respectivement des indices de 57.21 ± 1.25 % et de 48.16 ± 1.80 %.

Partie expérimentale

La colchicine et la quercétine sont deux molécules connues pour une activité antiproliférative. La colchicine est un alcaloïde réputé d'une importante activité antimitotique qui est responsable de son effet antiprolifératif (KUMAR *et al.*, 2017). Elle empêche la formation des microtubules conduisant à l'arrêt mitotique et finalement à la mort cellulaire par apoptose. Cette molécule fut utilisée dans le traitement des cancers, mais en raison de sa forte toxicité elle a été écartée de cette thérapie (CHABRIER, 2000 ; KUMAR *et al.*, 2017). Quant à la quercétine, un flavonoïde de type flavonol, sa toxicité est modérée. Plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont rapporté que son effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses s'accompagne de peu ou pas d'effets secondaires sur les cellules normales. L'activité antiproliférative de la quercétine est due à sa capacité à moduler les voies de signalisation moléculaires PI3K/ AKt (phosphoinositide 3-kinase/ protéine kinase B) et MAPK (mitogen-activated protein kinase) impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire et à inhiber les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK), composants essentiels pour la progression du cycle cellulaire (RAUF *et al.*, 2018 ; REYES-FARIAS et CARRASCO-POZO, 2019).

En comparant à ces deux standards nos résultats obtenus avec l'extrait aqueux et les différentes associations nous pouvons évaluer le potentiel antiprolifératif de ces derniers.

Le pourcentage de cytotoxicité de l'extrait aqueux de *V. sinuatum* est de 62.37 ± 1.09 % et ceux des différentes combinaisons sont estimés à : 76.08 ± 2.48 % pour extrait aqueux + colchicine, 34.01 ± 4.72 % pour extrait aqueux + quercétine et 68.19 ± 4.38 % pour colchicine + quercétine.

Des ANOVA réalisées entre le témoin non traité, les deux standards, l'extrait étudié et les différentes combinaisons montrent une différence hautement significative ($p=0.00$) (annexe 5), ce qui explique leur potentiel cytotoxique différent. Ceci nous a conduits à réaliser des comparaisons multiples des moyennes et nous avons ainsi obtenu cinq groupes homogènes qui sont représentés dans le tableau VIII. Le groupe D représenté par le contrôle négatif. Le groupe C comportant la combinaison extrait aqueux + quercétine ayant le pourcentage de cytotoxicité le plus faible. Le groupe BC qui correspond à la quercétine. Par ailleurs, le groupe AB englobe le standard : colchicine et l'extrait aqueux. Enfin, le groupe A comporte les combinaisons dont l'effet cytotoxique est le plus élevé, à savoir colchicine + quercétine et extrait aqueux + colchicine.

Partie expérimentale

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

Extraits testés	M ± ES
Témoin négatif	0.00 ± 0.00 D
Extrait aqueux + quercétine	34.01 ± 4.72 C
Quercétine	47.02 ± 2.96 BC
Colchicine	61.17 ± 7.06 AB
Extrait aqueux	62.37 ± 1.09 AB
Colchicine + quercétine	68.19 ± 4.38 A
Extrait aqueux + colchicine	76.08 ± 2.48 A

Ces résultats indiquent que l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* possède un effet cytotoxique similaire à celui de la colchicine ($p > 0.05$). Cependant, son association aux standards (colchicine, quercétine) a considérablement changé l'effet antiprolifératif. La combinaison extrait aqueux + colchicine a présenté un effet cytotoxique plus élevé en comparaison avec l'extrait testé seul ($p < 0.05$), ce qui suppose un effet synergique ou cumulatif entre les composants de l'extrait et la colchicine étant un alcaloïde de forte toxicité. Quant à la combinaison extrait aqueux + quercétine, elle a montré un effet moindre par rapport à celui de l'extrait seul ($p < 0.01$) et similaire à celui de la quercétine ($p > 0.05$). Ceci explique que cette dernière qui est un flavonoïde à effet antiprolifératif a eu un effet antagoniste vis-à-vis des composants de l'extrait aqueux, ce qui a diminué significativement la cytotoxicité. Cela est intéressant en chimiothérapie anticancéreuse où une cytotoxicité modérée est recherchée.

Concernant la combinaison colchicine + quercétine, son effet cytotoxique est similaire à celui de la colchicine ($p > 0.05$) et significativement plus élevé que celui de la quercétine ($p < 0.05$).

Le phénomène de nécrose cellulaire a été observé chez les levures traitées par l'extrait aqueux (Figure 17) ainsi que par les associations : extrait aqueux + colchicine et colchicine + quercétine, ce qui confirme la forte toxicité de ces derniers.

Partie expérimentale

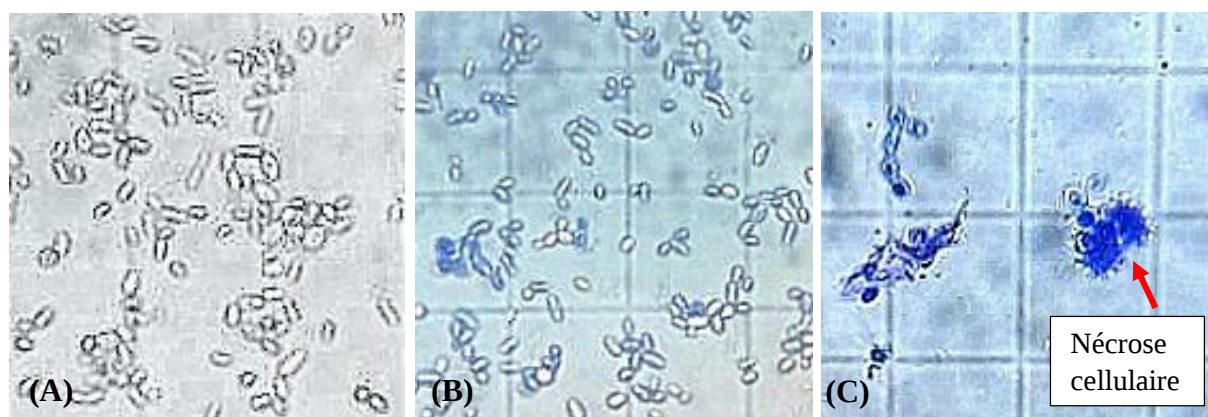


Figure 17 : Action de l'extrait aqueux des feuilles de *V.sinuatum* sur *Saccharomyces cerevisiae* sous microscope optique (X 400).

A : témoin négatif. **B :** témoin positif (quercétine). **C :** levures traitées avec l'extrait aqueux (les cellules colorées sont des cellules mortes).

Dans une étude évaluant l'activité antiproliférative des composés extraits des parties aériennes de *Verbascum thapsus* L. sur des lignées cellulaires du cancer du poumon A549, il a été révélé que le composé lutéoline, un flavonoïde qui fait partie aussi des métabolites secondaires de *V. sinuatum* présente une activité antiproliférative prometteuse (ZHAO *et al.*, 2011).

Une étude réalisée ultérieurement sur l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* au niveau du LABAB par AMARI et OUARAB (2019) a démontré un effet antimittotique qui est proportionnel à la concentration. L'extrait a présenté des indices mitotiques de $42.20 \pm 2.44 \%$ et de $31.00 \pm 2.50 \%$ qui correspondent respectivement aux concentrations de 4mg /ml et 10 mg/ml de l'extrait. Cette même étude, a rapporté que cet extrait est plus riche en alcaloïdes ($84.42 \mu\text{g}$ d'équivalent de colchicine/ mg d'extrait) qu'en flavonoïdes ($13.58 \mu\text{g}$ d'équivalent de quercétine/ mg d'extrait).

Nos résultats et ceux obtenus auparavant nous laissent suggérer que l'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* est dû à des alcaloïdes exerçant un effet antimittotique ou encore à une synergie entre les alcaloïdes et la minorité de flavonoïdes présents dans cet extrait. D'autres investigations sont nécessaires pour avoir plus de précision concernant les molécules bioactives et leur mécanisme d'action et vérifier ainsi nos hypothèses.

CONCLUSION

Conclusion

Dans le contexte de découvrir des biomolécules antitumorales qui pourraient réduire les effets indésirables de la chimiothérapie anticancéreuse, nous avons évalués l'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. (1 mg/ ml) ainsi que celui des combinaisons : extrait aqueux + colchicine (1mg/ ml), extrait aqueux + quercétine (1mg/ ml) et colchicine + quercétine (1mg/ ml). Le test antiprolifératif a été réalisé sur des cellules eucaryotes : levures *Saccharomyces cerevisiae* par la méthode de coloration au bleu de méthylène utilisant la colchicine et la quercétine comme standards.

Cette étude nous a permis de conclure que :

- l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* présente un effet antiprolifératif avec une cytotoxicité similaire à celle de la colchicine ;
- l'association de cet extrait à l'alcaloïde : colchicine, augmente la toxicité envers les levures suite à un effet cumulatif ou encore synergique entre cet alcaloïde et les composés de l'extrait ;
- la combinaison de la quercétine à l'extrait foliaire aqueux diminue la cytotoxicité de ce dernier suite à l'effet antagoniste du flavonoïde ;
- la combinaison colchicine + quercétine présente un effet cytotoxique élevé au même titre que la colchicine.

L'ensemble de ces résultats démontre d'une part, le potentiel de l'extrait étudié comme source de biomolécules à activité antiproliférative qui pourraient inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et, d'autre part, la cytotoxicité modérée de la combinaison extrait aqueux + quercétine qui *in vivo* pourrait avoir peu ou pas de toxicité sur les cellules saines.

Ceci nous incite à mettre en œuvre d'autres investigations et perspectives tel que :

- la caractérisation chimique pour identifier les composés bioactifs de l'extrait étudié ;
- tester l'extrait fractionné pour déterminer les molécules responsables de l'effet antiprolifératif ;
- déterminer la dose thérapeutique de la molécule bioactive ;
- combiner le principe actif avec la quercétine ;
- réaliser des tests sur des cellules saines et cancéreuses *in vitro* et *in vivo*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- AKDEMIR Z.S., TATLI I.I., BEDIR E. and KHAN I.A. (2004).** Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 71-75.
- ALIPIEVA K.I., ORHAN I.E., CANKAYA I.I.T. and GEORGIEV M.I. (2014).** Treasure from garden : chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochemistry Reviews*, 3, 417-444.
- AMARI T. et OUARAB K. (2019).** Effet antimitotique et cytotoxique des alcaloïdes et d'extrait aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. Mémoire de fin d'études. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, 73p.
- AMENTA R., CAMARDA L., DI STEFANO V., LENTINI F. and VENZA F. (2000).** Traditional medicine as a source of new therapeutic agents against psoriasis, *Fitoterapia*, 71, 13-20.
- ARRIF S. (2008).** Etude des metabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum* : *V. ballii* et *V. dentifolium*. Thèse de Doctorat. Université El Hadj Lakhder, Batna, Algérie, 172p.
- BENKHNIGUE O., ZIDANE L., FADLI M., ELYACOUBI H., ROCHDI A. et DOUIRA A. (2010).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonensia*, 53, 191-216.
- BENTABET N., BOUCHERIT-OTMANI Z. et BOUCHERIT K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12 (6), 364-371.
- BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILI P. and TROGOLO C. (1980).** 6-O- β -D-xylopyranosyl aucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, 19 (4), 571-573.
- BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILI P. and TROGOLO C. (1981).** 6-O- α -L-sinuosyl aucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, 20 (3), 465-468.
- BIENZ S., DETTERBECK R., ENSCH C., GUGGISBERG A., HAUSERMANN U., CHRISTIAN MEISTERHANS, WENDT B., WERNER C. and HESSE M. (2002).** Putrescine, spermidine, spermine, and related polyamine alkaloids ; in : «The Alkaloids» ed. CORDELL G.A., Vol. 58, Academic Press, San Diego, 180 p.
- BOUKEF M.K. (1986).** Les Plantes de la Médecine Traditionnelle Tunisienne. Médecine traditionnelle et pharmacopée, Agence de coopération culturelle et technique, Paris.

Références bibliographiques

- BOURGAUD F., GRAVOT A., MILESI S. and GONTIER E. (2001).** Production of plant secondary metabolites : a historical perspective. *Plant Science*, 161 (5), 839–851.
- ÇALIS I., GAZAR H.A., BEDIR E. and KHAN I.A. (2002).** Phenylethanoid glycosides with free radical scavenging properties from *Verbascum wiedemannianum* ; in : «Biodiversity» ed. ŞENER B., Springer, Boston, pp. 257-260.
- CAO B., CHEN H., GAO Y., NIU C., ZHANG, Y. and LI L. (2015).** CIP-36, a novel topoisomerase II-targeting agent, induces the apoptosis of multidrug-resistant cancer cells *in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine*, 35 (3), 771–776.
- CHABRIER J.E. (2000).** Molécules cytostatiques d'origine naturelle, situation actuelle, perspectives d'avenir. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy, France, 124p.
- CHEESMAN I.M. and DESAI A. (2008).** Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface. *Molecular Cell Biology*, 9 (1), 33-46.
- CHOUDHARI A.S., MANDAVE P.C., DESHPANDE M., RANJEKAR P. and PRAKASH O. (2020).** Phytochemicals in cancer treatment : from preclinical studies to clinical practice. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1614.
- COLOMBEL V. (2011).** Synthèse et étude de l'activité biologique de nouveaux analogues du N-acétylcolchicol. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, 243p.
- CROTEAU R., KUTCHAN T. M. and LEWIS N. G. (2000).** Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- DA SILVA P.P.J., BENDJEDDOU L.Z. et MEIJER L. (2014).** Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique (2). *Medecine Sciences*, 30 (3), 319-328.
- DANE F. and YILMAZ G. (2009).** A new natural hybrid of *Verbascum* (*Scrophulariaceae*) from European Turkey. *Phytologia Balcanica*, 15 (2), 181-184.
- DAOUDI A., NAJEM M., BACHIRI L., IBIJBIJEN J. et NASSIR L. (2015).** Etude ethnobotanique au Moyen Atlas Central. *European Scientific Journal*, 11(24), 226-242.
- DAOUDI A., NAJEM M., BACHIRI L., IBIJBIJEN J. et NASSIR L. (2019).** Monographies des plantes à haute fréquence d'utilisation en pharmacopée traditionnelle au Moyen Atlas Central Maroc. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 40 (3), 6712-6730.

Références bibliographiques

- 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.
- DUMONTET 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.
- FAURE S. (2010).** Anticancéreux cytotoxiques. *Actualités pharmaceutiques*, 49 (497), 51-54.
- FAVIER A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64 (6), 390-396.
- FAVRO C. et NICOLLE F. (2011).** Biologie Cellulaire. Hachette Education, Paris.
- GALAS S., DESCAMPS S. et MARTINEZ A.M. (2008).** Le Cycle Cellulaire. De Boeck, Bruxelles.
- GOLDWASSER F. (2007).** Les poisons des topo-isomérases I. *Oncologie*, 9 (11), 758-765.
- HELLMAN S. and VOKES E.E. (1996).** Advancing current treatments for cancer. *Scientific American Journal*, 275 (3), 84-89.
- HERTZBERG R. P., CARANFA M. J. and HECHT S. M. (1989).** On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin : evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 28 (11), 4629–4638.
- HETIE S. (2012).** Etude *in vitro* des effets antiprolifératif et antiradicalaire d'extraits de graines de *Abrus precatorius* L. Thèse de Doctorat. Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 148p.
- HUBER-MORATH A. (1978).** *Verbascum* L. ; in: «Flora of Turkey and the East Aegean Islands» ed. DAVIS P. H., Vol. 6, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- JARADAT N. A., MASOUD B. and ABUHADID M. M. (2015).** Screening antibacterial and antifungal activities and evaluation of the exhaustive extractions yields for *Verbascum sinuatum* L. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 6 (1), 105-110.
- JAMSHIDI-KIA F., LORIGOOINI Z., ASGARI S. and KARAMATOLLAH S. (2018).** Iranian species of *Verbascum* : a review of botany, phytochemistry, and pharmacological effects. *Toxin Reviews*, 4 (38), 255-262.

- KAHRAMAN C., AKDEMIR Z.S. and TATLI I.I. (2012).** Promising cytotoxic activity profile, biological activities and phytochemical screening of *Verbascum* L. species. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6, 63-75.
- KARAMIAN R. and GHASEMLOU F. (2013).** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of three *Verbascum* species from Iran. *Journal of Medcinal Plants and Buy-products*, 2 (1), 43-51.
- KARP G. et WISSOCQ J.C. (2004).** Biologie Cellulaire et Moléculaire. 2ème Ed., De Boeck, Bruxelles.
- KHALEELIAH W. M. H. (2001).** Screening of anticancer activity of Palestinian plants. Thèse de Doctorat. Université nationale An-Najah, Naplouse, Palestine, 100p.
- KOTSAKIS A., MATIKAS A., KOINIS F., KENTEPOZIDIS N., VARTHALITIS I. I., KARAVASSILIS V., SAMANTAS E., KATSAOUNIS P., DERMITZAKI E. K., HATZIDAKI D., MAVROUDIS D. and 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.
- KÜÇÜK S., ÖZDEMİR F., İŞCAN G. and İNCESU Z. (2016).** Determination of cytotoxic and anticandidal activities of three *Verbascum* L. species from Turkey: *V. cheiranthifolium* Boiss. var. *asperulum* (Boiss.) Murb. Monorg., *V. pycnostachyum* Boiss. & Heldr and *V. orgyale* Boiss. & Heldr. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (3), 318-322.
- KUMAR A., DEV K. and SOURIRAJAN A. (2015).** Screening of medicinal and aromatic plants of himachal pradesh for antiproliferative activities against budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6 (3), 280-288.
- KUMAR A., SHARMA P.R. and MONDHE D.M. (2017).** Potential anticancer role of colchicine-based derivatives : an overview. *Anti-Cancer Drugs*, 28 (3), 250-262.
- KUPELI E., TATLI I.I., AKDEMIR Z.S. and YESILADA E. (2007).** Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 444-450.
- LANSIAUX A. (2007).** Quelles nouvelles à propos des antimétabolites en oncologie ? *Oncologie*, 9 (11), 746-750.

- LEOPOLDINI M., RUSSO N. and TOSCANO M. (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125 (2), 288–306.
- MARRELLI M., CONFORTI F., STATTI G.A., CACHET X., MICHEL S., TILLEQUIN F. and MENICHINI F. (2011).** Biological potential and structure-activity relationships of most recently developed vascular disrupting agents : an overview of new derivatives of natural combretastatin A-4. *Current Medicinal Chemistry*, 18 (20), 3035-3081.
- MARTINO E., CASAMASSIMA G., CASTIGLIONE S., CELLUPICA E., PANTALONE S., PAPAGNI F., RUI M., SICILIANO A.M. and COLLINA S. (2018).** Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents : looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28 (17), 2816–2826.
- MEDDOUR R., MELLAL H., MEDDOUR S.A et DERRIDJ A. (2009).** La flore médicinale et ses usages actuels en Kabylie (Wilaya de Tizi Ouzou, Algérie) : quelques résultats d’une étude ethnobotanique. *Revue des régions arides*, 181-201.
- MEIJER L. (2003).** Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 5, 311-326.
- MOEIN S., MOEIN M., KHOSHNOUD M. J. and KALANTERI T. (2012).** *In vitro* antioxidant properties evaluation of 10 iranian medicinal plants by different methods. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 14 (12), 771-775.
- MOUSAVI S.N.M., DELAZER A., NAZEMIYEH H. and KHODAIE L. (2015).** Biological activity and phytochemical study of *Scutellaria platystegia*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (1), 215-223.
- NORBURY C. and NURSE P. (1992).** Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 441–470.
- LOUDARD S., FIZAZI K., SENGLOV L., DAUGAARD G., SAAD F., HANSEN S., HJALM-ERIKSSON, JASSEM J., THIERY-VUILLEMIN A., CAFFO O., CASTELLANO D., MAINWARING P.N., BERNARD J., SHEN L., CHADJAA M. and SARTOR O. (2017).** Cabazitaxel versus docetaxel as first-line therapy for patients with metastatic castration resistant prostate cancer : a randomized phase III trial-firstana. *Journal of Clinical Oncology*, 35 (28), 3189–3197.

Références bibliographiques

- OUZID Y., SMAIL-SAADOUN N. and HOUALI K. (2019).** Antimitotic 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. and KIRSOP B. (1990).** A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6 (3), 346-347.
- PINCEMAIL J., MEURISSE M., LIMET R. et DEFRAIGNE J.O. (1999).** Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4 (4).
- POLETTI A. (1988).** Fleurs et Plantes Médicinales. 2ème Ed., Delachaux et Niestlé, Neuchâtel, Suisse.
- RAHHEL R., SADDIQE Z., IRAM M. et AFZAL S. (2017).** *In vitro* antimitotic, antiproliferative and antioxidant activity of stem bark extracts of *Ficus benghalensis* L. *South African Journal of Botany*, 111, 248-257.
- RAUF A., IMRAN M., KHAN I.A., REHMAN M.U., GILANI S.A., MEHMOOD Z. and MUBARAK M.S. (2018).** Anticancer potential of quercetin : a comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32 (11), 2109-2130.
- REMAL P.S. (2014).** Approche moléculaire et morphologique du genre *Verbascum* L. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, Toulouse, France, 177p.
- REYES-FARIAS M. and CARRASCO-POZO C. (2019).** The anti-cancer effect of quercetin : molecular implications in cancer metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (13), 3177.
- ROBERT J. (2007).** Les poisons du fuseau. *Oncologie*, 9 (11), 766-772.
- SALABIYAH SHAHHAT I. (2010).** Comparative studies of the phenolic constituents of two *Verbascum* species. *Egyptian Journal of Desert Research*, 60 (1), 95-112.
- SAXENA M., SAXENA J. and PRADHAN A. (2012).** Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(2), 130-134.

Références bibliographiques

- SHOEB M. (2006).** Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 1 (2), 35-41.
- SHWETA S., KHADABADI S. and TAPADIYA GANESH G. (2012).** *In vitro* evaluation of antimitotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extracts of *Revia hypocrateriformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2 (1), S503-S508.
- SECA A.M.L. and PINTO D.C.G.A. (2018).** Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (1), 263.
- SENATORE F., RIGANO D., FORMISANO C., GRASSIA A., BASILE A. and SORBO S. (2007).** Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. *Filoterapia*, 78 (3), 244-247.
- SENER A. and 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.
- SOTOODEH A. (2015).** Histoire biogéographique et évolution des genres *Verbascum* et *Artemisia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, Toulouse, France, 201p.
- SOTOODEH A., ATTAR F. and CIVEYREL L. (2016).** Species of *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) from the Gilan Province (Iran), based on morphological and molecular evidences. *Adansonia*, 38, 127–132.
- TATLI I.I. and AKDEMIR Z.S. (2004).** Chemical constituents of *Verbascum* L. species. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29 (2), 93-107.
- TATLI I.I. and AKDEMIR Z.S. (2006).** Traditional uses and biological activities of *Verbascum* species. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31 (2), 85-96.
- TOMEH M.A., HADIANAMREI R. and ZHAO X. (2019).** A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (5), 1033.

Références bibliographiques

VERDAN A.M., WANG H.C., GARCIA C.R., HENRY W.P. and BRUMAGHIM J.L. (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin : implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (10), 1314-1322.

WALCZAK C.E., CAI S. and KHODJAKOV A. (2010). Mechanisms of chromosome behavior during mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11 (2), 91-102.

WILLIAMS D. H., STONE M. J., HAUCK P. R. and RAHMAN S. K. (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized ? *Journal of Natural Products*, 52 (6), 1189-1208.

ZHAO Y.L., WANG S.F., LI Y., HE Q.X., LIU K.C. YANG Y.P. and LI X.L. (2011). Isolation of chemical constituents from the aerial parts of *Verbascum thapsus* and their antiangiogenic and antiproliferative activities. *Archives of Pharmacal Research*, 34 (5), 703-707.

ZHOU Y., ZHENG J., LI Y., XU D.P., LI S., CHEN Y.M. and LI H.B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8 (8), 515.

Site internet

<https://www.tilo-botanica.eu/espece-t-z/verbascum-sinuatum.html>. Consulté le 21.04.2020

ANNEXES

Annexes

Annexe 1

Matériel de laboratoire utilisé

Type	Matériel
Verrerie	Flacons, tubes à essais, éprouvettes graduées, Erlenmeyer, béchers, fioles jaugées, lames et lamelles.
Appareillage	Etuve, four Pasteur, spectrophotomètre UV-visible, autoclave, balance électrique, agitateur magnétique, plaque chauffante, distillateur, lyophilisateur CHRIST Alpha 1-2, vortex.
Autres	Micropipette, embouts stériles, pinces, papier Wathman, gaze.

Annexe 2

Principe du dénombrement des cellules de levure sur cellule de Malassez

Pour dénombrer les cellules de levure contenues dans une suspension, déposer 10 µl de celle-ci entre la lame de Malassez et la lamelle de façon à remplir la chambre de comptage par capillarité. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage pendant quelques minutes puis passer à l'observation sous microscope optique (X400).

Le comptage a été effectué dans 5 rectangles de la cellule de Malassez (Figure 18). Le nombre de cellules/ ml a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de cellules/ ml} = n \times 100 \times 10^3 = n \times 10^5$$

Sachant que “n” représente la moyenne des cellules comptées dans 5 rectangles.

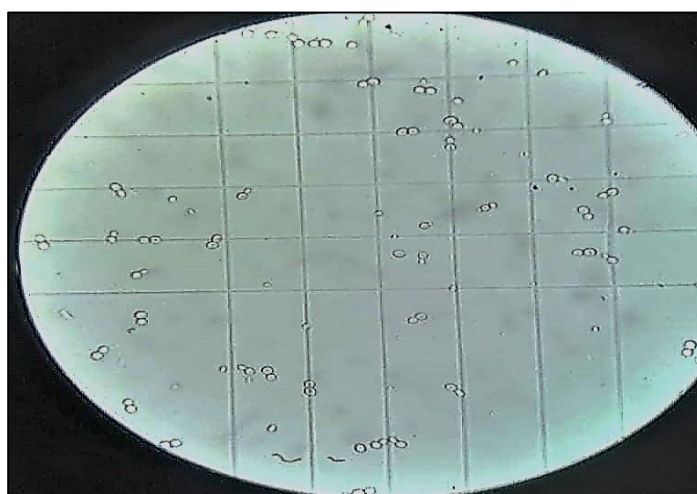


Figure 18 : Cellule de Malassez sous microscope optique (X400).

Annexes

Annexe 3

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 4

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

Extrait testé	Pourcentages de cytotoxicité (%)		
Témoin négatif	0.00	0.00	0.00
Colchicine	73.03	66.19	44.31
Quercétine	52.11	40	48.97
Extrait aqueux	61.53	65	60.60
Extrait aqueux + colchicine	71.43	81.81	75
Extrait aqueux + quercétine	34.37	43.86	23.80
Colchicine + quercétine	62.50	78.94	63.15

Annexe 5

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

Effet	Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (Feuille)					
	Paramétrisation sigma-restreinte					
Effet	Décomposition efficace de l'hypothèse					
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	52160,55	1	52160,55	752,6591	0,000000	
extraits testés	12161,17	6	2026,86	29,2469	0,000000	
Erreur	970,22	14	69,30			

(A) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre les différents extraits testés

Annexes

Cellule N°	extraits testés	cytotoxicité Moyenne	A	B	C	D
1	T-	0,00000				****
7	EA+Q	34,01000			****	
3	Q	47,02667		****	****	
2	C	61,17667	****	****		
5	EA	62,37667	****	****		
4	C+Q	68,19667	****			
6	EA+C	76,08000	****			

(B) : Résultat du test de Newman-Keuls (classement en groupes homogènes)

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Nv_Var1 (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	22898,14	1	22898,14	198,7363	0,000147
EA et C	2,16	1	2,16	0,0187	0,897709
Erreur	460,87	4	115,22		

(C) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre l'extrait aqueux et la colchicine

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Nv_Var2 (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	28755,37	1	28755,37	1732,850	0,000002
EA+C et EA	281,67	1	281,67	16,974	0,014613
Erreur	66,38	4	16,59		

(D) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre la combinaison extrait aqueux + colchicine et extrait aqueux testé seul

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Nv_Var4 (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	13935,58	1	13935,58	262,7478	0,000085
EA+Q et EA	1207,00	1	1207,00	22,7574	0,008837
Erreur	212,15	4	53,04		

(E) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre la combinaison extrait aqueux + quercétine et extrait aqueux testé seul

Annexes

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Nv_Var6 (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	9850,412	1	9850,412	140,5259	0,000290
EA+Q et Q	254,150	1	254,150	3,6257	0,129620
Erreur	280,387	4	70,097		

(F) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre la combinaison extrait aqueux + quercétine et quercétine

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Nv_Var2 (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	19914,62	1	19914,62	315,6906	0,000059
C+Q et Q	672,25	1	672,25	10,6567	0,030950
Erreur	252,33	4	63,08		

(G) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre la combinaison colchicine + quercétine et quercétine

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Nv_Var3 (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	25106,19	1	25106,19	161,0766	0,000222
C+Q et C	73,92	1	73,92	0,4743	0,528896
Erreur	623,46	4	155,86		

(H) : Comparaison des pourcentages de cytotoxicité entre la combinaison colchicine + quercétine et colchicine.

Résumé

Dans le cadre de développer de nouvelles pistes thérapeutiques pour lutter contre le cancer, nous nous sommes intéressées à une plante médicinale, *Verbascum sinuatum* L. dont le potentiel anticancéreux est jusqu'ici très peu étudié. Nous avons ainsi évalué l'effet antiprolifératif de l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* testé seul et combiné à des molécules bioactives : la colchicine et la quercétine. Le test antiprolifératif a été réalisé par la méthode de coloration au bleu de méthylène utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote ainsi que la colchicine et la quercétine comme standards. L'extrait et les différentes associations testés ont inhibé la croissance cellulaire des levures avec des potentiels cytotoxiques différents. Le pourcentage de cytotoxicité de l'extrait aqueux de *V. sinuatum* est estimé à 62.37 ± 1.09 % similaire à celui de l'alcaloïde, colchicine pris comme standard (61.17 ± 7.06 %). La combinaison extrait aqueux + colchicine a exprimé une activité plus élevée avec un pourcentage de cytotoxicité de 76.08 ± 2.48 %, ce qui révèle un effet synergique ou cumulatif entre la colchicine et les composés de l'extrait. Quant à l'association extrait aqueux + quercétine, elle a montré un effet antiprolifératif plus faible (34.01 ± 4.72 %) qui est similaire à celui de la quercétine prise comme second standard (47.02 ± 2.96 %). Ceci montre l'effet antagoniste de la quercétine. Par ailleurs, une combinaison entre l'alcaloïde (colchicine) et le flavonoïde (quercétine) a été réalisée. Cette combinaison a montré un effet antiprolifératif élevé (68.19 ± 4.38 %) au même titre que la colchicine (61.17 ± 7.06 %). Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent d'une part, le potentiel de l'extrait aqueux des feuilles de *V. sinuatum* comme source de biomolécules à effet antiprolifératif et, d'autre part, l'intérêt de la combinaison extrait aqueux + quercétine qui présente une cytotoxicité modérée.

Mots clés : *Verbascum sinuatum* L., extrait foliaire aqueux, *Saccharomyces cervisiae*, effet antiprolifératif, cytotoxicité.

Abstract

As part of our efforts to develop new therapeutic paths to fight cancer, we are interested in a medicinal plant, *Verbascum sinuatum* L., whose anti-cancer potential has so far been little studied. We thus evaluated the antiproliferative activity of the aqueous extract of the leaves of *V. sinuatum* tested alone and combined with bioactive molecules: colchicine and quercetin. The antiproliferative test was performed by the methylene blue staining method using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a eukaryotic cell model and colchicine and quercetin as standards. The extract and the different combinations tested inhibited yeast cell growth with different cytotoxic potentials. The percentage cytotoxicity of the aqueous extract of *V. sinuatum* was estimated at 62.37 ± 1.09 % similar to that of the alkaloid, colchicine taken as standard (61.17 ± 7.06 %). The combination aqueous extract + colchicine expressed a higher activity with a cytotoxicity percentage of 76.08 ± 2.48 %, which reveals a synergistic or cumulative effect between colchicine and the extract compounds. As for the association aqueous extract + quercetin, it showed a lower antiproliferative effect (34.01 ± 4.72 %) which is similar to that of quercetin taken as the second standard (47.02 ± 2.96 %). This shows the antagonistic effect of quercetin. In addition, a combination between the alkaloid (colchicine) and the flavonoid (quercetin) has been realized. This combination showed a high antiproliferative effect (68.19 ± 4.38 %) as well as colchicine. The results obtained during this study show, on the one hand, the potential of the aqueous extract of the leaves of *V. sinuatum* as a source of biomolecules with an antiproliferative effect and, on the other hand, the interest of the combination aqueous extract + quercetin which presents a moderate cytotoxicity.

Keywords: *Verbascum sinuatum* L., aqueous leaf extract, *Saccharomyces cerevisiae*, antiproliferative effect, cytotoxicity.

ملخص

في إطار تطوير طرق علاجية جديدة لمحاربة السرطان، اهتمنا لنبات طبي، البوصير (*Verbascum sinuatum* L.)، الذي حتى الآن لم يتم دراسة قدرته على مكافحة السرطان إلا قليلاً. لذلك قمنا بتقييم النشاط المضاد للتكاثر للمستخلص المائي لأوراق *V. sinuatum* الذي تم اختباره بمفرده ودمجه مع الجزيئات النشطة بيولوجياً: الكولشيسين والكيرسيتين. تم إجراء الاختبار المضاد للتكاثر بطريقة التلوين بأزرق الميثيلين باستخدام خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* كنموذج خلية حقيقية النواة وكذلك الكولشيسين والكيرسيتين كمعايير. المستخلص ومختلف التركيبات المختبرة منعت نمو خلايا الخميرة بإمكانيات سامة مختلفة. تقدر النسبة المئوية للسمية الخلوية للمستخلص المائي لـ *V. sinuatum* بـ $62.37 \pm 1.09\%$ مماثلة لتلك الخاصة بالقلويد، الكولشيسين المأخوذ كمعيار ($61.17 \pm 7.06\%$). أظهر مزيج المستخلص المائي + الكولشيسين نشاطاً أعلى مع نسبة سمية خلوية تقدر بـ $76.08 \pm 2.48\%$ ، مما يكشف عن تأثير تآزري أو تراكمي بين الكولشيسين ومركبات المستخلص. أما بالنسبة للمزيج مستخلص مائي + كيرسيتين، فقد أظهر تأثير مضاد للتكاثر أضعف ($34.01 \pm 4.72\%$) وهو مشابه لتأثير كيرسيتين الذي تم أخذه كمعيار ثان ($47.02 \pm 2.96\%$)، هذا يدل على التأثير العدائي للكيرسيتين. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء مزيج بين القلويد (كولشيسين) والفلافونويد (كيرسيتين). أظهر هذا المزيج تأثيراً مضاداً للتكاثر عالياً ($68.19 \pm 4.38\%$) مماثلاً لتأثير الكولشيسين. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة، من ناحية، إمكانية المستخلص المائي لأوراق نبات *V. sinuatum* كمصدر للجزيئات الحيوية ذات التأثير المضاد للتكاثر، ومن ناحية أخرى، الفائدة من التركيبة مستخلص مائي + كيرسيتين ذات سمية خلوية معتدلة.

الكلمات المفتاحية: *Verbascum sinuatum* L.، مستخلص مائي، *Saccharomyces cerivisiae*، النشاط المضاد للتكاثر، السمية الخلوية.