

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE 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

**Evaluation *in vitro* de l'effet antiprolifératif de l'association des
extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L.
et *Verbascum sinuatum* L.**

Présenté par :

M^{elle} AIT ALI BRAHAM Horia et M^{elle} BOUKHOUFANE Thileli

Soutenu le : 25 Octobre 2020

Devant le jury composé de :

Mme AICHE-IRATNI Ghenima	Maître de conférences B	UMMTO	Présidente
Mr HOUALI Karim	Professeur	UMMTO	Promoteur
Mme OUZID Yasmina	Maître de conférences B	UMBB	Co-promotrice
Mr BARIZ Karim	Maître de conférences B	UMMTO	Examinateur

Année universitaire : 2019-2020

Remerciement

Nous tenons en premier lieu, à remercier Allah le Tout Puissant de nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Dans un premier temps, nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance à Mr. HOUALI KARIM, professeur en microbiologie à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire, de nous avoir fait découvrir ce sujet et d'avoir pu bénéficier de ses qualités pédagogiques.

Nous tenons également à remercier Mme OUZID YASMINA, maître de conférences B à l'UMBB qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, par sa grande patience, par sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Nos remerciements vont également à Mme IRATNI GHENIMA, maître de conférences B à l'UMMTO qui nous a guidées durant la réalisation de ce travail, d'avoir pu bénéficier de ses précieux conseils.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mr BARIZ KARIM, maître de conférences B à l'UMMTO pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Un remerciement chaleureux et sincère à tous membres de l'équipe de laboratoire pédagogique à l'UMMTO, pour l'effort qui ont fourni tout au long du cycle de réalisation de notre projet de fin d'étude.

Enfin, notre reconnaissance s'adresse aussi à tous ce qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A mes parents, pour tous leurs sacrifices et leur soutien
inconditionnel*

A ma sœur SIHAM

A mon frère KAMEL

A mes grands parents

A mes tantes et mes oncles

*A la famille AIT ALI BRAHAM et la famille AIT ALI
BELKACEM*

*A ma binôme Thileli ; je dédie ce travail à toute notre
préparation, les jours et les nuits, nos larmes et nos fous
rire, nos déceptions et nos éclats de joie, A notre belle
amitié, merci lyly*

A tous mes amies, et à tous ce qui m'aiment

*A la mémoire de toutes les victimes du cancer
et du COVID 19.*

HORJA

Dédicaces

Je dédie ce travail à la lumière de mes yeux, le bonheur de ma vie et ma raison d'être, ma chère maman qui m'a apportée son appui durant toutes mes années d'étude

A mon cher papa pour ses encouragements et conseils qui m'ont donnés confiance et courage

A mes sœurs et frères pour leur soutien malgré les distances qui nous séparent

A ma chère grand-mère, que Dieu la garde pour moi

A mes chers neveux et nièces

A ma binôme HORIA, pour toute sa patience, sa douceur, aux jours et les nuits qu'on a passés ensemble en toute fraternité pour réaliser ce travail. Merci ADOUDOU

A toutes mes amies et belles personnes qui me sont chères

A la mémoire de toutes les personnes décédées du cancer.

Thileli

PLAN

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Summary	
Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Présentation des deux plantes	2
1.1. Présentation de l'espèce <i>Peganum harmala</i> L.	2
1.1.1. Description des différentes parties de la plante.....	2
1.1.2. Classification botanique	3
1.1.3. Répartition géographique	3
1.1.4. Usage traditionnel	4
1.1.5. Etude phytochimique.....	5
1.1.6. Les alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i> L.	6
1.2. Présentation de l'espèce <i>Verbascum sinuatum</i> L.	8
1.2.1. Description des différentes parties de la plante.....	8
1.2.2. Classification botanique	9
1.2.3. Répartition géographique du genre <i>Verbascum</i> L. et de l'espèce <i>Verbascum sinuatum</i> L.....	9
1.2.4. Usage traditionnel	10
1.2.5. Etude phytochimique et activités biologiques	13
Chapitre II : Activité antiproliférative des métabolites secondaires.....	14
2.1. Le cycle cellulaire	14
2.2. Les agents interférant avec le fuseau mitotique	16
2.3. Les agents interférant avec l'ADN.....	17
2.4. Les inhibiteurs de tyrosine kinase	18

Chapitre III : Interaction des molécules bioactives en chimiothérapie	20
3.1. Interaction entre les molécules d'origine naturelle	21
3.2. Interaction entre les composés phytochimiques et les médicaments anticancéreux	22
2.3. Interaction des médicaments anticancéreux en chimiothérapie	23
Partie expérimentale	
1. Matériel et Méthodes	24
1.1. Matériel	24
1.1.1 Matériel biologique	24
1.1.2. Réactifs et solvants	24
1.1.3. Matériel de laboratoire	25
1.1.4. Préparation du milieu de culture PDB (Potato-Dextrose-Broth)	25
1.2. Méthodes	26
1.2.1. Préparation des extraits des feuilles de <i>P.harmala</i> L. et de <i>V. sinuatum</i> L.....	26
1.2.2. Evaluation de l'effet antiprolifératif des extraits aqueux des plantes étudiées	28
1.2.2.1. Préparation de l'inoculum de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.2.2.2. Evaluation de la population cellulaire	29
1.2.2.3. Test antiprolifératif.....	29
1.2.2.3.1. Principe du bleu de méthylène	29
1.2.2.3.2. Détermination de la viabilité cellulaire	30
1.2.3. Etude statistique	32
2. Résultats et discussions	33
2.1. Résultats.	33
2.1.1. Observation de la levure <i>saccharomyces cerevisiae</i> sous microscope optique	33
2.1.2. Détermination des pourcentages de cytotoxicité	33
2.2. Discussion	35
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques	40
Annexes	

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

COX-2 : Cyclo-oxygénase-2.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

G1 : Gap1 (intervalle1).

G2 : Gap 2(intervalle).

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor.

MAP : Mitogen activated proteins.

Liste des figures

N°	Intitulé de la figure	Page
1	Aspects morphologiques de <i>Peganum harmala</i> L.	2
2	Les différentes parties de <i>Peganum harmala</i> L.	2
3	Les principaux alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i> L.	6
4	Synthèse des alcaloïdes de <i>P.harmala</i> L.de type β -carboliniques et de la sérotonine à partir du tryptophane.	6
5	Structure générale des quinazolines de <i>Peganum harmala</i> L.	7
6	Aspects morphologiques de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	8
7	Les différentes parties de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	8
8	Les principales cibles des agents anticancéreux.	14
9	Phases et événements majeurs du cycle de division cellulaire.	15
10	Structure de la quercétine.	18
11	Mécanisme de l'activité antioxydante de la quercétine.	19
12	Milieu de culture PDB.	25
13	Extraction aqueuse des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.et de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	26
14	Inoculum de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	27
15	Courbe d'étalonnage [nombre de cellules = f(DO)].	28
16	Protocole expérimental du test antiprolifératif.	30
17	Effet des extraits aqueux testés sur la levure <i>saccharomyces cerevisiae</i> (X400).	32
18	Pourcentage de cytotoxicité des différents extraits.	33

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
I	Les propriétés thérapeutiques de <i>Peganum harmala</i> L.	4
II	Les principaux métabolites secondaires de <i>Peganum harmala</i> L.	5
III	Les propriétés thérapeutiques des différentes parties de <i>Verbascum sinuatum</i> L.	10
IV	Les principaux composés terpéniques de <i>V.sinuatum</i> L. et leurs activités biologiques.	12
V	Quelques exemples de métabolites secondaires isolés à partir du genre <i>Verbascum</i> L.	13
VI	Les différents agents du fuseau et leurs mécanismes d'action.	16
VII	Mécanismes d'action des différents agents intercalants de l'ADN	17
VIII	Interactions potentielles entre les composés phytochimiques	21
IX	Interactions potentielles entre les plantes et les médicaments anticancéreux.	22
X	Interaction des médicaments anticancéreux utilisés en chimiothérapie	23
XI	Réactifs et solvants.	24
XII	Appareillage et autres matériels utilisés.	25
XIII	Comparaison des moyennes des pourcentages de cytotoxicité des différents extraits aqueux des plantes et leurs combinaisons.	34

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source immense de composés bioactifs pourvus de nombreuses activités biologiques (anticancéreuses, antiapoptotiques, antibactériennes...). En revanche, ces molécules chimiques complexes peuvent être à l'origine de plusieurs effets secondaires résultants de la toxicité des plantes médicinales. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet antiprolifératif de l'association des extraits aqueux des feuilles de deux plantes de la flore algérienne : *Verbascum sinuatum* L. et de *Peganum harmala* L. L'effet cytotoxique de ces deux extraits foliaires testés individuellement ou combinés aux standards : colchicine et quercétine (1mg/ml), a été évalué sur la levure de *saccharomyces cerevisiae* par la méthode de coloration au bleu de méthylène où le pourcentage de cytotoxicité a été estimé. En effet, on a constaté que l'exposition des levures à nos associations a provoqué une mort cellulaire importante accompagnée du phénomène de nécrose dans la plupart des associations. Les résultats obtenus révèlent un effet synergique entre l'extrait aqueux de *Verbascum* et la colchicine dont le pourcentage de cytotoxicité est estimé à 76.08 ± 2.48 % d'une part, et un effet antagoniste entre *Verbascum* et la quercétine dont le pourcentage de cytotoxicité est le plus faible (34.01 ± 4.72 %) d'une autre part.

Mots clés : *Peganum harmala* L., *Verbascum sinuatum* L., extrait aqueux, association, effet cytotoxique, *Saccharomyces cerevisiae*.

Summary

Medicinal plants constitute an immense source of bioactive compound endowed with several biological activities (anticancer, antiapoptotic, antibacterial..). On the other hand, these complex chemical molecules can be the origin of several side effects resulting from the toxicity of medicinal plants. It is in this perspective that we are interested in the study of the antiproliferative effect of the aqueous extracts' association of the leaves of two Algerian flora plants : *Peganum harmala* L. and *Verbascum sinuatum* L. The cytotoxic effect of these two leaf extracts tested individually or combined with standards : colchicine and quercetin(1mg/ml), was evaluated on the yeast of *Saccharomyces cerevisiae* by the methylene blue staining method where the percentage of cytotoxicity was estimated. In fact, it was found that exposure of yeast to our associations caused significant cell death accompanied by the phenomenon of necrosis in most associations. . The results obtained reveal a synergistic effect between the aqueous extract of *Verbascum* and colchicine, the percentage of cytotoxicity of which is estimated at $76.08 \pm 2.48\%$ on the one hand, and an antagonistic effect between *Verbascum* and quercetin, the percentage of which cytotoxicity is lower ($34.01 \pm 4.72\%$) on the other hand.

Key words: *Peganum harmala* L., *Verbascum sinuatum* L., aqueous extracts, association, cytotoxic effect, *Saccharomyces cerevisiae*.

الملخص

تشكل النباتات الطبية مصدرا هائلا للمركبات الحيوية التي تتمتع بالعديد من الأنشطة البيولوجية (مضادة للسرطان، مضادة للبكتيريا...) من ناحية أخرى، يمكن أن تكون هذه الجزيئات الكيميائية المعقدة مصدرا للعديد من الآثار الجانبية الناتجة عن سمية النباتات الطبية. من هذا المنظور، نهتم بدراسة التأثير المضاد للتكاثر الخلوي الناتجة عن ترابط المستخلصات المائية للأوراق نباتين من النباتات الجزائرية *Peganum harmala* L. و *Verbascum sinuatum* L. التأثير السام لهذين المستخلصين الورقيين اللذين تم اختبارهما بشكل فردي أو مع المعايير: كولشيسين و كيرسيتين (1مغ/مل)، تم تقييمه على خميرة *Saccharomyces ceivisiae* بطريقة التلوين بالأزرق المثلين حيث تم تقدير نسبة السمية الخلوية. في الواقع، وجد أن تعرض الخمائر لمعظم المستخلصات المركبة تسبب في موت الخلايا بشكل كبير مصحوبا بظاهرة النخر في معظم المركبات. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود تأثير تآزري بين المستخلصات المائية لـ *Verbascum* و كيرسيتين، حيث تقدر نسبة السمية الخلوية بـ $76.08 \pm 2.48\%$ من ناحية، وتأثير مضاد بين *Verbascum* و كيرسيتين، حيث كانت النسبة المئوية الأدنى ($34.01 \pm 4.72\%$) من ناحية أخرى.

الكلمات المفتاحية: *Verbascum sinuatum* L، *Peganum harmala* L، المستخلص المائي، الارتباط، التأثير السام للخلايا، *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction générale

Depuis longtemps, l'homme s'est soigné avec les plantes qu'avait à sa disposition à travers les siècles. Les traditions humaines ont développé la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour améliorer la santé humaine (ISERIN, 2001). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 80% de la population mondiale utilise des herbes comme méthode de soin de santé primaire (BOUSLIMAN *et al.*, 2012 ; AHMED *et al.*, 2012).

Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules chimiques complexes, présentes dans différentes parties de la plante. Ces molécules appelées « métabolites secondaires » sont classées selon leurs structures en plusieurs groupes : les composés phénoliques dont les flavonoïdes, les terpènes et stéroïdes, les composés azotés dont les alcaloïdes. Ces substances bioactives sont essentiellement connues pour leurs nombreuses activités biologiques, parmi lesquelles, l'action antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antimitotique et antiproliférative (KRIEF, 2003).

En revanche, les plantes médicinales peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité (KHATTABI *et al.*, 2010). Il est donc indispensable d'identifier les composés chimiques présents dans ces plantes et de déterminer la dose à respecter lors de leur utilisation afin d'éviter toute atteinte fonctionnelle humaine, car mal dosées, les plantes qui ont le pouvoir de vie, peuvent aussi avoir un pouvoir de mort. En effet, de nombreuses recherches à travers le monde se sont orientées vers l'étude de l'effet de l'association de deux ou plusieurs extraits de plantes afin de remédier au problème de toxicité, améliorer l'efficacité thérapeutique et établir des règles scientifiques pour leur usage (HMAMOUCHE, 1998).

C'est dans ce contexte, que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est l'évaluation de l'activité antiproliférative de l'association d'extraits aqueux de feuilles de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. Cette étude est fournie par le Laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique (LABAB) de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Ce travail s'articule sur deux parties, une partie revue bibliographique rappelant les caractéristiques botaniques des deux plantes ainsi que leurs études phytochimiques. Dans cette partie nous évoquons également la notion de la synergie et son intérêt dans la phytothérapie. Pour ce qui est de la partie expérimentale, nous décrivons la méthodologie suivie, les résultats obtenus ainsi que leurs discussions et comparaisons avec d'autres résultats publiés dans la littérature scientifique.

Partie bibliographique

Chapitre I: Présentation des deux plantes médicinales

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

1.1.1. Description des différentes parties de la plante

Peganum harmala L. est une plante herbacée vivace, glabre, à racine pivotantes, à tiges ordinairement peu rameuses de 30 à 90 cm de haut (Figure1), à odeur forte désagréable qui rappelle celle de la rue (ACHOUR et *al.*, 2012).



Figure 1 : Aspects morphologiques de *Peganum harmala* L.(WECKESSER, 2013).

Les feuilles sont de couleur vert clair, sont allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines (MANSOUR et SOUDABE,2012 ; KEMASSI et *al.* 2013). La plante présente des fleurs blanches sales grandes avec des sépales inégaux persistants qui dépassent la corolle et des pétales blancs jaunâtres à nervures jaunes, oblongs et subsymétriques. Les fleurs sont monoïques dotées de quinze étamines à anthères longues de 8mm à filets très élargis et plats dans leur partie inférieure, et à gynécée de 8-9mm de longueur et des ovaires globuleux de trois loge. Les fruits sont des petites capsules globulaires déprimées au sommet renfermant des graines noires(MAIRE, 1933 ; CHOPRA et *al.*, 1960 ; OZENDA, 1991) (Figure 2).

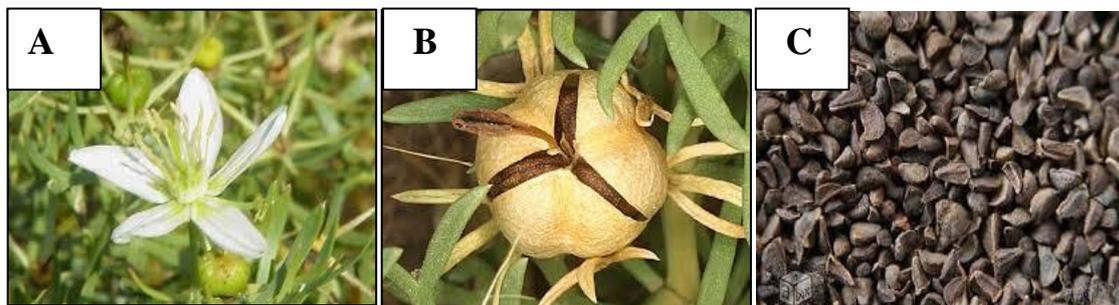


Figure 2 : Les différentes parties de *Peganum harmala* L. (WECKESSER, 2013).

A : fleurs ; B : fruits ; C : grains

1.1.2. Classification botanique

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

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous classe	Malvides
Ordre	Sapindales
Famille	zygophyllaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i> L.

1.1.3. Répartition géographique

Espèce cosmopolite, *Peganum harmala* L. est largement distribuée à travers le monde, généralement dans le nord du continent africain et jusqu'au nord des Indes et en Mandchourie (BRUNETON, 2009). En Algérie, Elle est commune aux hauts plateaux, au Sahara septentrional et méridional et aux montagnes du Sahara central. Elle est réputée pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (OZENDA, 1991).

1.1.4. Usage traditionnel

Peganum harmala L. communément appelée « Harmel », présente un intérêt en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter plusieurs troubles. Ses propriétés thérapeutiques sont consignées dans le tableau I.

Partie bibliographique

Tableau I : Les propriétés thérapeutiques de *Peganum harmala* L.

Types de troubles	Propriétés thérapeutiques	Références bibliographiques
Troubles généraux	Hypnotique, antipyrétique, antalgique et antitussif	(HAMMICHE et al., 2013)
Troubles gynécologiques	Emménagogue, abortif, utilisé contre la stérilité féminine et l'impuissance sexuelle	(GOEL et al., 2009)
Troubles digestifs	Agit contre les coliques, diarrhée infantile du nourrisson	(GOEL et al., 2009)
Troubles cutanés	Antiseptique et cicatrisant, pour traiter des dermatoses (eczéma), des brûlures, conjonctivite purulente et blépharite	(MONSEF et al., 2004)
Troubles infectieux	Antipaludique, anthelminthique, utilisé pour traiter le tétanos néonatal, les oreillons, les conjonctives purulentes et blépharites	(MONSEF et al., 2004)
Autres maladies	Agit contre le diabète, hypertension artérielle, empoisonnement, rhumatisme et problèmes nerveux Peut atténuer les tremblements de la maladie de Parkinson	(ISERIN, 2001)

1.1.5. Etude phytochimique

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (KRIEF, 2003).

Différentes classes de métabolites secondaires ont été mises en évidence chez la plante de *Peganum harmala* L. dont les alcaloïdes représentent les constituants les plus importants. Ces métabolites secondaires ainsi que leurs activités biologiques sont consignés dans le tableau II.

Tableau II : Les principaux métabolites secondaires de *Peganum harmala* L.

Métabolites secondaires	Molécules identifiées	Activités biologiques reconnues	Références bibliographiques
Alcaloïdes	β -carbolines	Antalgique Antioxydante	(FAROUK et al., 2009) (BAGHIANI et al., 2012)
	Quinazolines	Antibactérienne Antiparasitaire Antifongique	(DARABPOUR et al., 2011) (RAHIMI-MOGHADAM et al., 2011) (NENNAH, 2010)
Polyphénols	Flavonoïdes	Rôle « veinoactif »	(BRUNETON, 2009)
	Coumarines	Anti-œdémateuse	
	Quinones	Antibactérienne et antivirale	(SCHWEITZER-STENNER et UVERSKY, 2012)
Saponosides	NI	Antibactérienne et antitumorale	(BRUNETON, 2009)
Caroténoïdes	α -carotène σ -carotène β -carotène	Activité antitumorale	(PICKARD et al., 2009)
Huiles fixes	Terpènes et stérols	Activité contre l'hypertension, le diabète, les anuries	(ASHTON, 2012)

NI : Non identifié

1.1.6. Les alcaloïdes de *Peganum harmala* L.

➤ Les alcaloïdes indoliques

L'espèce *Peganum harmala* L. est très riche en alcaloïdes indoliques de type β -carboliniques. Les plus importants sont l'Harmaline, l'Harmane, l'Harmine, l'Harmalol et Tetrahydroxyharmine (THH) (KARTAL et al., 2003) (Figure3).

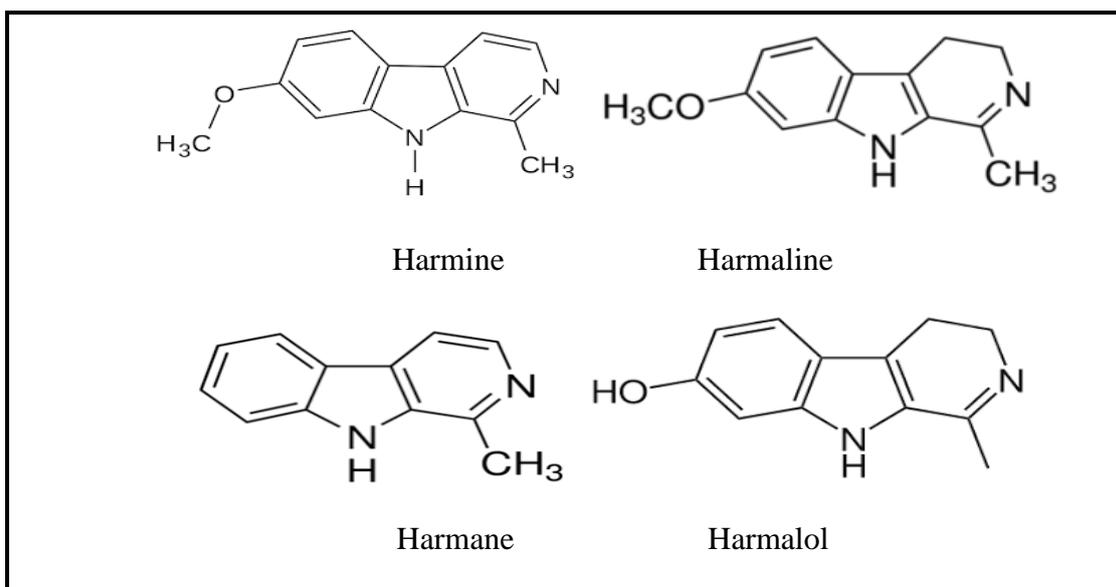


Figure 3 : Les principaux alcaloïdes de *Peganum harmala* L.(MAYAD et al.,2013).

Les β -carbolines sont des dérivés du tryptophane .Elles constituent un ensemble de composés hétérocycliques avec une structure pyrido-indoliques .En effet, le noyau de base comporte un indole accolé à un noyau pyridine(DEWICK, 2002). Les différentes étapes de la biosynthèse des alcaloïdes indoliques sont présentées dans la figure ci-dessous (Figure 4).

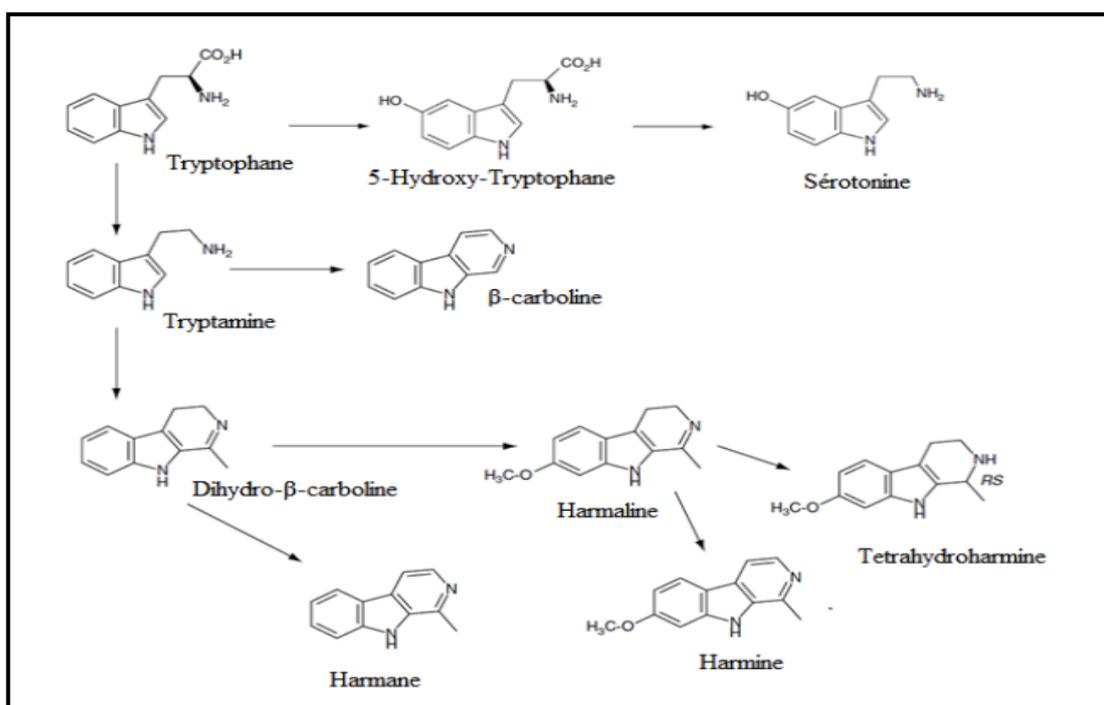


Figure 4 :Synthèse des alcaloïdes de *P.harmala* L.de type β -carboliniques et de la sérotonine à partir du tryptophane (ANISZEWSKI, 2007).

➤ Les quinazolines

Peganum harmala L. contient également une autre classe d'alcaloïdes, les quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique et qui sont représentés par la Péganine et le Vasicinone (Figure 5) et la désoxypéganine (KHASHIMOV et *al.*, 1970 ; ZHAREKEEV et *al.*, 1974).

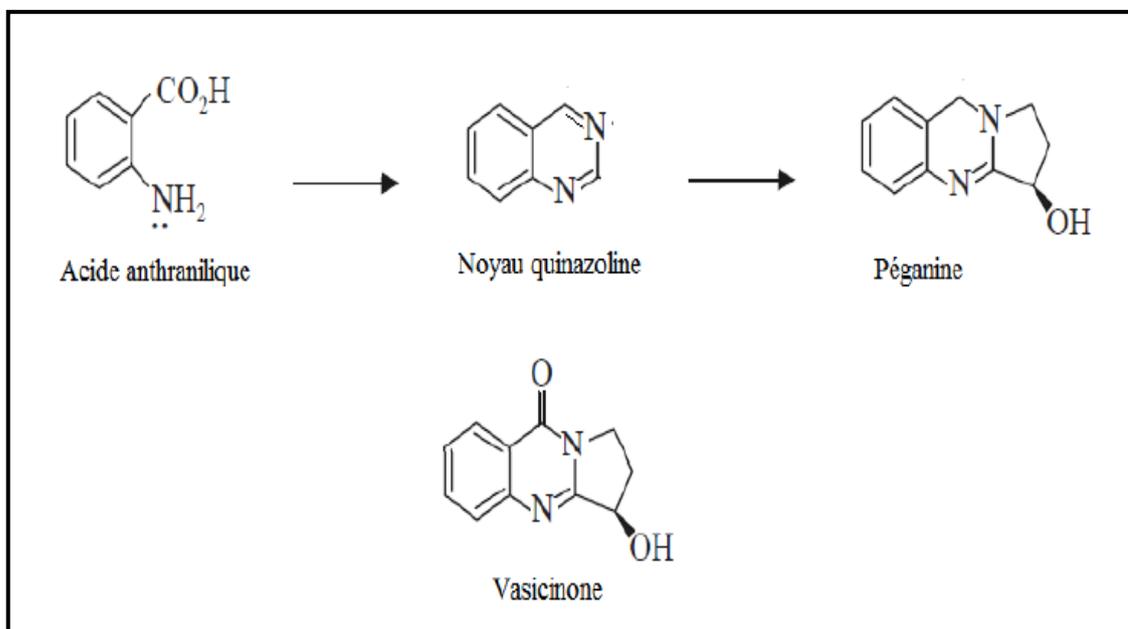


Figure 5 : Structure générale des quinazolines de *Peganum harmala L.* (ANISZEWSKI, 2007).

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

1.2.1. Description des différentes parties de la plante

L'espèce *Verbascum sinuatum* L. communément appelée « molène à feuilles sinuées » est une plante herbacée ,bisannuelle hémicryptophyte qui peut atteindre 2 m de hauteur (MOSSERAY, 1935)(Figure 6).



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

Le terme « *Verbascum* » vient de *Barbascum* et signifie barbu en référence au fait que la plante est couverte d'un duvet cotonneux et que les étamines soient barbues (ALIPIEVA et al., 2014). « *Sinuatum* » décrit les feuilles de la rosette qui sont dentées et ondulées (REMAL, 2014). Les fleurs sont jaunes soufres avec des étamines violettes. Elles sont groupées par 2 à 5 en glomérules espacés, elles sont solitaires, apicales avec un pédoncule court. Le fruit est une capsule portant plusieurs graines (MOSSERAY, 1935) (Figure 7). La floraison se fait en Mai et en Août (DANE et YILMAZ, 2009 ; REMAL, 2014).

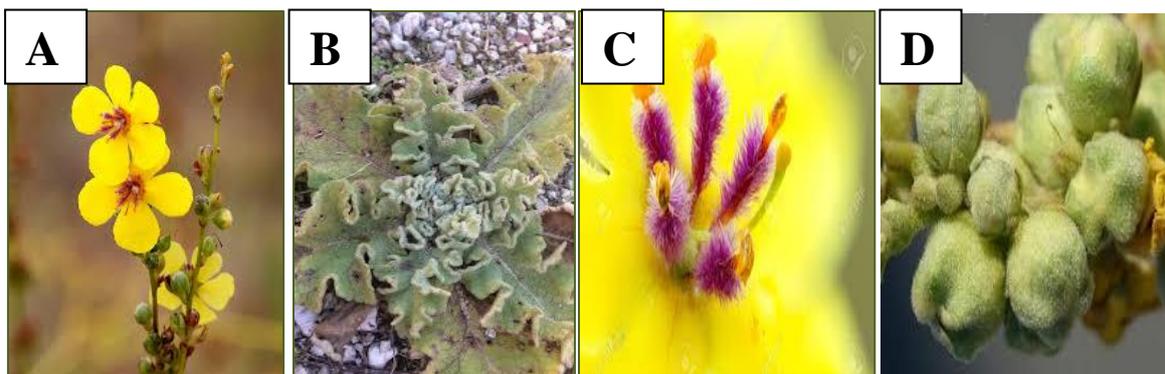


Figure 7 : Les différentes parties de *Verbascum sinuatum* L.(DANE et YILMAZ, 2009 ; JARADAT et al., 2015).

A :Fleurs B :Feuilles C : Etamines D : Fruits

1.2.2. Classification botanique

La classification botanique de l'espèce *Verbascum sinuatum* L. est donnée ci-dessous selon STOODEH (2015).

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

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

La plupart des espèces de *Verbascum* ont une aire de distribution très restreinte et sont majoritairement endémiques. On trouve cependant des espèces à large distribution naturellement présentes sur trois continents comme *Verbascum sinuatum* L. qui est présente en Turquie, en Europe et en Afrique du nord. Elle est très commune dans le Tell algérien (REMAL, 2014). Elle se rencontre particulièrement dans la région méditerranéenne et les terrains chauds, secs et bien exposés au soleil (DUBOCHET, 1850 ; GUY, 2012).

1.2.4. Usage traditionnel

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

Partie bibliographique

Tableau III : Les propriétés thérapeutiques des différentes parties de *Verbascum sinuatum* L.

Partie de la plante	Propriétés thérapeutiques	Références bibliographiques
Feuilles	Usage externe, contre les boutons et comme anti-vermine Soulagement des douleurs rhumatismales et sciatiques	(BELLAKHDAR, 1997) (MEDDOUR, 2009)
Racines et fleurs	Action sur les maladies oculaires Activités antiseptiques, antispasmodiques et analgésiques Action sur les troubles hépatiques	(MEDDOUR, 2009) (WIHELMINA <i>et al.</i> , 1999)
Huiles essentielles	Action sur les affections bactériennes, pulmonaires, gastriques et dermatologiques	(SENER et DULGER, 2009)

1.2.5. Etude phytochimique et activités biologiques reconnues

Il est connu que les plantes médicinales possèdent des métabolites secondaires, considérés comme éléments essentiels de la coévolution de la plante avec les organismes vivants (SENATORE *et al.*, 2007).

Les espèces du genre *Verbascum* ont été largement étudiées, révélant ainsi la présence de huit principaux groupes phytochimiques, tels que les saponines, les iridoïdes, les glucosides monoterpéniques, les flavonoïdes, les stéroïdes, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les acides gras et autres composés. Il ressort des études faites sur ces espèces que les composés terpéniques dont les iridoïdes et les saponosides sont les principaux métabolites secondaires du genre *Verbascum* L. (BIANCO *et al.*, 1980).

1.2.5.1. Les composés terpéniques

➤ Les saponosides

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez le genre *Verbascum* L. Elles doivent leur nom au fait qu'elles possèdent des propriétés moussantes (DEWICK, 2002). Des études phytochimiques portant sur les parties aériennes de *V. sinuatum* L. ont aboutit à l'isolement de quelques saponosides dont la verbascosaponine et l'oléanane y sont majoritairement présents (SENATORE et *al.*, 2007).

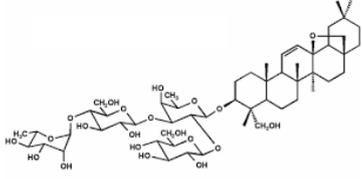
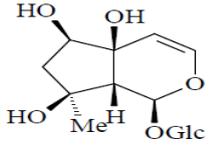
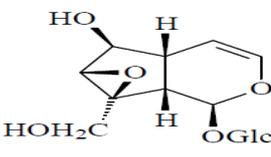
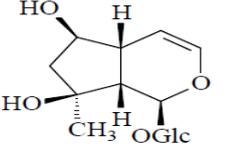
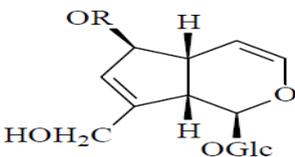
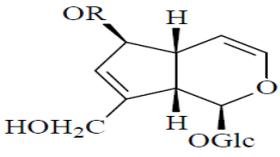
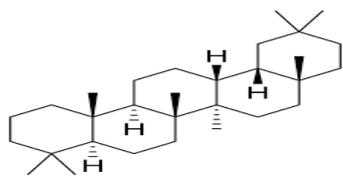
➤ Les iridoïdes

Les iridoïdes sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopenta [C] pyranique nommé « iridane » (EVAN, 2002). Ces composés ont une importance chimio-taxonomique et biogénétique certaine, du fait qu'ils constituent des intermédiaires importants dans la biosynthèse de nombreux alcaloïdes.

Bianco, dans ses recherches systématiques des iridoïdes des plantes Scrophulariaceae, a montré que le genre *Verbascum* est en général riche en iridoïdes susceptibles d'être glycosilés par l'acide cinnamique et ses dérivés, engendrant ainsi une grande variété de structures tels que l'aucubine, catalpol, ajugol, sinuatol (BIANCO et *al.*, 1980, 1981). Ces différents composés ainsi que leurs structures chimiques sont présentés dans le tableau suivant IV.

Partie bibliographique

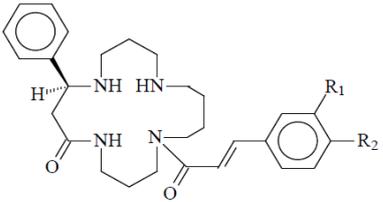
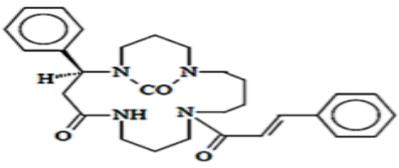
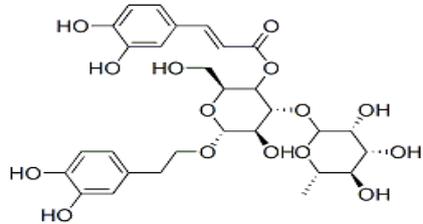
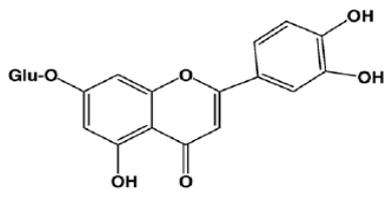
Tableau IV : Les principaux composés terpéniques de *V.sinuatum* L. et leurs activités biologiques.

Les composés terpéniques	Structures chimiques	Activités biologiques	Références bibliographiques
Verbascosaponine		anticancéreuse et anti-leischmanique	(SENATORE et al., 2007)
Harpagide		Antitumorale	(BIANCO, 1980, 1981) (ZHOU, 2007)
Catalpol		Antioxydante et anti-inflammatoire Neuroprotectrice	(TATLI et al., 2007), (BAS et al., 2007) (SUN et al., 2012)
Ajugol		Antinocéptive	(KUPELI et al., 2003) (TATLI et al., 2006)
Sinuatol	 R=Rhamnose	Antiallergique	(BARROS et al., 2011) (TATLI et al., 2006)
Aucubine	 R=H	Immuno-stimulante Anti-inflammatoire	(MATHAD et al., 1998 ; TATLI et al., 2006)
Oléanane		Antiproliférative Anti-inflammatoire	(COREA, 2005)

1.2.5.2. Autres composés

Diverses autres classes de composés ont été identifiées chez le genre *Verbascum* et sont recensées dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : Quelques exemples de métabolites secondaire isolés à partir du genre *Verbascum* L.

Types des composés	Structures chimiques	Activités biologiques	Références bibliographiques
Alcaloïdes	 <p>R1=H, R2=H Verbacine R1=OCH₃, R2=OCH₃ Verbasitrine</p>  <p>Verballoscénine</p>	Antihelminthique	(KOZAN <i>et al.</i> , 2011)
Composés phénoliques	 <p>Verbacoside</p>	Neuroprotectrice Antioxydante Antiproliférative et anti-métastatique Anti-inflammatoire Antibactérienne	(TATLI <i>et al.</i> , 2015) (KORKINA, 2007) (PAPOUTSI <i>et al.</i> , 2006). (LEE <i>et al.</i> , 2006a). (HOFFMAN, 1988)
	 <p>Luteoline 7-O-β-D-glucoside</p>	Anti-inflammatoire Antiallergique Hépto-protecteur antivirale Antiamnésique	(BRUNETON, 1999) (SENATORE, 2007) (LIU <i>et al.</i> , 2009).

Chapitre II : Activité antiproliférative des métabolites secondaires

Certains métabolites secondaires sont capables à faibles concentrations d’inhiber la prolifération des cellules cancéreuses par interaction avec une ou plusieurs cibles pharmacologiques. Une des principales cibles des traitements anticancéreux est l’ADN .Les autres anticancéreux sont les molécules qui perturbent le fuseau mitotique et empêchent la division cellulaire (Figure 8) (PASQUET, 2011).

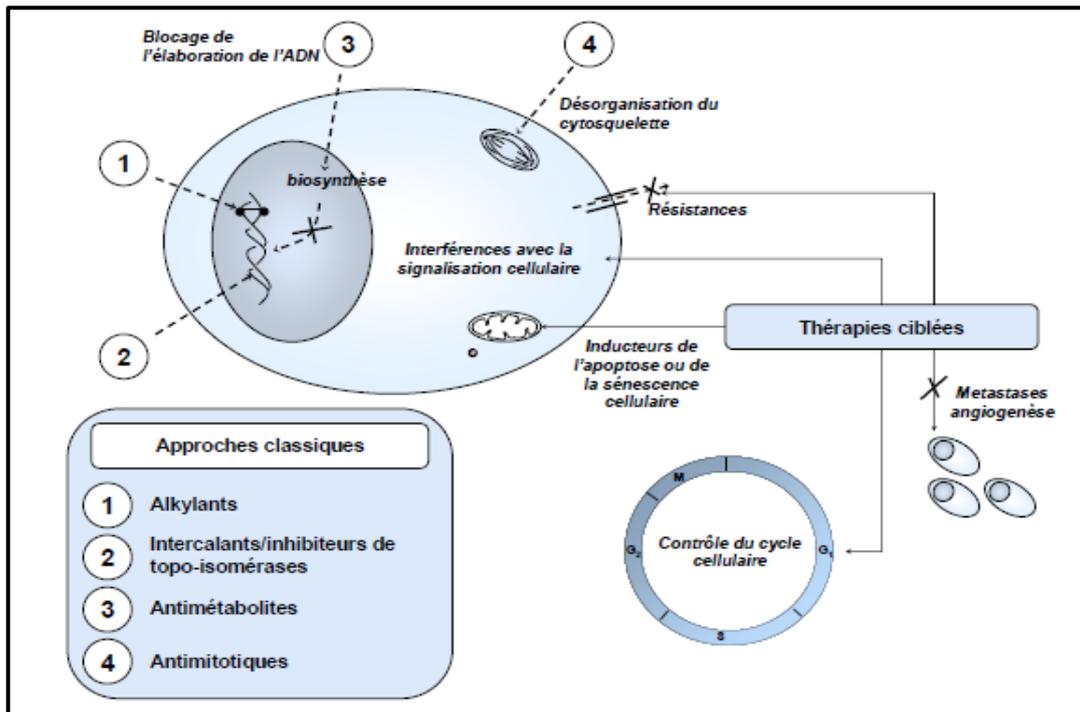


Figure 8 : Les principales cibles des agents anticancéreux (PASQUET, 2011).

2.1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire comprend la succession des événements qui conduisent à la formation de deux cellules filles à partir d’une cellule mère, événements qui se distribuent en une phase G1, post-mitotique, préparatrice à la phase S au cours de laquelle l’ADN est répliqué. La phase G2 précède la phase M ou mitose, au cours de laquelle les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules filles, grâce au fuseau de division. Cette phase M est découpée en cinq périodes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l’anaphase et la télophase. La cytokinèse achève la division de la cellule. Lorsque les cellules cessent toute prolifération sous l’effet de signaux antimitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire et retournent en phase de quiescence (DIALLO et PRIGENT, 2011 ; LEVY et al., 2011) (Figure 9).

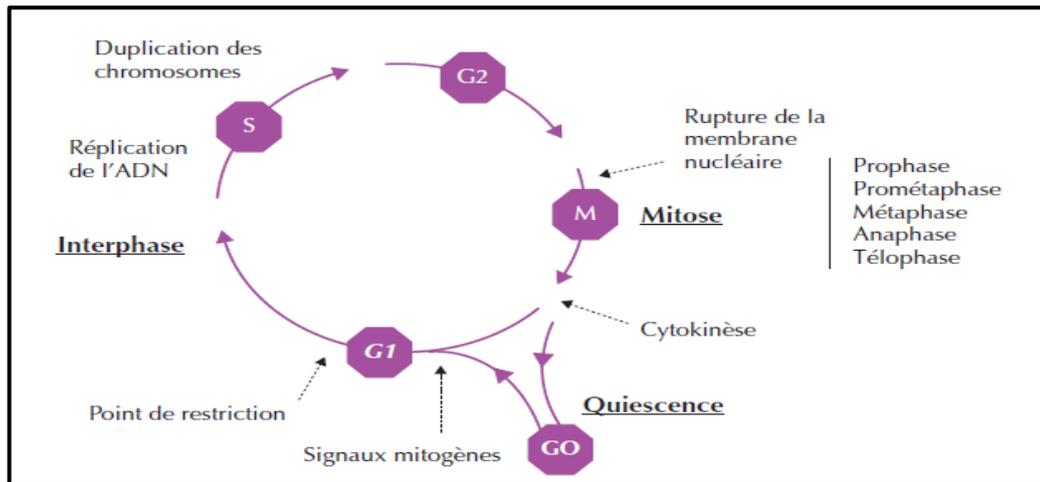


Figure 9 : Phases et événements majeurs du cycle de division cellulaire (MEIJER, 2006).

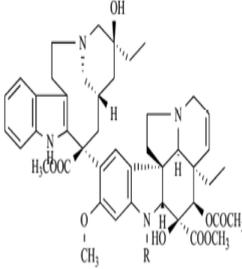
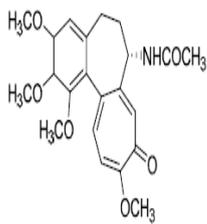
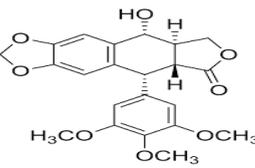
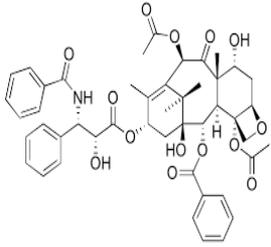
La découverte de la mitose a permis de découvrir un nombre toujours croissant de nouvelles protéines qui orchestrent et coordonnent la formation du fuseau et la dynamique des chromosomes lors de la mitose. Les succès cliniques observés avec les médicaments ciblant les microtubules comme les taxanes et les alcaloïdes de la pervenche ont également favorisé le développement de médicaments anticancéreux qui visent spécifiquement la mitose. L'attention accrue à la mitose comme cible thérapeutique a également soulevé une question importante au sujet des déterminants cellulaires qui spécifient la sensibilité aux médicaments (LEVY et *al.*, 2011).

2.2. Les agents interférant avec le fuseau mitotique

Les agents du fuseau interagissent avec le cytosquelette cellulaire. Ces puissants composés agissent sur les fuseaux de microtubules, issus de la polymérisation de tubulines, en empêchant soit leur construction ayant pour conséquence le blocage de la cellule en métaphase prolongée, soit leur déconstruction. Il s'agit respectivement de poisons et de stabilisants du fuseau (VUILLET-A-CILES et *al.*, 2014). Ces différents agents fusionaux ainsi que leurs mécanismes d'action sont consignés dans le tableau VI.

Partie bibliographique

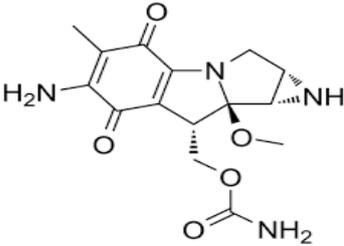
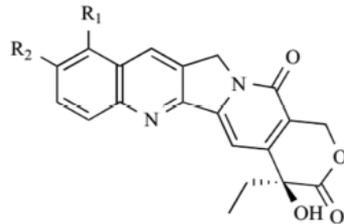
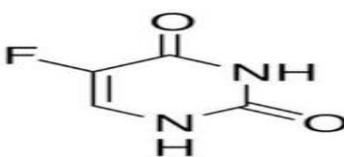
Tableau VI : Les différents agents du fuseau et leurs mécanismes d'action.

Les agents du fuseau	Structure chimique	Mécanisme d'action	Références bibliographiques
Les poisons du fuseau	<p style="text-align: center;">Les vinca-alcaloïdes</p>  <p style="text-align: center;">R=CH₃ Vinblastine R=CHO Vincristine</p>	<p>Inhibition de la polymérisation de la tubuline β de façon directe et réversible ayant pour conséquence la diminution du flux sanguin antitumoral</p>	<p>(PEREZ et <i>al.</i>, 2002) (WANG et <i>al.</i>, 2010)</p>
	<p style="text-align: center;">La colchicine</p> 	<p>Fixation de façon irréversible à l'interface de l'hétérodimère α et β</p> <p>Inhibition du contact latéral entre les protofilaments des microtubules</p>	<p>(AMOS, 2004) (ROGALSKA et <i>al.</i>, 2015)</p>
	<p style="text-align: center;">Les podophyllotoxines</p> 	<p>Fixation sur l'hétérodimère α et β et inhibition des topoisomérases I et II, impliquées dans la synthèse et la réplication de l'ADN</p>	<p>(HANDE, 1998) (IMBERT, 1998)</p>
<p style="text-align: center;">Les stabilisants du fuseau</p>	<p style="text-align: center;">Le taxol</p> 	<p>Fixation dans une poche de la β tubuline par une liaison située sur la face interne des microtubules promouvant ainsi leur formation</p>	<p>(NOGALES et <i>al.</i>, 1999) (AMOS, 2004)</p>

2.3. Les agents interférant avec l'ADN

Sachant que la majorité des cellules tumorales se multiplient plus rapidement que les cellules saines. Les molécules impliquées directement ou indirectement dans les mécanismes de prolifération cellulaire, et plus particulièrement l'ADN nucléaire et les protéines nucléaires associées, représentent de multiples cibles privilégiées des traitements antitumoraux classiques (LENGLET, 2010). Les différentes molécules ciblant l'ADN ainsi que leurs mécanismes d'action sont recensés dans le tableau VII.

Tableau VII : Mécanisme d'action des différents agents intercalants de l'ADN.

Les agents ciblant l'ADN	Structure chimique	Mécanisme d'action	Références bibliographiques
Les alkylants	 <p>Mitomycine C</p>	Fixation des groupements alkyles (R-CH ₂) sur deux sites nucléiques proches pour créer des ponts dans les chaînes de l'ADN induisant des lésions complexes, ce qui provoque l'arrêt de la mitose et de la synthèse protéique des cellules cancéreuses	(COUDERT, 2018) (VUILLET-A-CILES <i>et al.</i> , 2014)
Les inhibiteurs des topoisomérases I et II	 <p>R₁=R₂=H Camptothécine</p>	Inhibition de la reconstitution de l'ADN après formation de complexes de clivage, aboutissant à l'arrêt de la réplication et l'apoptose cellulaire	(DUMONTET, 2011) (COUDERT, 2018)
Les antimétabolites	 <p>Le 5-fluorouracile</p>	Inhibition de la thymidylate synthétase de façon irréversible par Le 5-fluorouracile, engendrant une carence en thymine, arrêtant ainsi la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales	(PASQUET, 2011) (COUDERT, 2018)

2.4. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Il y a plusieurs raisons pour vouloir inhiber les protéines kinases du cycle pour lutter contre le cancer. La première est bien évidemment que toute activité indispensable à la progression du cycle cellulaire, et donc à la prolifération, est une cible ; inhiber cette activité, c'est arrêter la prolifération (DIALLO et PRIGENT, 2011).

Le site catalytique de la kinase constitue la cible principale (NOBLE et *al.*, 2004). Ces molécules ont en commun, un mécanisme d'action compétitif avec l'ATP au niveau de sa poche de liaison et une interaction avec la kinase par liaisons hydrophobes et ponts hydrogènes. Une inhibition de ces kinases dans ce cas précis permet de rétablir une sensibilité aux traitements anticancéreux (DIALLO et PRIGENT, 2011).

Parmi ces inhibiteurs, on distingue :

➤ la quercétine

La quercétine est l'un des flavonols largement répandus dans les végétaux, particulièrement dans les parties aériennes du genre *Verbascum*. C'est une molécule présente sous forme libre ou conjuguée avec des capacités antioxydantes et anti-inflammatoires (BOOTS et *al.*, 2008) (Figure 10).

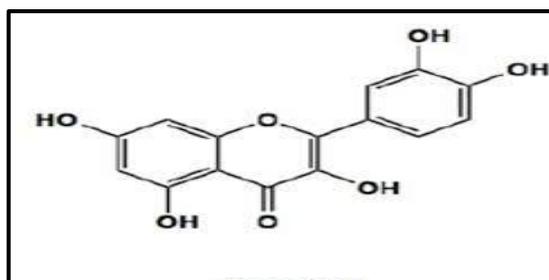


Figure 10 : Structure de la quercétine (COLOUNGA BIANCATELLI et *al.*, 2020).

L'inhibition de la tyrosine kinase par la quercétine s'exerce directement en introduisant un composé semblable à l'ATP au niveau du site de phosphorylation de cette dernière, ou en agissant en synergie avec différents médicaments anticancéreux bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire (MEIJER et *al.*, 2001 ; PUOCI et *al.*, 2012). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont permis de montrer le potentiel anti-cancérigène de la quercétine, qui a été attribué à différents mécanismes incluant l'activité antioxydante, l'inhibition d'enzymes activant des substances cancérogènes, la modification des voies de transduction de signaux et les interactions avec des récepteurs et autres protéines (CHEN et *al.*, 2010).

D'autres propriétés thérapeutiques ont été également attribuées à la quercétine, à savoir les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et les propriétés antivirales.

- **Les propriétés antioxydantes**

D'après HALLIWELL, un antioxydant est une substance qui lorsqu'elle est présente en faible concentration, comparée à celle d'un substrat oxydable, empêche ou réduit considérablement l'oxydation de ce substrat (HALLIWELL, 1995). En effet, la quercétine possède un puissant pouvoir antioxydant par sa capacité à piéger directement les radicaux libres, à chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EROs *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss, à inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et à activer les enzymes antioxydantes (Figure 11).

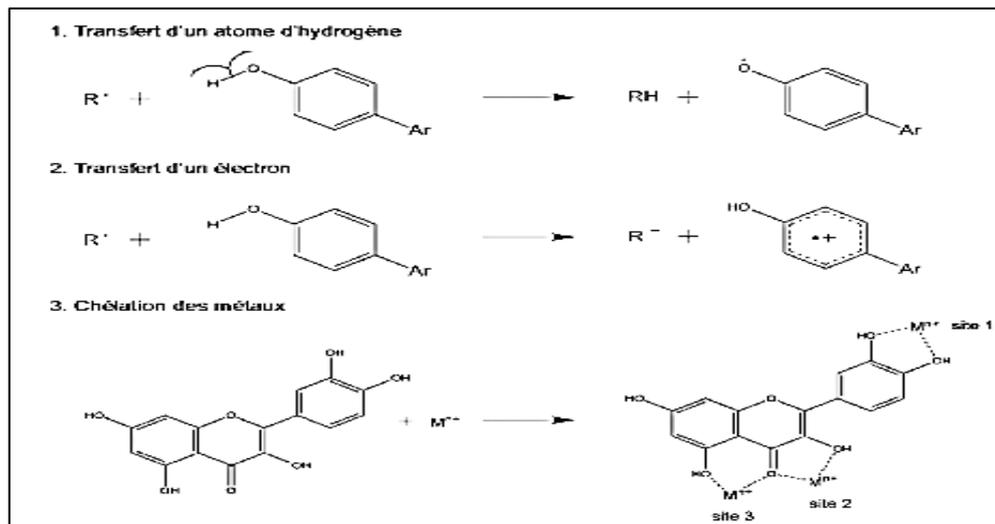


Figure 11 : Mécanisme de l'activité antioxydante de la quercétine (BIDOUIL, 2012).

- **Les propriétés anti-inflammatoires**

La quercétine possède de fortes propriétés anti-inflammatoires. Sa capacité à atténuer l'inflammation réside dans la désactivation des espèces réactives nocives générées par le stress oxydatif (HALLIWELL, 2011). Ce flavonol est indiqué dans toutes les situations inflammatoires parce qu'il inhibe la formation des médiateurs de l'inflammation, en diminuant la formation et la libération des prostaglandines pro-inflammatoires et des thromboxanes, tout en ralentissant les substances réactives de l'anaphylaxie, un déclencheur clé de l'asthme (BOOTS *et al.*, 2008).

- **Les propriétés antivirales**

Les propriétés antivirales de la quercétine sont étroitement liées à son activité antioxydante. Des études récentes ont montré que l'association de la quercétine avec la vitamine C renforce la réduction de la quercétine oxydée, permettant ainsi d'exercer une action antivirale synergique pour le traitement des infections des voies respiratoires notamment celles qui sont causées par COVID 19 (COLOUNGA BIANCATELLI *et al.*, 2020).

Chapitre III : Interaction des molécules bioactives en chimiothérapie

Le cancer reste l'un des grands défis de notre époque. Si les traitements ont fait de gros progrès et si la fréquence de certains cancers a tendance à diminuer, d'autres sont en augmentation constante (FAURE, 2008). Les lignes classiques de traitements antitumoraux sont représentées par la chirurgie et la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie qui est la base de nombreux travaux de recherche du laboratoire (LENGLET, 2010).

Actuellement le but de la chimiothérapie anticancéreuse est une thérapie antiproliférative et/ou pro-apoptotique. Les traitements actuels échouent souvent parce qu'ils entraînent d'importants effets secondaires qui limitent les doses administrables. Une autre faiblesse fondamentale de la chimiothérapie est la capacité des cellules tumorales à développer une résistance aux agents antitumoraux par activation des voies de survie. Afin d'augmenter l'efficacité du traitement, les agents cytotoxiques peuvent être associés dans le cadre d'un protocole de polychimiothérapie. L'utilisation simultanée de plusieurs médicaments repose sur la recherche d'un meilleur indice thérapeutique basée sur l'utilisation de molécules ayant des mécanismes d'action différents (KARACETIN *et al.*, 2009).

En effet, Il existe une offre pléthorique de médecines complémentaires et alternatives pour les malades atteints du cancer, et les plantes médicinales y occupent une place certaine. Elles sont principalement utilisées dans le but de réduire les effets indésirables des traitements anticancéreux et pour leurs propriétés anticancéreuses propres (HUET, 2013).

3.1. Interaction entre les molécules d'origine naturelle

Les plantes médicinales contiennent une grande diversité de métabolites secondaires et cette diversité présuppose une forte probabilité d'interactions agissant par divers mécanismes originaux et multicibles (BIAVATTI, 2009).

Les composés naturels provenant des plantes thérapeutiques pourraient être utilisés à la fois en prévention et traitement du cancer car ils agissent pléiotropiquement sur les cellules cancéreuses. Il existe un nombre croissant de preuves sur les activités chimiopréventives plus fortes des combinaisons de composés phytochimiques que dans le cas de composés individuels (LEWANDOWSKA *et al.*, 2014). Ces différentes interactions sont recensées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Interactions potentielles entre les composés phytochimiques.

Type d'interaction	Effets anticancéreux	Références bibliographiques
Acide <i>p</i> -coumarique et acide syringique	Potentialisation des propriétés antioxydantes grâce à l'augmentation de la capacité d'inhibition des radicaux DPPH [°] et ABTS ^{°+}	(GUO <i>et al.</i> , 2018)
Quercétine et acide ellagique	Réduction de la prolifération cellulaire de manière synergique et déclenchement de l'apoptose de leucémie	(MAJUMDAR <i>et al.</i> , 2009)
Digitonine et harmine	Augmentation de la cytotoxicité dans les lignées cellulaires cancéreuses de manière synergique	(YAHIA EID <i>et al.</i> , 2012)
Resveratrol et acide ellagique	Inhibition efficace de la tumorigenèse Effet synergique contre l'hyperplasie épidermique	(MERTENS-TALCOTT <i>et PERCIVAL</i> , 2003)
Epigallocatechine-gallate et épicatechine	Inhibition de la croissance des cellules HT2 du cancer du colon	(MORRE <i>et al.</i> , 2003)
Curcumine et resveratrol	Inhibition de la prolifération des cellules tumorales du colon	(MAJUMDAR <i>et al.</i> , 2009)

3.2. Interaction entre les plantes médicinales et les médicaments anticancéreux

Malgré des progrès constants, les thérapeutiques anticancéreuses sont responsables de nombreux effets indésirables qui réduisent la qualité de vie des malades. A partir des indications traditionnelles et des études pharmacologiques ou cliniques dans d'autres syndromes ou pathologies, il est possible d'envisager des interactions d'ordre pharmacocinétique et pharmacodynamique entre les plantes médicinales et les thérapeutiques anticancéreuses (HUET, 2013).

Une idée courante est que des antioxydants pourraient limiter la toxicité des chimiothérapies en réduisant leurs atteintes sur les cellules saines. Ils pourraient cependant jouer un rôle antagoniste vis-à-vis de l'effet thérapeutique anticancéreux recherché (LAWANDA *et al.*, 2008; WANG *et YI*, 2008). Les interactions anticancéreuses entre les médicaments chimiothérapeutiques et les composés bioactifs sont élucidées dans le tableau IX.

Partie bibliographique

Tableau IX : Interactions potentielles entre les plantes et les médicaments anticancéreux.

Molécules naturelles	Médicaments anticancéreux	Effet anticancéreux	Références bibliographiques
Antioxydants du thé vert (<i>Camellia sinensis</i>)	Doxorubicine, ifosfamide	La théanine atténue les effets indésirables de la doxorubicine, en augmentant les niveaux de glutamate et de glutathion	SUGIYAMA et al., 2004)
	Gemcitabine, oxaliplatine	Les polyphénols du thé vert sensibilisent les cellules de cholangiocarcinome au traitement par gemcitabine <i>in vitro</i>	(LANG et al., 2009)
Quercétine	Doxorubicine	Intensification de l'action de doxorubicine et réduction de ses effets secondaires	(ZANINI et al., 2007)
Genisteine	Cisplatine	Réduction de la prolifération des cellules de carcinome pancréatique et induction de leurs apoptose La genisteine présente des propriétés protectrices des cellules de la moelle osseuse contre la clastogénèse et l'apoptose induites par le cisplatine	(SHARMA et al., 2007)
Curcumine	5-fluorouracile	Inhibition de la croissance des cellules du cancer du colon et réduction de l'expression du COX2	(DU et al., 2006)
Resveratrol	Cisplatine	Diminution du degré de peroxydation lipidique Agent préventif contre la cardiotoxicité induite par le cisplatine	(DO AMARAL et al., 2008 ; WANG et al., 2009)
Vitamine C	Gemcitabine, oxaliplatine	La vitamine C diminue la cytotoxicité des sels de platine <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> en stabilisant le potentiel membranaire mitochondrial	(HEANY et al., 2008)

2.3. Interaction des médicaments anticancéreux en chimiothérapie

La toxicité des chimiothérapies est une composante importante dans la prise en charge des patients cancéreux. Depuis quelques années, de nouvelles molécules sans activité anticancéreuse propre appelées « chimioprotecteurs » ont été développées pour diminuer la toxicité ou augmenter l'efficacité des chimiothérapies. Parmi les médicaments utilisés contre la toxicité des agents anticancéreux, deux classes peuvent être identifiées : les chimioprotecteurs qui interagissent par une inhibition spécifique du mécanisme d'action de la chimiothérapie sur les cellules saines, et les chimiocorrecteurs qui accélèrent la reconstitution des cellules normales après exposition aux chimiothérapies (RAYMOND, 1996). Les mécanismes d'action d'interaction des différents chimioprotecteurs avec la chimiothérapie sont consignés dans le tableau X.

Tableau X : Interaction des médicaments anticancéreux utilisés en chimiothérapie.

Molécules utilisées en chimiothérapie	Agents chimioprotecteurs associés	Effets anticancéreux	Références bibliographiques
Cisplatine	Amifostine	Rôle protecteur sur la toxicité médullaire de la chimiothérapie	(MEHTA <i>et al.</i> , 1993)
		Amélioration de la tolérance rénale	WADLER <i>et al.</i> , 1993)
Mitomycine C		Réduction de la sévérité des thrombopénies induites par la mitomycine C dans le cas du cancer colique	(RAYMOND, 1996)
5-FU et cisplatine	Docétaxel	Gain de survie et inhibition de la progression tumorale du cancer de la tête et du cou	(CALDERON <i>et al.</i> , 2016)
		Préservation des organes avec une toxicité acceptable	
Paclitaxel	Pembrolizumab	Résultats prometteurs chez les patients atteints du cancer bronchique	(SPIGEL <i>et al.</i> , 2015)
		Diminution des lésions cibles et amélioration de la survie des cellules pulmonaires sans progression tumorale	(ZAPATA <i>et al.</i> , 2016)
Trastuzumab	Docétaxel	Inhibition de la prolifération des lignées cellulaires mammaires surexprimant le gène HER2 impliqué dans la tumorigenèse	(BELKACEMI <i>et al.</i> , 2007)

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Matériel et Méthodes

De nombreuses plantes utilisées traditionnellement démontrent des effets pharmacologiques significativement meilleurs lorsqu'elles sont combinées que lorsqu'elles sont utilisées seules. Cependant, le mécanisme de cette synergie est encore mal connu.

Dans cette étude, nous nous intéressons à évaluer l'effet antiprolifératif de l'association des extraits aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. et de *Peganum harmala* L., en utilisant la levure *saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote.

1.1. Matériel

1.1.1 Matériel biologique

Des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L. ont été récoltées au mois d'Avril et Mai 2019 respectivement. L'échantillonnage a été effectué au sud de la wilaya de Laghouat, plus exactement dans la région de Timizert pour *Peganum harmala* L. tandis que les feuilles de *Verbascum sinuatum* L. ont été récoltées dans la région d'Adekar Assif El Hemmam à Bejaia.

Les feuilles des deux plantes ont été ensuite nettoyées, séchées puis broyées. La poudre est maintenue à température ambiante pour un usage ultérieur.

1.1.2. Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants utilisés lors de notre étude sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau XI : Réactifs et solvants.

Composés	Concentrations	Fonctions
Colchicine	1mg/ ml	Témoin positif
Quercétine		
Bleu de méthylène	0.1%	Coloration et visualisation des cellules
Eau distillée	/	Témoin négatif

Partie expérimentale

1 .1.3.Matériel de laboratoire

Tableau XII : Appareillage et autres matériels utilisés.

Appareillages	Verrerie	Autres matériels
Lyophilisateur Etuve Autoclave Four Pasteur Microscope optique Spectrophotomètre Centrifugeuse	Erlenmeyer Becher Entonnoir Fiole jaugée Epruvette	Filtre Papier Wattman Pipette Lames et lamelles Cellule de Malassez

1 .1.4. Préparation du milieu de culture PDB (Potato-Dextrose-Broth)

Le milieu de culture PDB (Figure 12) est préparé à base de pomme de terre et de glucose qui constituent la source de carbone nécessaire pour la croissance de la levure *saccharomyces cerevisiae*. Le protocole suivi pour préparer le milieu PDB est élucidé comme suit :

- mettre à cuir 100g de pomme de terre coupée en tranches dans 100 ml d'eau distillée pendant 10 à 15 min ;
- après cuisson, on filtre le bouillon de pomme de terre à l'aide d'une passoire et d'une gaze ;
- Le filtrat est récupéré est mis dans un erlenmeyer, y rajouter 10g de glucose;
- ajuster le mélange à 500 ml avec de l'eau distillée, puis l'homogénéiser et le chauffer sur une plaque chauffante ;
- répartir le volume final de PDB dans des flacons stériles;
- autoclaver le milieu de culture à 120°C pendant 20 min ;
- conserver le milieu au réfrigérateur.

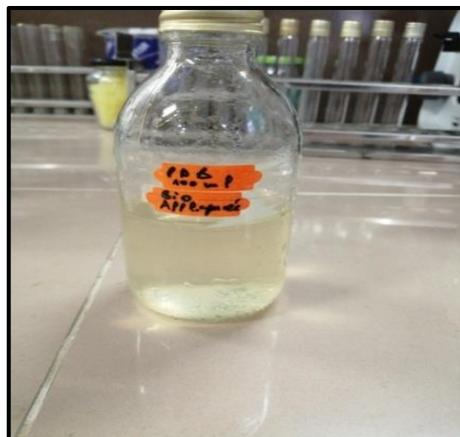


Figure 12 : Milieu de culture PDB.

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des extraits aqueux des feuilles de *P.harmala* L. et de *V. sinuatum* L.

Pour préparer les extraits aqueux de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L., on pèse 10 gde poudre des feuilles de chaque plante, les solubiliser dans 100ml de l'eau distillée pour *Peganum* et 200ml de l'eau distillée pour *Verbascum*. Après incubation de ces deux mélanges à température ambiante pendant 24h, les macérâts sont ensuite filtrés à l'aide d'une passoire et du papier Wattman. L'extrait aqueux de *Verbascum* obtenu est directement porté à congélation à -80°C tandis que celui de *Peganum* devrait tout d'abord être centrifugé deux fois (3000g/10min) pour que le surnageant obtenu puisse être ensuite congelé à la même température.

Après congélation, les deux extraits sont lyophilisés pendant 5h, puis conservés à 4°C (Figure 13).

Partie expérimentale

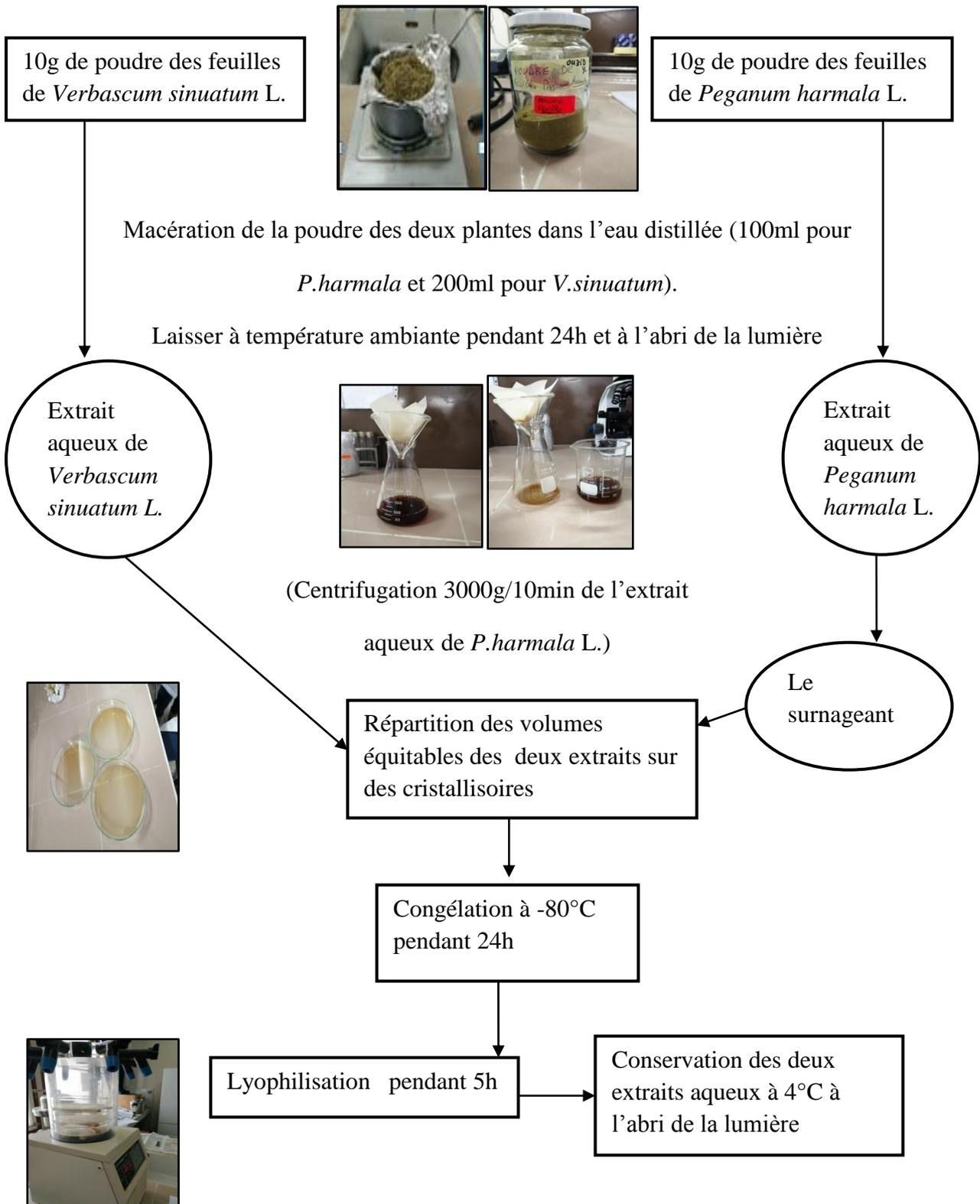


Figure 13 : Extraction aqueuse des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L.

Partie expérimentale

1.2.2. Evaluation de l'effet antiprolifératif des extraits aqueux des plantes étudiées

Pour la détermination de l'effet antiprolifératif des deux extraits aqueux de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L., la levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme modèle eucaryote (SHWETA et al., 2012) en raison de sa croissance rapide et son passage aisé de l'état haploïde à l'état diploïde ou l'inverse, facilité et faible coût des cultures. *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme mésophile dont la température optimale de sa croissance se situe entre 25°C et 35°C (LARPENT et GOURGOUD, 1985). Elle a également l'avantage de croître sur un milieu acide ($4 < \text{pH} < 4.5$) pour lequel la plupart des bactéries ne se développent pas (REVUZ, 1979).

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

Pour la mise en culture de *Saccharomyces cerevisiae*, 2g de levure commercialisée a été ensemencée dans 125ml de milieu de culture PDB stérilisé, puis incubé à 37°C pendant 24h (Figure 14).



Figure 14 : Inoculum de levure *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.2.2. Evaluation de la population cellulaire

La détermination de la population cellulaire dans le milieu de culture est effectuée selon les étapes suivantes :

- préparer une suspension mère de levures dont la densité optique est proche de 1 ;
- réaliser une série de dilutions de demi un demi avec le PDB et lire les DO₂, DO₃, DO₄ à une longueur d'onde de 650nm correspondant respectivement aux concentrations C₂ (dilution 1 /4), C₃(dilution 1 /8), C₄(dilution 1 /16) ;
- observer les cellules sous microscope optique (G x 400) ;
- déterminer le nombre des cellules (cellules/ml) correspondant à chaque densité optique en utilisant la cellule de Malassez (annexe 1) ;
- tracer la courbe d'étalonnage [Nombre de cellules = f (densité optique)] (Figure 15).

Partie expérimentale

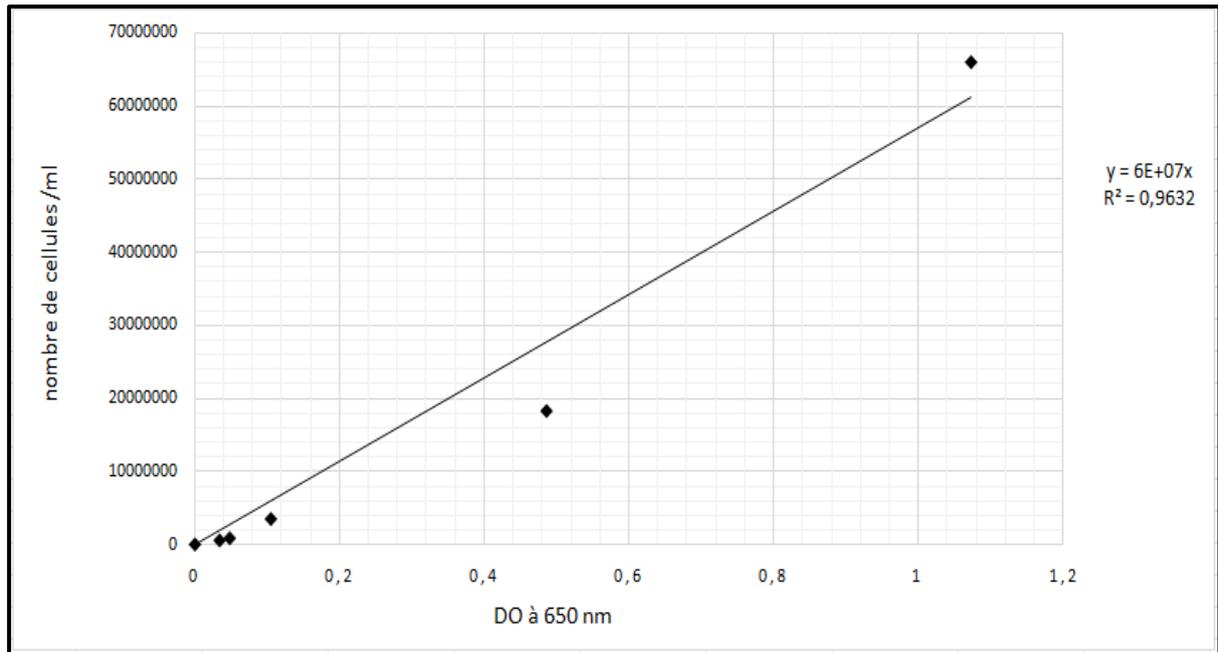


Figure 15 : Courbe d'étalonnage [nombre de cellules = $f(\text{DO})$].

Le but de la gamme d'étalonnage réalisée est de déceler la concentration de levures correspondant à une $\text{DO}=0.1$ nécessaire pour l'évaluation du test antiprolifératif.

1.2.2.3. Test antiprolifératif

L'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. et de *Peganum harmala* L. a été effectuée par la méthode de coloration en bleu de méthylène adopté par le protocole de SHWETA et *al* (2012), optimisé par nos soins.

1.2.2.3.1. Principe de bleu de méthylène

Cette méthode permet une estimation du pourcentage des cellules viables et mortes dans notre échantillon de levure.

Le bleu de méthylène agit selon le principe d'oxydo-réduction. Les cellules viables contiennent des enzymes qui sont capables de réduire le bleu de méthylène en un composé incolore. Quand les cellules sont immergées dans le bleu de méthylène qui pénètre dans les cellules, les enzymes des cellules vivantes décolorent la matière colorante. Les cellules mortes au sein desquelles l'enzyme est inactif, ne réagissent pas et restent bleues sous forme oxydée (ROCKEN et STRAUSS, 1976).

Partie expérimentale

1.2.2.3.2. Détermination de la viabilité cellulaire

Pour la détermination de la viabilité cellulaire nous avons préparé 11 tubes contenant chacun 2.5 ml de PDB et 0,5 ml d'inoculum de levure (DO=0.1)(Figure 16). Dans le premier tube constituant le témoin négatif, nous rajoutant de l'eau distillée. Dans le deuxième, la quercétine en tant que premier témoin positif (1mg /ml) et dans le troisième, on rajoute de la colchicine comme second témoin positif (1mg/ml). Dans les 8 tubes restants, nous additionnons respectivement les extrais aqueux de *V. sinuatum* L. (1mg/ml) et de *P.harmala* L. (1mg/ml) seuls et combinés aux standards (colchicine et quercétine). Tous les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, on rajoute dans tous les tubes du bleu de méthylène (0,1%). Le nombre de cellules ainsi que leurs couleurs sont observés sous microscope optique. Les cellules ovales transparentes sont des cellules vivantes, par contre celles colorées en bleu sont des cellules mortes. Leur comptage est effectué dans 16 chambres d'hémocytotymère et le nombre moyen des cellules est calculé.

le pourcentage de la viabilité cellulaire est calculé en utilisant la formule suivante (SEHGAL et al., 2006) :

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

Partie expérimentale

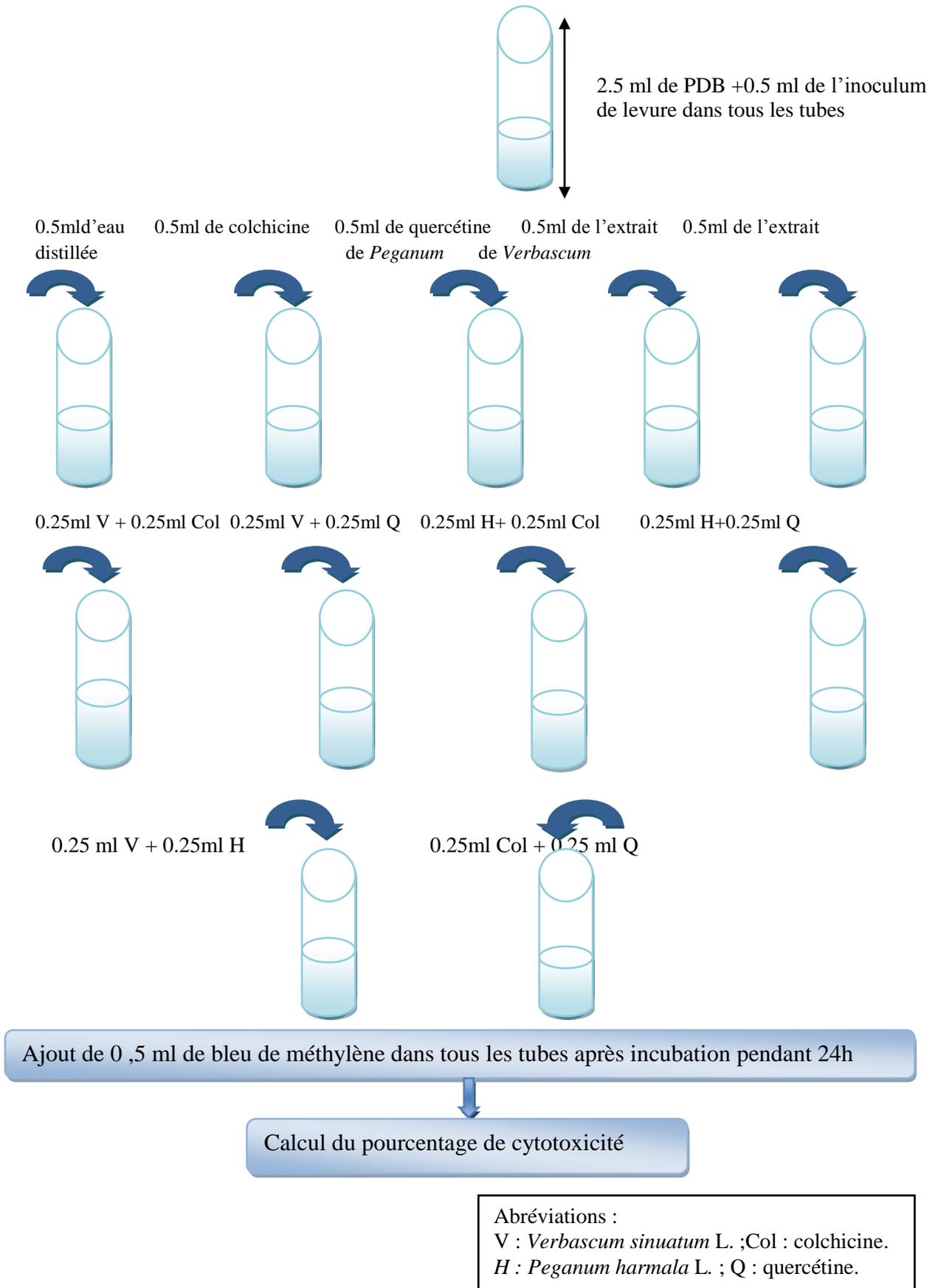


Figure 16 : Protocole expérimental du test antiprolifératif.

1.2.3. Etude statistique

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

2. Résultats et discussions

2.1. Résultats

2.1.1. Aspect de la levure *saccharomyces cerevisiae* sous microscope optique

Les essais antiprolifératifs révèlent un effet inhibiteur des différents extraits aqueux et leurs combinaisons avec les standards (colchicine et quercétine) sur la croissance cellulaire à l'égard des cellules de la levure *saccharomyces cerevisiae* (Figure 17). Le phénomène de nécrose cellulaire a été observé au niveau des levures traitées par l'extrait foliaire de *Verbascum sinuatum* L. et de *Peganum harmala* L. ainsi que les différentes combinaisons réalisées à savoir : *Verbascum*/colchicine, *Peganum*/colchicine, *Peganum*/quercétine et colchicine/quercétine.

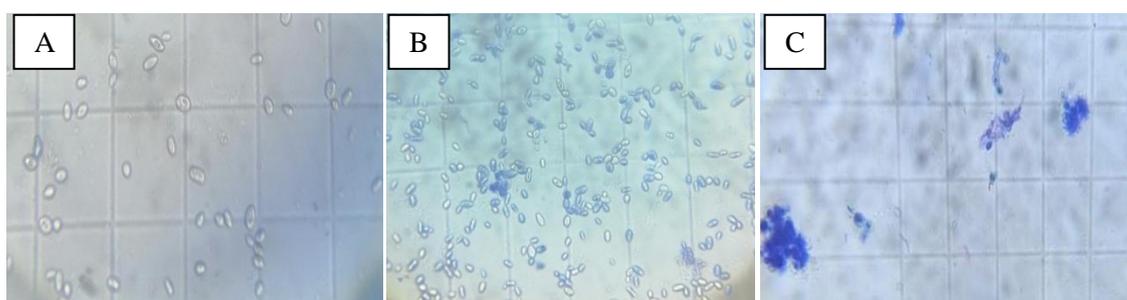


Figure 17 : Effet des extraits aqueux testés sur la levure *saccharomyces cerevisiae* (X400).

A : témoin négatif (levure traitée avec de l'eau distillée). **B** : levure traitée par les extraits aqueux et les deux standards (les cellules mortes sont colorées en bleu). **C** : nécrose cellulaire chez la levure traitée par la colchicine et l'extrait de *P.harmala* L., *V.sinuatum* L., *P.harmala* L./colchicine, *V.sinuatum* L./ *P.harmala* L., *V.sinuatum* L./colchicine, *P.harmala* L./quercétine.

2.1.2. Détermination des pourcentages de cytotoxicité

Les pourcentages de cytotoxicité des extraits foliaires testés sont estimés à $62.37 \pm 1.09\%$ pour *Verbascum* et $73.08 \pm 12.74\%$ pour *Peganum*, alors que pour les standards, ils sont estimés à $47.02 \pm 2.96\%$ pour la quercétine et $61.17 \pm 7.06\%$ pour la colchicine. En outre, les pourcentages de cytotoxicité observés pour les différentes combinaisons des extraits aqueux des plantes et des standards sont les suivants : $64.47 \pm 5.64\%$ pour *Verbascum*/*Peganum*, $76.08 \pm 2.48\%$ pour *Verbascum*/colchicine, $34.01 \pm 4.72\%$ pour *Verbascum*/quercétine, $78.2 \pm 4.72\%$ pour *Peganum*/colchicine, $72.38 \pm 2.62\%$ pour *Peganum*/quercétine et $68.19 \pm 4.38\%$ pour colchicine/quercétine (Figure 18).

Partie expérimentale

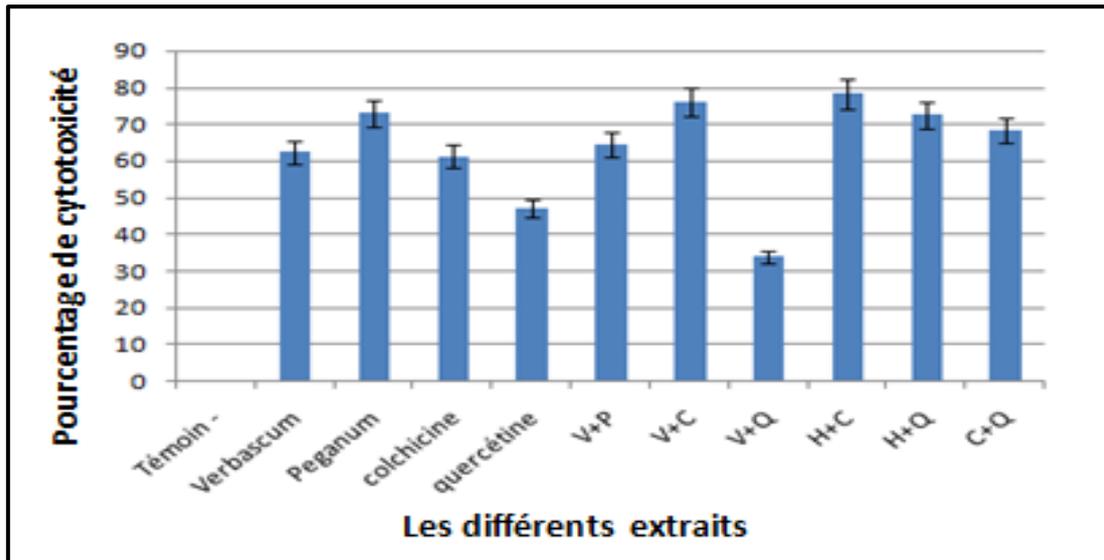


Figure 18 : Pourcentage de cytotoxicité des différents extraits.

Des analyses ANOVA réalisées entre le témoin négatif, les deux standards (colchicine et quercétine) ainsi que les différents extraits foliaires testés individuellement ou combiné ont donné des différentes probabilités (p-value) correspondant aux différents extraits testés. Ces probabilités sont comparées au risque d'erreur α qui est fixé à 5% ($\alpha= 0.05$) et qui ont montré des valeurs variables selon les extraits testés (Annexe 2).

En outre, les ANOVA montre une différence hautement significative entre les pourcentages de cytotoxicité des extraits testés (p-value globale=0,00) (annexe 2). Ceci confirme leur action cytotoxique différente sur la prolifération cellulaire. Les comparaisons multiples des moyennes ont révélé la formation de quatre groupes homogènes distincts par rapport à la cytotoxicité des extraits qui les représentent (annexe 3). Le groupe A est représenté par les deux standards à savoir la colchicine et l'association colchicine /quercitine ainsi que les extraits suivants : la colchicine, *Verbascum*, *Peganum*, *Verbascum/Peganum*, *Verbascum/colchicine*, *Peganum/colchicine*, *Peganum/quercitine*. Tous les extraits appartenant à ce groupe prouve un effet cytotoxique similaire dont les pourcentages de cytotoxicité mesurés sont les plus élevés .En outre, la quercétine appartient au groupe AB. Par ailleurs, le groupe B est représenté par la combinaison *Verbascum/quercitine* dont l'effet cytotoxique paraît le plus faible, tandis que le groupe C est représenté par le témoin négatif (Tableau XIII).

Partie expérimentale

Tableau XIII : Comparaison des moyennes des pourcentages de cytotoxicité des différents extraits aqueux des plantes et leurs combinaisons.

Extraits testés	PC (%) ± ES
Témoin négatif	0±0 C
Colchicine	61.17 ± 7.06 A
Quercétine	47.02 ± 2.96 AB
<i>Verbascum sinuatum</i> L.	62.37 ± 1.09 A
<i>Peganum harmala</i> L.	73.08 ± 12.74 A
<i>Verbascum</i> / <i>Peganum</i>	64.47 ± 5.64 A
<i>Verbascum</i> / colchicine	76.08 ± 2.48 A
<i>Verbascum</i> / quercétine	34.01± 4.72 B
<i>Peganum</i> / colchicine	78.2 ± 4.72 A
<i>Peganum</i> / quercétine	72.38 ± 2.62 A
Colchicine / Quercétine	68.19 ± 4.38 A

PC : pourcentage de cytotoxicité ; ES : Erreur standard.

2.2. Discussion

D'après nos résultats, la colchicine et la quercétine présentent respectivement un pourcentage de cytotoxicité de 61.17 ± 7.06 % et 47.02 ± 2.96 %. En outre, les analyses ANOVA réalisées entre les deux standards montrent qu'il n'y a aucune différence significative ($p=0.2$). Ceci indique que la colchicine et la quercétine possèdent des effets cytotoxiques similaires. Comparativement à d'autres études dirigées par OUZID et *al.* (2019), rapportant sur l'effet antimittotique de ces deux standards sur les cellules méristématiques, les indices mitotiques (IM) de la colchicine et de la quercétine sont estimés à 35 ± 1.16 % et 44.4 ± 0.72 % respectivement.

De même, les extraits aqueux de *Peganum harmala* L. et *Verbascum sinuatum* L. ont donné respectivement un pourcentage de cytotoxicité de 73.08 ± 12.74 % et 47.02 ± 2.96 %. Par ailleurs, ce test statistique révèle l'absence d'une différence significative ($P=0.53$) entre les extraits aqueux combinés *Peganum* /*Verbascum*. Ceci confirme la présence d'un effet cytotoxique similaire entre ces deux plantes dont l'effet synergique cumulatif n'a pas pu être

Partie expérimentale

mis en évidence. L'effet antiprolifératif de ces deux plantes est peut être dû à leur richesse en alcaloïdes toxiques. La toxicité de ces alcaloïdes est liée à leur structure lipophile et plane, qui leur permet une intercalation dans l'ADN conduisant à une perturbation de l'activité de l'ADN polymérase et de l'ADN topoisomérase ayant pour conséquence la génération de mutations (WINK 2008 ; ROSENKRANZ et WINK, 2007).

Des études similaires rapportant sur l'effet antimittotique des extraits aqueux des feuilles de *Peganum* et *Verbascum* ont été réalisées dont le niveau cytotoxique de ces extraits aqueux a été déterminé par le taux de diminution des IM. En effet, ces études comparatives ont révélé que l'IM de la fraction aqueuse et butanolique des flavonoïdes de *Peganum* est plus faible que celui de *Verbascum* avec une estimation de $62.60 \pm 0.82\%$ et de $70 \pm 0.75\%$ respectivement pour la fraction aqueuse et une estimation de $44 \pm 0.4\%$ et de $47.2 \pm 1.03\%$ respectivement pour la fraction butanolique (DAHMANI et BOUAZIZ-MENOUER, 2019). D'après ces résultats, on constate que les flavonoïdes de *Peganum* aussi bien que ceux de *Verbascum* présentent un effet cytotoxique plus important dans la fraction butanolique qui est organique que dans la fraction aqueuse. Les données de MAHMOUDI et al. (2013) montrent que la macération des fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) par l'éthanol et par l'acétone sont les meilleures techniques d'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes alors que la décoction aqueuse est préférable pour l'extraction des tanins condensés.

En outre, le test de comparaison des moyennes des indices de cytotoxicité a révélé que les différents extraits à savoir : *Verbascum*, *Peganum*, *Verbascum/Peganum*, *Verbascum/colchicine*, *Peganum/colchicine*, *Peganum/quercétine* et *colchicine/quercétine* appartenant au même groupe A ont un effet cytotoxicité similaire à la colchicine ($P > 0.05$) dont l'effet antiprolifératif serait important. Par ailleurs, le pourcentage de cytotoxicité le plus faible est observé dans le groupe B représenté par la combinaison *Verbascum/quercétine*, suggérant ainsi une activité antiproliférative moins importante. Ceci confirme que les différents extraits aqueux ainsi que leurs associations se comportent soit comme des alcaloïdes ou des flavonoïdes synthétisés par les plantes avec des mécanismes d'action similaires à la colchicine et à la quercétine dans l'inhibition de la mitose et de la prolifération des cellules. Des résultats similaires ont été rapportés en utilisant les extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala L.* à savoir l'extrait fongique d'*Alternaria* et l'extrait *Alternaria+Penicillium* qui se sont avérés contenir des composés biologiquement actifs qui, en combinaison, ont montré une activité antiproliférative pour les cellules de levure de *Saccharomyces cerevisiae* (OUZID et al., 2019).

Dans notre étude, la plupart des cellules observées au microscope optique colorées en bleu sont mortes et accompagnées de débris cellulaires. Nous avons également observé le phénomène de nécrose suite à la toxicité des différents extraits à savoir : *Peganum*, colchicine, *Peganum/colchicine*, *Verbascum/colchicine*, *Peganum/quercétine* et colchicine/quercétine.

Le même phénomène de nécrose a été également observé dans l'extrait aqueux de *Verbascum*, qui présente une différence hautement significative avec le témoin négatif ($P=0.00$). Une étude sur l'effet antimittotique et cytotoxique des extraits aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum L.*, optimisé par OUZID et al. (2019), basée sur le dosage des flavonoïdes

Partie expérimentale

et des alcaloïdes, montre que l'extrait aqueux de cette plante est plus riche en alcaloïdes qu'en flavonoïdes avec une teneur de 84.42 µg EC/mg de l'extrait et 13.58 µg EQ/mg de l'extrait respectivement. Par ailleurs, d'autres études rapportant sur l'effet cytotoxique et antimittotique des alcaloïdes et les extraits aqueux des feuilles de *Verbascum*, ont révélé une différence significative ($P=0.04$) entre la fraction d'alcaloïdes et l'extrait aqueux (4mg/ml) dont la teneur en alcaloïdes est de 250,95 µg EC/mg de fraction et de 84,42 µg EC/mg de l'extrait, respectivement. Ces résultats nous laissent supposer que le phénomène de nécrose observée chez *V.sinuatum* L. est dû à la cytotoxicité des alcaloïdes, qui lorsqu'ils sont présents dans un extrait aqueux, leur cytotoxicité diminue considérablement. D'autres études faites sur *Peganum* ont montré des résultats similaires par rapport à la teneur en alcaloïdes dans la fraction et dans l'extrait aqueux avec une différence significative ($P=0.03$). Cela s'explique du fait que les alcaloïdes sont des composés à solubilité faible dans l'eau. En effet, la variabilité des teneurs en alcaloïdes a une relation avec le type du solvant utilisé (SASSOUI, 2016).

D'autres études ont montré l'effet antimittotique des alcaloïdes sur les cellules méristématiques de l'oignon. Cet effet est révélé par la présence d'aberrations chromosomiques, cellulaires et nucléaires sous l'action de la colchicine. Ces résultats nous laissent soumettre l'idée que les métabolites secondaires de *Verbascum* et de *Peganum* possèdent une activité similaire à celle de la colchicine: poison du fuseau empêchant la prolifération cellulaire par inhibition de la polymérisation des microtubules interférant avec la dynamique du fuseau mitotique (PEREZ *et al.*, 2002 ; ROGALSKA *et al.*, 2015) .

Les ANOVA réalisés entre *Verbascum* et *Verbascum*/colchicine montrent une différence significative ($P=0.014$) dont l'effet synergique cumulatif peut être suggéré. Ces résultats pourraient être intéressants de point de vue thérapeutique, si l'objectif de la thérapie vise à inhiber uniquement la prolifération des cellules cancéreuses seules. Mais malheureusement, une si forte toxicité de ces extraits peut atténuer et altérer également les cellules saines. Donc, il est important de chercher les combinaisons qui peuvent remédier au problème de toxicité. Dans ce cas, l'association *Verbascum*/quercétine s'avère très intéressante car elle représente l'indice de cytotoxicité le plus faible dont l'effet antagoniste de ce flavonol peut être suggéré du fait que les analyses ANOVA ont montré une différence hautement significative entre *Verbascum* et *Verbascum* /quercétine ($P=0.008$), alors qu'aucune différence significative est observée entre *Peganum* et *Peganum*/ quercétine ($P=0.96$). De ce fait, on déduit que la quercétine présente un effet antagoniste contre *Verbascum* seulement . Ces résultats nous montrent que la quercétine peut exercer un effet chimioprotecteur envers les cellules lorsqu'elle est associée à *Verbascum*. L'effet chimioprotecteur de la quercétine a été déjà mis en évidence dans des études rapportées par ISHAKAWA et KITAMURA qui ont démontré également l'effet anti-apoptotique de la quercétine suite à l'induction de l'apoptose par un traitement au peroxyde d'hydrogène. Par ailleurs, d'autres auteurs ont centré leurs recherches sur l'influence de ce flavonol sur la famille des MAP kinases (mitogen activated proteins) (ISHAKAWA et KITAMURA, 2000).

Partie expérimentale

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

Enfin, notre étude a montré que les extraits aqueux des feuilles de *Verbascum* et de *Peganum* testés individuellement possèdent des effets cytotoxiques modérés alors que leur association n'a révélé aucun effet synergique. Cependant, on peut suggérer d'autres effets de combinaisons en utilisant d'autres parties des plantes ou autres types de solvants.

Conclusion et perspectives

La présente étude nous a permis de mettre en évidence l'effet antiprolifératif *in vitro* de l'association des extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L. et de *Verbascum sinuatum* L. ainsi que les combinaisons aux standards (colchicine et quercétine) sur la levure *saccharomyces cerevisiae*.

L'effet antiprolifératif est révélé par l'observation de cellules mortes et du phénomène de nécrose cellulaire au niveau des levures traitées par les extraits suivants: *Peganum*, *Verbascum*, colchicine, *Verbascum*/colchicine, *Peganum*/quercétine et colchicine/ quercétine dont le pourcentage de cytotoxicité est très élevé. De ce fait, les extraits aqueux de *Verbascum* et de *Peganum* se sont avérés contenir des composés cytotoxiques induisant l'inhibition de la croissance cellulaire au niveau des levures *saccharomyces cerevisiae*, par interaction avec l'ADN, les microtubules et les topoisomères I et II. De ce fait, les extraits aqueux de *Verbascum* et de *Peganum* se sont avérés contenir des composés biologiquement importants qui agissent soit de façon synergique avec la colchicine notant l'association *Verbascum*/colchicine dont le pourcentage de cytotoxicité est estimé à $76.08 \pm 2.48\%$, ou par antagonisme avec la quercétine notant la combinaison *Verbascum*/ quercétine dont le pourcentage de cytotoxicité est le plus faible ($34.01 \pm 4.72\%$). Ces différentes combinaisons testées ont révélé un pouvoir antiprolifératif sur les cellules de *Saccharomyces cerivisiae*, ce qui nous incite à exploiter ces résultats dans l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, l'amélioration de l'efficacité thérapeutique et la réduction de la toxicité de la chimiothérapie qui affecte également les cellules saines.

Au terme de cette étude préliminaire, des investigations ultérieures sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- la démarche consisterait à l'isolement et à l'identification des principes actifs responsables de l'activité antiproliférative par des techniques chromatographiques et spectrales ;
- Une étude *in vivo* des molécules bioactives isolées serait souhaitable pour rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire ;
- la recherche d'autres principes actifs qui pourraient être testés sur des lignées cellulaires cancéreuses ;
- il serait intéressant de rechercher d'autres effets synergiques ou autres effets de la combinaison de nouvelles molécules bioactives avec d'autres thérapies anticancéreuses.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ACHOUR S., SAADI H., TUREANT A., BANANI A., MOKHTARI A., SOULAYMANI A. et SOULAYMANI B. R. (2012). Intoxication au *Peganum harmala* L. et grossesse: deux observations marocaines. *Médecine et Santé Tropicales*, 22, 84-86.

AHMED M., HUSSAIN M., DHAR M.K. et KAUL S. (2012). Isolation of microbial endophyte from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir, Scholars Research Library. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 2 (2), 215-220.

ALIPIEVA K.I., ORHAN I.E., CANKAYA I.I.T., KOSTADINOVA E.P. et GEORGIEV M.I. (2014). Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. *Phytochemistry Reviews*, 13 (2), 417-444.

AMOS L.A. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(2), 2153-2160.

ANISZEWSKI T. (2007). Definition, typology and occurrence of Alkaloids ; in: « Alkaloids - Secrets of Life ». *Elsevier*, 1-59.

ASHTON A.Q. (2012). Mixed function oxygenases: ScholarlyBrief: advances in research and application. Scholarly, Georgia, Atlanta, 55p.

BAGHIANI A., DJARMOUNI M., BOUMERFEG S., TRABSA H., CHAREF N., KHENNOUF S. et ARRAR L. (2012). Xanthine oxidase inhibition and antioxidant effects of *Peganum harmala* seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, 1, 42-56.

BARROS L., CARVALHO A.M. et FERREIRA ICFR. (2011). Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochem Anal*, 122(2). 181-8.

BAS E., RECIO C., ABDALLH M., MANEZ S., GINER R. M., CERDA-NICOLAS M. et RIOS G.L. (2007). *Journal of ethnopharmacology*, 110, 419-427.

BELKACEMİY., LAHARIE-MINEUR H., GLIGOROV J. et AZRIA D. (2007). Bénéfice et risques potentiels de l'association du trastuzumab à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans le cancer du sein non métastatique. *Cancer Radiothérapie*, 11, 266-275.

BELLAKHDAR J. (1997). Médecine arabe ancienne et savoir populaires. *La pharmacopée marocaine traditionnelle*, Ibis Press.

Références bibliographiques

BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. et TROGOLO C. (1980). 6-O- β -D-Xylopyranosylaucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, 19 (4), 571-573.

BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. et TROGOLO C. (1981). 6-O- α -Sinuosylaucubin from *Verbascum sinuatum*. *Phytochemistry*, 20 (3), 465-468.

BIAVATTI M.W. (2009). Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(45), 372-377.

BIDOUIL C. (2012). Modélisation moléculaire de l'acétylation de la quercétine par des lipases : Etude des Interactions enzyme-substrat. Thèse de doctorat. Université de La Lorraine, La Lorraine, France.

BOOTS A.W., HAENEN G.R.M.M et BAST A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585, 325-337.

BOUSLIMAN Y., AIT EL CADI M., EL JAUDI R., LAATIRIS A., BOUKLOUZE A. et CHERRAH Y. (2012). Les plantes toxiques au Maroc. *Médecine du Maghreb*, n°196.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et Documentation, 3ème Ed., Lavoisier, Paris.

BRUNETON J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Technique et Documentation, 4ème Ed., Lavoisier, p.1268, Paris.

CALDERON B., GUERDER C., RESBENT M., FAKHRY N., DUPUIS C. et COWEN D. (2016). Observance et résultats de la chimioradiothérapie concomitante après chimiothérapie d'induction par docétaxel, cisplatine et 5-fluoro-uracile pour les cancers de la tête et du cou localement évolués. *Cancer Radiothérapie*, 1-8.

CHEN C., ZHOU J. et JI C. (2010). Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*, 87(11-12), 333-338.

CHOPRA I.C. ABRAL B.K et HANDA K.L. (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées du point de vue botanique. UNESCO, p.97.

COLOUNGA BIANCATELLI R.M., BERRILL M., CATRAVAS J.D., MARIK P.E. (2020). Quercetin and vitamin C : An experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Front. Immunol*, 1451(11), 1-11.

Références bibliographiques

COREA G., FATTORUSSO E., LANZOTTI V., DI MEGLIO P., MAFFIA P., GRASSIA G., IALENTI A. et IANARO A. (2005). Discovery and biological evaluation of the novel naturally occurring diterpene pepluanone as anti-inflammatory agent. *J. Med. Chem.* 48, 7055-7062.

COUDERT P. (2018). Cancers cutanés et chimiothérapie. *Elsevier Masson*, 581, 32-36.

DAHMANI M. et BOUAZIZ-MENOUER T. (2019). Effet antimittotique et cytotoxique des flavonoïdes des feuilles de *Verbascum sinuatum* L. Mémoire master. Université de Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.

DANE F. et YILMAZ G. (2009). A new natural hybrid of *Verbascum* (Scrophulariaceae) from European Turkey. *Phytologia Balcanica*, 15 (2), 181-184.

DARABPOUR E., BAVI A.P., MOTAMEDI H. et SEYYED NEJAD S.M. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *EXCLI Journal*, 10, 252-263.

DEWICK P. M. (2002). Medicinal natural products. A biosynthetic approach. 2^{ème} Ed. Wiley.

DIALLO A. et PRIGENT C. (2011). Les sérine/thréonine kinases contrôlant la progression du cycle cellulaire comme cibles thérapeutiques. *Bull Cancer*, 98 (11), 1335-1345.

DO AMARAL C.L., FRANCESCATO H.D., COIMBIRA T.M., COSTA R.S., DARIN J.D., ANTUNES L.M., BIANCHIMDE L. (2008). Resveratrol attenuates cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol*, 82, 363-370.

DU B., JIANG L., XIA Q., ZHONG L. (2006). Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*, 52, 23-28.

DUBOCHET J. J. (1850). Histoire naturelle de PLINE, Tome 2. p. 185. Paris.

DUMONTET C. (2011). Les agents antitubulines. *Bull Cancer*, 98 (11), 1275-1285.

EVAN W.C. (2002). Trease and Evan-Pharmacognosy. 15^{ème} Ed. W.B. Sanders Company Limited.

FAROUK L., LAROUBI A., OUACHRIF A., ABOUFATIMA R., BENHARREF A. et CHAIT A. (2009). Study on antinociceptive activity of different extracts of *Peganum harmala* L. and possible mechanism of action. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 8, 29-35.

Références bibliographiques

FAURE S. (2008). Les traitements adjuvants à la chimiothérapie anticancéreuse. *Actualité pharmaceutique*, 470, 10-20.

GOEL N., SINGH N. et SAINI R. (2009). Efficace dans la multiplication *in vitro* de la rue syrienne (*Peganum harmala* L.) en utilisant 6-benzylaminopurine pré-conditionnés explants de semis. *Nat Sci*, 7 (7), 129-34.

GUO X., SHA X., RAHMAN E., WANG Y., JI B., WUW. et ZHOU F. (2018). Antioxydant capacity and amino acid profile of millet bran wine and the synergistic interaction between major polyphenols. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 1010-1020.

GUY NESOM L. (2012). Flora of North america *Verbascum Scrophulariaceae*, taxon eds : Rabeler et freeman, vol. 17, 2-10.

HALLIWELL B. (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348.

HALLIWELL B. (2011). Free radicals and antioxidants-quo vadis ? *Trends in Pharmacological Science*, 32 (3), 125-130.

HAMMICHE V., MERAD R. et AZZOUZ M. (2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer, p.447. Paris.

HANDE K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer*, 34, 1514–1521.

HEANY M.L., GARDNER J.R., KARASSAVAS N.(2008). Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res*, 68, 8-8031.

HMAMOUCHE M. (1998). Bibliographic research in the countries of the Maghreb. Part II *Medusa Newsletter*, 2,7–12.

HOFFMAN D C. (1988). The herbal handbook: A user's guide to medicinal herbalism. Rochester: *Healing Arts Press*, p. 67.

HUET M. (2013). Les plantes médicinales chez les malades atteints de cancers : pratiques courantes et éléments de leur évaluation. *Bull Cancer*, 100, 485-95.

IMBERT F. (1998). Discovery of podophyllotoxin. *Biochimie*, 80, 207-22.

ISERIN P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed., Larousse. Paris.

Références bibliographiques

ISHIKWA Y., KITAMURA M. (2000). Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int*, 58, 1078- 1087.

JARADAT N., MASSOUD B. et ABU-HADID M. (2015). Screening antibacterial and antifungal activities and evaluation of the exhaustive extractions yields for *Verbascum sinuatum*. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 6 (1), 105-110.

KARACETIN D., YALCIN B., OKTEN B., OZTURK S., MARAL O. et INCEKARA O. (2009). Capecitabine and oxaliplatin (XELOX) as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer. *J BUON*, 14(4), 8-605.

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

KEMASSI A., BOUAL Z., BOUZIANE N., OULD EL HADJ-KHELIL A. et OULD EL HADJ M.D. (2013). Biological activity of essential oils leaves from one Sahara plant: *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) on the locust desert. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2(8), 389-395.

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

KHATTABI A., RHALEM N., CHABAT A., SKALI S. et SOULAYMANI-BENCHEICH R. (2010). Plantes toxiques : définition et classification. *Toxicologie Maroc*, 2, 3-4.

KORKINA L.G. (2007). Phenylethanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell Mol Biol*, 53,15–25.

KOZAN E., TATLI I.I., KAHRAMAN C., AKKOL E.K. et AKDEMIR Z. (2011). The *in vivo* anthelmintic efficacy of some *Verbascum* species growing in Turkey. *Experimental Parasitology*, 129 (2), 211-214.

KRIEF S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Muséum national d'histoire naturelle, Paris, France.

KUPELI E., ERDEMOGLU N., YESILADA E. et SENNER B. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heart wood of *Taxus baccata* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 265 – 270.

Références bibliographiques

- LANG M., HENSON R., BRACONI C. et PATEL T. (2009).** Epigallocatechin-gallate modulates chemotherapy-induced apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Liver Int*, 29, 670-7.
- LARPENTJ. P., GOURGOUD M., (1985).** Elément de microbiologie. Ed. Herman. p.464, Paris.
- LAWENDA B.D., KELLY K.M., LADAS E.J., SAGAR S.M., VICHERS A. et BLUMBERG J.B. (2008).** Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy ? . *J Natl Cancer Inst*, 100, 83-773.
- LEE J.H., LEE J.Y., KANG H.S., JEONG C.H., MOON H. et WHANG W.K. (2006a).** The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Arch Pharm Res*, 29, 508–13.
- LENGLET G. (2010).** Mécanismes d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines .Thèse de Doctorat. Université du Droit et de la santé-Lille II, Lille, France.
- LEVY A., ALBIGES-SAUVIN L., MASSARD C., SORIA J.C. et DEUTSCH E. (2011).** Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques. *Bull Cancer* ,98 (9) ,1037-1045.
- LEWANDOWSKA U., GORLASH S., OWCZAREK K., HRABEC Z., HRABEC E. SZEWCZYK K. (2014).** Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Hig Med Dosw*, 68, 528-540.
- LIU R., GAO M., QIANG G.F., ZHANG T.T., LAN X., YING J., DU G.H. (2009).** The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid- β 25–35 peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience*, 162, 1232–1243.
- MAHMOUDI S., KHALI M. et MAHMOUDI N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). *Nature & Technologie*, 9, 35-40.
- MAIRE R. (1933).** Etudes sur la flore et la végétation du Sahara central. Impr. La Typo-litho, vol. 1 et 2, p.272.
- MAJUMADAR A .P., BANERJEE S., NAUTIYAL J ., PATEL B.B., PATEL V., DU J ., YU Y ., EILLOT A.A ., LEVIE ., SARKAR F.H. (2009) .**curcumin synergizes with resveratrol to inhibit colon cancer .*Nutr Cancer* ,61 ,544-553.
- MANSOUR M. et SOUDABE N. (2012).** The effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* halcoholic extracts on growth of *Escherichia coli* 0157. *Jundishapur J. Microbiol.*, 5(3), 511-515.

Références bibliographiques

MATHAD V. T., RAJ K., BHADURI A. P., SAHAI R., PURI A., TRIPATHI L. M. et SRIVASTAVA V. M. L. (1998). Bioorganic and Medicinal Chemistry, 6, 605-611.

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

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

MEHTA M., STORER B. et SCHILLER J.H. (1993). Phase II study of WR 2721/cisplatin/ vinblastine, followed by thoracic radiation (TRT) and WR- 2721, in stage III non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 12(A), p.12 I2.

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*, 8 (4), 347-350.

MEIJER L. (2006). Le cycle cellulaire et sa régulation. *Bull Cancer*, 93, 41-53.

MERTENS-TALCOTT S.U., TALCOTT S.T., PERVICAL S.S. (2003). Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *J. Nutr*, 133, 2669-2674.

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

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

MORRE D.J., MORRE D.M., SUN H., COOPER R., CHANG J., JANLE E.M. (2003). Catechin synergies in inhibition of cancer cell proliferation and of a cancer specific cell surface oxidase (ECTO-NOX). *Pharmacol. Toxicol.*, 92, 234-241.

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

Références bibliographiques

MURAKAMI A., ASHIDA H., et TERAJO J. (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*, 269,315-325.

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

NOBLE M.E., ENDICOTT J.A. et JOHNSON L.N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, 303 5-1800.

NOGALES E., WHITTAKER M., MILLIGAN R.A. et DOWNING K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96, 79-88.

OUZID Y., SMAÏL-SAADOUN N. et HOUALI K. (2019). Antimitotic and antiproliferative activities of crud 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.

OZENDA P., (1991). Flore du Sahara: contribution à l'étude phytochimique de deux espèces *Pimpenela* et *Peganum*. . 2ème Ed. CNRS, p.622.

PAPOUTSI Z., KASSI E., MITAKOU S., ALIGIANNIS N., TSIAPARA A. et CHROUSOS G.P. (2006). Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 98, 63–71.

PASQUET V. (2001). Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle, La Rochelle, France.

PEREZ J., PARDO J. et GOMEZ C. (2002). Vincristine: An effective treatment of corticoid-resistant life-threatening infantile hemangiomas. *Acta Oncol.*, 41, 197-199.

PICKARD J.D., AKALAN N., Di ROCCO C., DOLENC V.V., LOBO ANTUNES J., MOOLJI J.J.A., SCHARMANN J. et SINDOU M. (2009). Advances and technical standards in neurosurgery. Springer. *Science & Business Media*, p.209.

PIETTA P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035 – 1042.

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

Références bibliographiques

PUOCI F., MORELLI C., CIRILLO G., CURCIO M., PARISI O.I., MARIS .P, SISCI D. et Picci N. (2012).Anticanceractivity of a quercetin-basedpolymer towards HeL a cancer cells. *Anticancer.Res*, 32(7), 2843-2847.

RAHIMI-MOGHADDAM P., EBRAHIMI S.A., OURMAZDI H., SELSELEH M., KARJALIAN M., HAJ-HASSANI G., ALIMOHAMMADIAN M.H., MAHMOUDIAN M. et SHAFIEI M. (2011). *In vitro* and *in vivo* activities of *Peganum harmala* extract against *Leishmania major*. *Journal of Research and Medical Science*, 16, 1032-1039.

RAYMOND E. (1996). Les médicaments chimioprotecteurs. Mécanismes d'action et application chimique. *Rev Med Interne*, 17, 936-944.

REMAL P.S. (2014). Approche moléculaire et morphologique du genre *Verbascum* L. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. Toulouse. France.

REVUZ B., (1979).Microbiologie et industrie alimentaire (culture de la levure sur mûlasse). .Ed. Lavoisier, Paris. 113-120.

ROCKEN W.et STRAUSS M. (1976).Monatsschrift fur Braure, 5, p.209.

ROGALSKA A., MISKIEWICZ K. et MARCZAK A. (2015). Inhibitors of microtubule polymerization-new natural compounds as potential anti-cancer drugs. *Postepy Hig Med Dosw*, 69, 571-585.

ROSENKRANV V., WINK M. (2007). Induction of apoptosis bu alkaloids, non-protein amino-acid, and cardiac glycosides in human promyelotic HL60 cells. *Zeitschrift fur naturforschung C*, 62, 458-466.

SASSOUI D. (2016). Etude ethnobotanique, phytochimique, histologique et activité antidépressive de *Portulaca oleraceae* L .et *Peganum harmala* L. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

SCHWEITZER-STENNER R. et UVERSKY V. (2012). Peptide folding, misfolding, and nonfolding. Hoboken. *John Wiley & Sons*, p.500.

SEHGAL R., ROY S. et KUMAR V.L. (2006). Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* and *Podophyllotoxin* in *Allum cepa* root model. *J Biocell.*, 30, 9-13.

SENATORE F., RIGANO D., FORMISANO C., GRASSIA A., BASILE A. et SORBO S. (2007). Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. *Fitoterapia*, 78 (3), 244–247.

Références bibliographiques

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.

SHARMA V., HUPP C.D., TEPE J.J. (2007). Enhancement of chemotherapeutic efficacy by small molecule inhibition of NF- κ B and checkpoint kinases. *Curr.Med.Chem*, 14, 1061-1074.

SHWETA S., KHADABADI S. et GANESH T.G. (2012). *In vitro* antimitotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extract of *Revia hypocrariformis*. *Asian Pacific J Trop Dis*, 12, 503-506.

SPIGEL D.R., RECKAMP K.L., RIZVI N.A., PODDUBSKAY A. E., WEST H.J. et EBERHARDT WEE. (2015). A phase III study (CheckMate 017) of Nivo-lumab (NIVO; anti-programmed death-1 [PD-1]) vs Docetaxel(DOC) in previously treated advanced or metastatic squamous(SQ) cell non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*, 33, p.109.

STOODEH 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, Toulouse, France.

SUGIYAMA T., SADZUKA Y. et THEANIN E. (2004). A specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer Lett*, 212, 177-84.

SUN X., XIONG Z., ZHANG Y., MENG Y., XU G., XIA Z., LI J., ZHANG R., KE Z. et HU Y. (2012). Harpagoside attenuates MPTP/MPP(+) induced dopaminergic neurodegeneration and movement disorder via elevating glial cell line derived neurotrophic factor. *J. Neurochem*. 120, 1072–1083.

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.

TATLI I.I., SCHUHLY W. et AKDEMIR Z.S. (2007). Secondary metabolites from bioactive methanolic extract of *Verbascum pycnostachyum* Boiss. & Helder flowers. *Journal of the Faculty of Pharmacy*, 1(27), 23-32.

TATLI I.I., KAHRMAN C. et AKDEMIR Z.S. (2015). The therapeutic activities of selected Scrophulariaceae and Buddlejaceae species and their secondary metabolites against neurodegenerative diseases. Chapter 11 in « Bioactive nutraceuticals and dietary supplements in neurological and brain disease ». ISBN 978-0-12-411462-3. Elsevier .95-111.

Références bibliographiques

VUILLET-A-CILES H., LAGARDE A. et BUXERAUD J. (2014). La chimiothérapie cytotoxique. *Elsevier Masson*, 540, 16-24.

WADLER S., BEITLER J. et HAYNES H. (1993). A pilot clinical trial of cisplatin (CDDP), radiation therapy (RT) and ethylol against carcinoma of the cervix (CC). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 12(A), p.872.

WANG J. et YI J. (2008). Cancer cell killing *via* ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 7, 84-1875.

WANG J., HE D., ZHANG Q., HAN Y., JIN S., QI F. (2009). Resveratrol protects against cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 24, 675-680.

WANG Q., YUAN F., PAN Q., LI M., WANG G., ZHAO J. et TANG K. (2010). Isolation and functional analysis of the *Catharanthus roseus* deacetylvindoline- 4-Oacetyltransferase gene promoter. *Plant Cell Rep.*, 29, 185-192.

WECKESSER W. (2013). First recolt of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) in Val Verde County, Texas and subsquent eradication treatment. *Phytoneuron*, 71, 1-5.

WIHELMINA FEEMSTER JASHAMSKI. (1999). Apampeian herbal, ancient and modern medicinal plants, 1^{ère} Ed., University Texas. p.35.

YEHIA AID S., ZAKI EL-READI M., WINK M. (2012). Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. 19, 1307–1314.

ZANINI C., GIRIBALDI G., MANDILI G., CARTA F., CRESCENZIO N., BIZARO B., DORIA A., FOGLIA L., DI MONTEZEMOLO L.C., TIMEUS F. et TURRINI F.(2007). Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *J. Neurochem*, 103, 1344-1354.

ZAPATA E., MENNECIER B., LEDUC C., CHATRON E. et QUOIX E. (2016). Réponse prolongée sous paclitaxel après immunothérapie par pembrolizumab dans le cancer bronchique. *Revue de Pneumologie clinique*, 72, 300-304.

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

ZHOU X. Q., BI Z. M., LI P., TANG D. et CAI H. X. (2007). Chinese Chemical Letters, 18, 1221-1223.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Description de la cellule de Malassez.

La cellule de Malassez (ou Hématimètre de Malassez) est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Cette méthode de dénombrement permet de compter les cellules vivantes et mortes dans une solution. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant 20 petits carrés. La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles et son volume total est de 1 mm³.

Le comptage de cellules avec la cellule de Malassez selon l'équation suivante :

$$N = n / V \times F$$

Dont :

- ✓ N : c'est le nombre de cellules formant colonie par ml (UFC /ml).
- ✓ n : nombre de cellules comptées.
- ✓ V : le volume de comptage (ml).
- ✓ F : le facteur de dilution.

Annexe 2 : Table ANOVA pour les résultats de comparaison des moyennes des pourcentages de cytotoxicité des différents extraits testés.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	110666,6	1	110666,6	816,7162	0,000000
extrait	16212,8	10	1621,3	11,9650	0,000001
Erreur	2981,0	22	135,5		

P-value globale = 0,000001

Annexes

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	17561,94	1	17561,94	132,7658	0,000324
Col , Q	300,33	1	300,33	2,2705	0,206333
Erreur	529,11	4	132,28		

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	5836,273	1	5836,273	2170,573	0,000001
T neg, Ver	5836,273	1	5836,273	2170,573	0,000001
Erreur	10,755	4	2,689		

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	8011,760	1	8011,760	21,92644	0,009430
T neg, Peg	8011,760	1	8011,760	21,92644	0,009430
Erreur	1461,571	4	365,393		

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	27524,12	1	27524,12	74,77723	0,000984
Peg , Ver	171,95	1	171,95	0,46715	0,531839
Erreur	1472,33	4	368,08		

Annexes

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

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	Nv_Var
ord. origine	27038,62	1	27038,62	56,57532	0,001673	
Peg , Col	212,65	1	212,65	0,44495	0,541250	
Erreur	1911,69	4	477,92			

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	21639,62	1	21639,62	56,18631	0,001694	
Peg , Q	1018,42	1	1018,42	2,64429	0,179249	
Erreur	1540,56	4	385,14			

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

Tests Univariés de Significativité pour cytotoxicité (statistique) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	31740,83	1	31740,83	83,33895	0,000799	
Peg,Peg et Q	0,73	1	0,73	0,00193	0,967066	
Erreur	1523,46	4	380,86			

Annexes

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

Annexe 3 : Table ANOVA pour la présentation des extraits testés en groupes homogènes.

Test de Newman-Keuls ; variable cytotoxicité (statistique) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 135,50, dl = 22,000					
Cellule N°	extrait	cytotoxicité Moyenne	A	B	C
6	T negatif	0,00000			****
4	VQ	34,01000		****	
8	Q	47,02667	****	****	
7	C	61,17667	****		
9	V	62,37667	****		
11	VH	64,47333	****		
5	CQ	68,19667	****		
3	HQ	72,38333	****		
10	H	73,08333	****		
2	VC	76,08000	****		
1	HC	78,20000	****		