

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de diplôme de master en Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Biochimie appliquée

Thème

Activité antimitotique et antiproliférative des extraits aqueux des feuilles de l'oléastre (*Olea europaea sylvestris*) et de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea laperrinei*)

Travail réalisé par :

M^{elle} : AKARKAR DALILA

Devant le jury :

Président : M^{me} IRATNI AICHE G. Maitre de conférences classe B à l'UMMTO

Promoteur: Mr HOUALI K. Professeur à l'UMMTO

Co-promotrice : M^{elle} OUZID Y. Docteur en Biochimie-Microbiologie à l'UMMTO

Examineur : Mr MOUALEK I. Maitre de conférences classe B à l'UMMTO

Année universitaire : 2017-2018

Remercîments

Je tiens à remercier en premier lieu le bon Dieu tout puissant de m'avoir donné la santé, la volonté et le courage pour réaliser ce travail

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui m'ont aidés et soutenus en particulier :

*Mon promoteur : **Monsieur HOUALI K. Professeur à l'UMMTO** d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir accueillis dans son Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de la faculté des sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques.*

***Madame IRATNI-AICHE G. Maitre de conférences B à l'UMMTO** d'avoir accepté de présider la soutenance et je la remercie également pour sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse, qu'elle trouve ici ma reconnaissance et mon respect.*

***Madame OUZIDY. Docteur en Biochimie-Microbiologie à UMMTO** pour avoir accepté de m'aider dans mon travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.*

***Monsieur MOUALEK I. Maitre de conférences B à l'UMMTO**, pour avoir accepté d'examiner mon travail.*

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

Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma famille pour son soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagné et soutenu durant ces années de formation

Merci d'être toujours là pour moi.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ANOVA : Analyse de la Variance.

DO : Densité Optique.

GTP : Guanosine triphosphate.

G1 : Gap 1(intervalle 1).

G2 : Gap 2(intervalle 2).

IM : Indice Mitotique.

MTOC : Centres Organiseurs de Microtubules.

MTT : [3-(4, 5 dimethylthiazol -2 - yl) -2, 5- diphenyl tetrazolium bromide].

NA₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de Sodium (Phosphate Disodique).

8-OHDG : 8-hydroxydesoxyguanosine.

p: p-value (la Valeur de probabilité).

PC-3 : Human Prostate Cancer cell line.

SDS :Dodécyl Sulfate de Sodium.

SM : Solution mère.

UFC : Unité formant colonnie.

DU-145 :Human Prostate Cancer cell line.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formes des fruits, feuilles, inflorescence et arbre de l'oléastre(A) : Fruits verts, (B) : Fruits murs, (C) : inflorescence, (D) : Arbre.....	5
Figure 2 :L'olivier de Laperrine (A) : pied d'olivier de Laperrine dans la station de Hoggar, (B) : fruits matures sur un arbre dans son habitat nature	16
Figure 3 : Les différentes phases de cycle cellulaire.....	10
Figure 4 : Les différentes phases de la mitose.....	12
Figure 5 : formation des microtubules	13
Figure 6 : Description de l'instabilité dynamique des microtubules.....	13
Figure 7 : Structure chimique de la colchicine.....	14
Figure 8 :Composés agissant au site de la colchicine.....	15
Figure 9 : Structure chimique de quelques vinca -alcaloïdes	16
Figure 10 : Structure chimique de Taxol.....	17
Figure 11 : Structure chimique des composés agissant au site des taxoïdes	17
Figure 12 : Structure générale des flavonoïdes	18
Figure 13 : Structure chimique de la quercetine.....	19
Figure 14 :Structure de la curcumine.....	20
Figure 15 :Structure de la catéchine.....	20
Figure 16 :Racines des bulbes d'oignon en contact avec l'eau	21
Figure17 : Différentes étapes suivi pour la mise en évidence de l'activité antimitotique..	26
Figure 18 : Cellule Malassez sous microscope optique.....	28
Figure 19 : Les conditions stériles de travail.....	29
Figure 20 : Préparation de la plaque stérile de l'activité antiproliférative- MTT	30

Figure 21: Indices mitotiques des différents extraits testés.....	32
Figure 22 : Les différentes phases de la mitose observées chez les cellules méristématiques des racines d' <i>Allium cepa</i>	33
Figure 23 : Anomalies chromosomique et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>A. cepa</i> traitées par la colchicine.....	34
Figure 24 : Anomalies chromosomique et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>A. cepa</i> traités par l'extrait aqueux des feuilles d' <i>O. sylvestris</i>	35
Figure 25: Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d' <i>A. cepa</i> traités par l'extrait aqueux des feuilles d' <i>O. laperrinei</i>	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Structure chimiques des composés bioactifs les plus abondants dans l'extrait des feuilles d'olivier lyophilisé.....	8
Tableau II : Solvants et réactifs utilisés	22
Tableau III: Indices mitotiques des différents extraits testés	31
Tableau IV: Taux de mortalité et de viabilité en présence des extraits végétaux.....	39

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Première partie : Partie bibliographique

I. Etude bibliographique sur *Olea europaea sylvestris* et *Olea europaea laperrinei*..... 3

1.1. Généralités..... 3

1.2. Classification botanique 3

1.3. *Olea europaea subsp sylvestris* 4

1.3.1. Description botanique 5

1.3.2. Ecologie et répartition géographique 5

1.4. *Olea europaea subsp laperrinei* 6

1.4.1. Description botanique 6

1.4.2. Répartition géographique 7

1.5. Etude phytochimique de l'espèce *Olea europaea L.*..... 7

1.6. Activités biologiques..... 9

II. La mitose.... 10

2.1. Description du cycle cellulaire 10

2.2. Les différentes phases de la mitose 10

2.2.1. La prophase 11

2.2.2. La métaphase..... 11

2.2.3. L'anaphase 11

2.2.4. La télophase.....	12
2.3. Tubuline et microtubules.....	12
2.4. Les inhibiteurs d'origine végétale de la mitose.....	13
2.4.1. Les alcaloïdes	14
2.4.2. Les vinca-alcaloïdes	15
2.4.3. Les taxoïdes.....	16
2.5. Action cytotoxique et antiproliférative des composés naturels.....	18
2.5.1. Effet cytotoxique	18
2.5.2. Molécules d'origine végétale à effet cytotoxique	18

Deuxième partie : Partie expérimentale

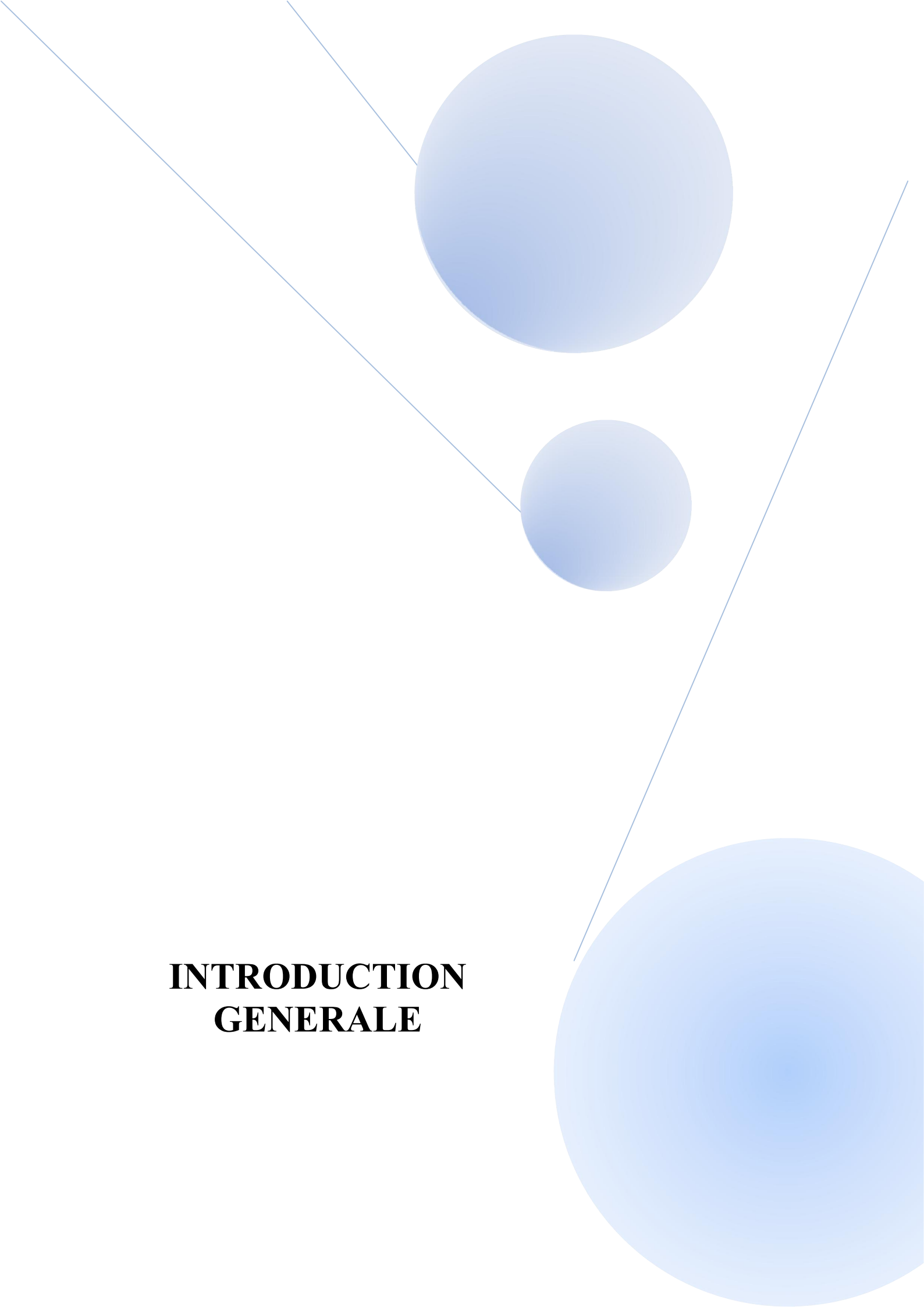
I. Matériel et méthodes.....	21
1.1. Matériels.....	21
1.1.1. Matériel biologique	21
1.1.1.1. Feuilles des deux espèces de plante <i>Olea europaea L</i>	21
1.1.1.2. Racines des bulbes d'oignon	21
1.1.1.3. Levure <i>saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.1.2. Solvants et réactifs	22
1.1.3. Milieu de culture des levures	23
1.1.4. Petit matériel de laboratoire	23
1.1.5. Appareillage.....	23
1.1.5.1. Microscope optique	23
1.1.5.2. Spectrophotomètre	23
1.1.6. Analyse statistique.....	24

1.2. Méthodes	24
1.2.1. Extraction aqueuse	24
1.2.2. Détermination de l'activité antimitotique	24
1.2.3. Détermination de l'activité antiproliférative-MTT	27
1.2.3.1. Préparation et standardisation de la suspension de levure	27
1.2.3.2. Préparation de la plaque stérile	29
II. Résultat et discussion.....	31
2.1. L'activité antimitotique	31
2.1.1. Etude statistique de l'activité antimitotique	38
2.2. Activité antiproliférative-MTT.....	38
Conclusion.....	41

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

An abstract geometric design featuring three blue circles of varying sizes and three thin blue lines. One line connects the top-left corner to the top circle. Another line connects the top-right corner to the middle circle. A third line connects the bottom-right corner to the bottom circle. The circles are positioned in the upper and lower right areas of the page.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques, parmi ces métabolites secondaires, on a les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes (MOHD NOR *et al.*, 2016). Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins. Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie (HANS, 2007).

Aujourd'hui, parmi les maladies incurables qui représentent un problème majeur de la santé publique, le cancer qui constitue la cause majeure de décès dans le monde, il résulte d'un dérèglement des mécanismes qui régulent le comportement normal de la cellule (ANTOINE, 2005). Les agents chimio- thérapeutiques présentent de nombreux inconvénients. En effet, ils sont très toxiques pour une large gamme de cellules normales et sont souvent associés à des effets indésirables. Par conséquent, les produits d'origine végétale ont émergés comme une alternative (KIM *et al.*, 2016).

Les antimétabolites sont des médicaments utilisés pour leurs propriétés anticancéreuses, ils sont utilisés dans le cadre d'une chimiothérapie, ils sont capables de détruire les cellules cancéreuses et de freiner leur multiplication. Par contre, les molécules à effet cytotoxique sont utilisées dans le but d'inhiber la prolifération cellulaire.

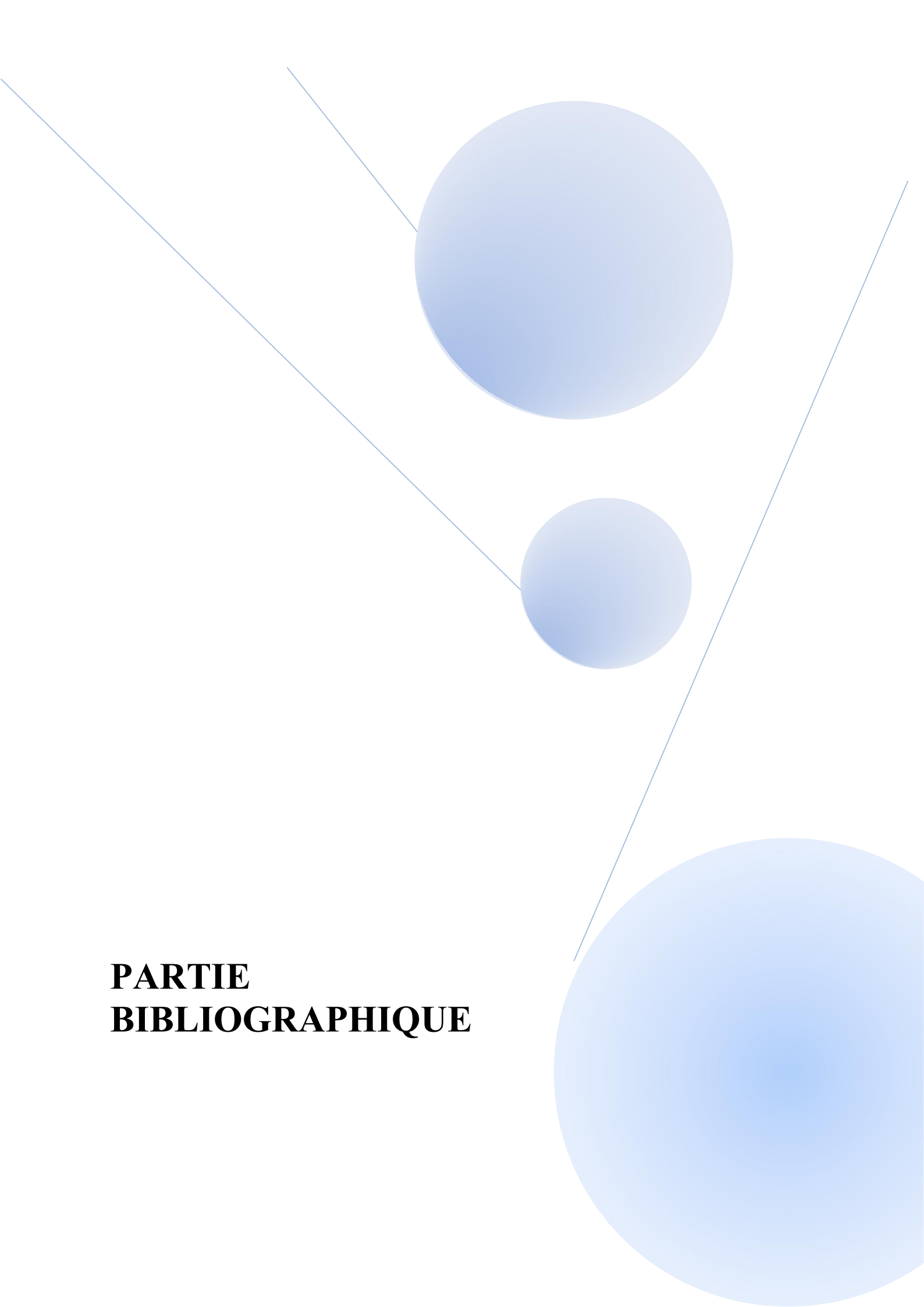
L'olivier (*Olea europaea L.*) est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité. L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive qui est utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques (DJENANE *et al.*, 2012). Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques. L'olivier est considéré donc comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques (BISIGNANO *et al.*, 1999). Les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques comme l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et d'autres flavonoïdes. Ces composés possèdent de nombreuses activités biologiques : antioxydantes, antibactériennes, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antitumorales (ARAB et BOUCHENAK, 2013 ; BENNNI-KABCHI *et al.*, 2000 ; HANENE *et al.*, 2015 ; ZERIOU *et al.*, 2017).

INTRODUCTION GENERALE

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à deux plantes médicinales à savoir *Olea europaea sylvestris* et *Olea europaea laperrinei*.

Notre objectif dans ce travail est l'évaluation *in vitro* de :

- L'effet antimitotique des extraits aqueux foliaires d'*Olea europaea sylvestris* et d'*Olea europaea laperrinei* sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa*.
- L'effet antiprolifératif-MTT des deux extraits foliaires sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

An abstract geometric design featuring three blue circles of varying sizes and three thin blue lines. One line runs diagonally from the top left towards the center. Another line runs diagonally from the top center towards the middle right. A third line runs diagonally from the top right towards the bottom right. The circles are positioned such that they appear to be connected or related by these lines. The largest circle is at the top center, a medium-sized circle is below it and to the left, and a large circle is at the bottom right.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Etude bibliographique sur *Olea europaea sylvestris* et *Olea europaea laperrinei*

1.1. Généralités

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'un des plus anciennes cultures de la région méditerranéenne où il a occupé depuis la préhistoire une place majeure dans la culture de cette région. *Olea* aurait persisté dans des zones refuges thermophiles situées dans les régions sud du nord du bassin méditerranéen, au sud du Levant et le nord de l'Afrique (CARRION *et al.*, 2010). Des derniers travaux rapportent que l'espèce a commencé à se développer dans le niveau bioclimatique thermo-méditerranéen (11,500-8800 avant J-C). Au nord, il est limité par le froid et le gel alors qu'au sud, la culture est limitée par les conditions arides et sahariennes (AMOURETTI et COMET, 1998). Malgré cela, sa culture a dépassé le bassin méditerranéen et a été exportée dans plusieurs pays du monde tels l'Afrique du Sud, l'Argentine, l'Australie et les Etats unis, (HAOUANE, 2012).

Depuis l'antiquité, l'olivier a été une essence des plus utiles pour toutes les populations du pourtour Méditerranée, qui utilisaient son bois, ses feuilles et ses fruits. Les feuilles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits, des tisanes, et des poudres. Ils contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs (WAINSTEIN *et al.*, 2013). Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète au cours de la grossesse ou en cas d'obésité (GHEDIRA, 2008). Les feuilles aussi, ont été largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme. Ces propriétés comme : antioxydantes, anti-hypertensives, anti-inflammatoires, hypoglycémiques et hypocholestérolémiantes. Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes (GHANBARI *et al.*, 2012).

1.2. Classification botanique

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "*Olea*" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon GHEDIRA (2008) est la suivante :

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre: *Olea* L.

Espèces: *Olea europaea* L.

Dans l'espèce *Olea europaea* L. six sous-espèces ont été identifiées, de l'Afrique du Sud à la Chine, à travers les montagnes du Sahara, la Macaronésie et le bassin Méditerranéen (GREEN, 2002; BESNARD et al., 2008), ces sous espèces sont :

- *Subsp. Europaea* : comprend deux variétés *europaea* (olive cultivée) et *sylvestris* (olive sauvage) : présent dans le bassin Méditerranéen;
- *Subsp. Cuspidate* : s'étend du sud-est de l'Asie au sud-ouest de la Chine, et de la péninsule arabique à travers l'Afrique de l'Est et du Sud ;
- *Subsp. Laperrinei*: uniquement dans la région du Sahara;
- *Subsp. Maroccana*: uniquement au Maroc;
- *Subsp. Cerasiformis*: uniquement dans l'île de Madère;
- *Subsp. Guanchica*: dans les îles Canaries.

1.3. *Olea europaea* subsp *sylvestris*

L'oléastre (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) est la forme sauvage de l'espèce (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sativa*) (BRETON et BERVILLE, 2012).

1.3.1. Description botanique

L'olivier sauvage est un arbuste toujours vert et vivace qui croît spontanément dans les bois méditerranéens (Figure1). Ses rameaux sont épineux et de section presque carrée. Les feuilles sont simples, ovales, persistantes et opposées, elles sont blanc argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure. Elles sont plus petites que celles de l'olivier cultivé. Les fleurs sont petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées (GHERIB, 2014). Les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (BRUNETON, 1999 ;GHEDIRA, 2008). Ils sont également plus petits, avec une faible épaisseur de pulpe, et ils donnent donc peu d'huile. De par sa faible hauteur, les fruits de l'oléastre sont facilement consommés par les animaux (COMTE, 1990).

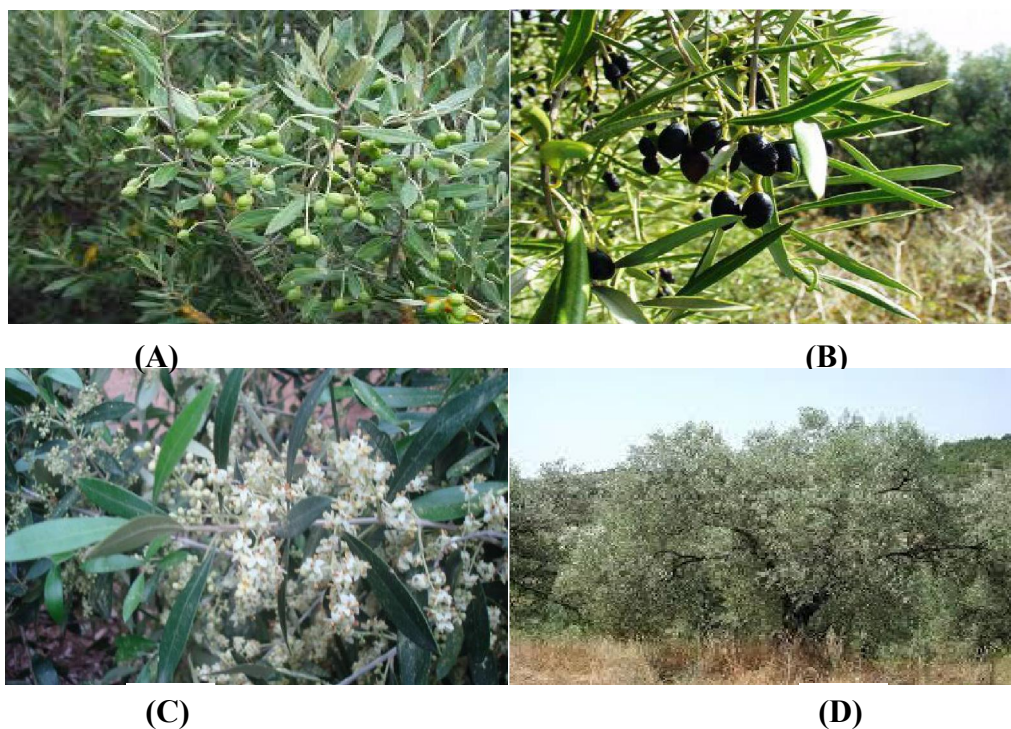


Figure 1 : Formes des fruits, feuilles, inflorescence et arbre de l'oléastre (A) : Fruits verts, (B) : Fruits murs, (C) : inflorescence, (D) : Arbre (GHERIB, 2014).

1.3.2. Ecologie et répartition géographique

L'olivier sauvage, ou oléastre, est un élément caractéristique de la végétation méditerranéenne. On le rencontre, souvent en mélange avec de nombreux individus féraux, dans les matorrals et boisements des zones méditerranéennes xérophiles. Son extension géographique est donc plus réduite que celle de l'olivier cultivé. Il est actuellement présent

dans le Maghreb, le sud de la péninsule ibérique, les îles de la Méditerranée, le sud de l'Italie, le Péloponnèse, les côtes de Grèce, de Turquie, du Levant et du nord de la Lybie, beaucoup plus sporadiquement sur le littoral nord méditerranéen (ZOHARY *et al.*, 2012). La présence de l'olivier sauvage est considéré comme le meilleur bioindicateur de la flore de la région de la méditerranée (RUBIO *et al.*, 2002).

D'un point de vue écologique, les populations d'olivier sauvage jouent un rôle dans la protection des sols contre la désertification à cause de leur grande résistance au vent et à la sécheresse, leur habilité de repousser après un feu ou un gel et particulièrement leur très grande longévité qui leur permet de vivre jusqu'à plusieurs milliers d'années (MULAS, 1998).

1.4. *Olea europaea subsp laperrinei*

1.4.1. Description botanique

L'olivier de Laperrine est une espèce endémique des massifs montagneux du Sahara Central, cet arbuste de 1 à 4 m de hauteur peut donner de petits fruits peu charnus (Figure 2). Habituellement arbuste rabougris dans les stations rupicoles, il peut atteindre 4 m dans les stations favorables proches des nappes phréatiques. Arbuste à feuilles linéaires-lancéolées et à fruits plus petits que l'olive et à noyau à peine coriace. Diffère de l'oléastre par ses feuilles lancéolées-linéaires avec un mucron très développé, par ses inflorescences toujours axillaires, par son noyau à endocarpe mince et fragile. Peut atteindre une taille arborescente remarquable, souvent en forme de buissons (BENCHELAH *et al.*, 2006)

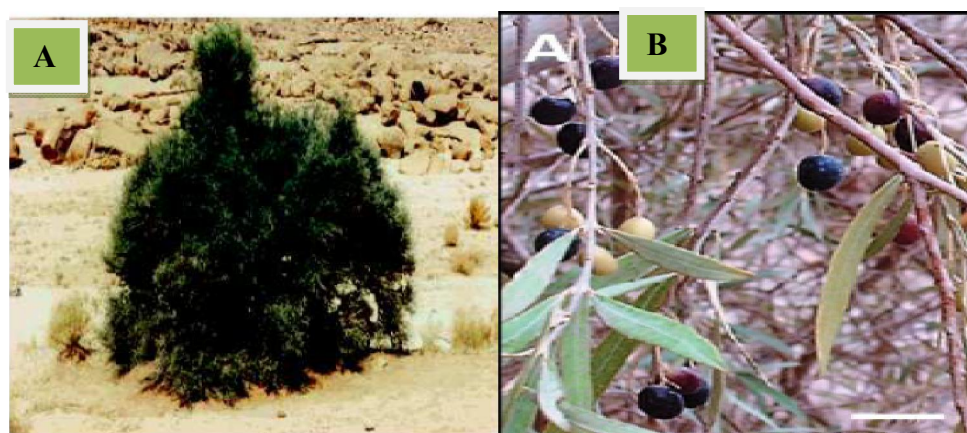


Figure2 : L'olivier de Laperrine (A) : pied d'olivier de Laperrine dans la station de Hoggar (BAALI-CHERIF, 2007), (B) : fruits matures sur un arbre dans son habitat naturel (BESNARD *et al.*, 2012).

1.4.2. Répartition géographique

Selon BAALI-CHERIF (2007), Cet arbre se rencontre dans trois régions:

- Le Sahara central (Algérie), dans toutes les régions montagneuses situées au-dessus de 1500 m d'altitude, il est fréquent dans le massif du Hoggar surtout dans les massifs granitiques (Taessa, Aheleheg), il est abondant sur le sommet du tafedest et il est rare dans le mouydir ;
- Les massifs de l'aire (Niger) où il a été indiqué principalement dans les massifs du Greboun, du Bagzane et du Tamgak ;
- Soudan dans le Djebel Marra et le Gourgeil.

1.5. Etude phytochimique de l'espèce *Olea europaea* L.

Les fruits de l'olivier (*Olea europaea* L.) et ses produits dérivés représentent une source connue de plusieurs composants naturels d'une bioactivité importante (BOUAZIZ *et al.*, 2005), tels que les antioxydants dont les caroténoïdes, les tocophérols, les flavonoïdes et les composants phénoliques, parmi lesquels les plus abondants sont les secoiridoides comme l'oleuropéine et le diméthyleuropéine (BIANCO et UCCELLA, 2000).

La composition des feuilles d'olivier en composés bioactif change selon son origine, conditions climatiques, le mode de séchage, le temps et les types de solvants d'extraction et les conditions de stockage (ALTIOK, 2010).

Les feuilles d'olivier contiennent plusieurs classes de composés phénoliques qui présentent des structures très variables :

a) Monomères phénoliques

Selon ALTIOK *et al* (2008), les monomères phénoliques sont représentés par les acides phénoliques (acide caféique, acide vanillique et acide syringique), les alcools phénoliques (tyrosol et hydroxytyrosol) et des flavonoïdes (Apegenine, luteoline et rutine).

b) Polymères phénoliques

Ils sont représentés par les tannins (qui sont classés en deux groupes majeurs : les tannins solubles et les tannins condensés) (GARRO-GALVEZ *et al.*, 1997) et la lignine.

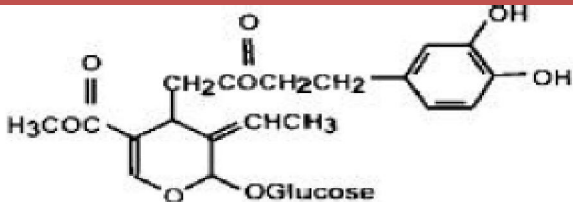
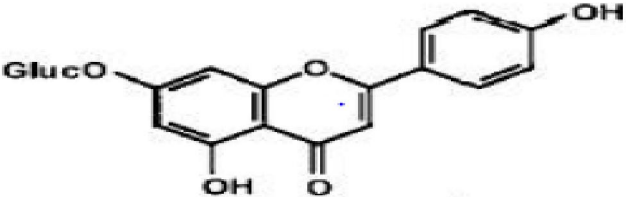
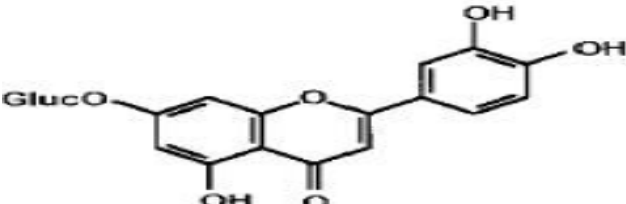
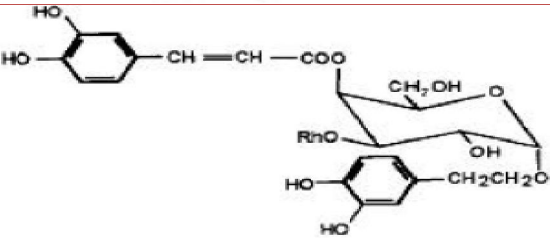
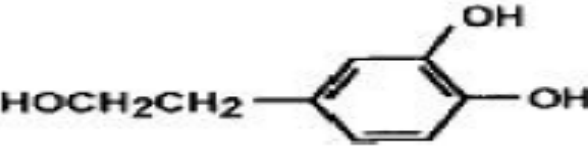
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

c) L'oleuropéine

L'oleuropéine ou l'oleuropeoside, un hétéroside secoiridoide, est présent dans l'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margines et grignons). C'est le composé bioactif le plus abondant et majeur dans les feuilles d'olivier, la teneur moyenne varie de 60-90 mg/g (TALHAOUI *et al.*, 2015).

Le tableau I résume les composés bioactifs les plus abondants des feuilles d'olivier avec leur teneur et structures chimiques.

Tableau I : Structure chimiques des composés bioactifs les plus abondants dans l'extrait des feuilles d'olivier lyophilisé (PEREIRA *et al.*, 2007).

Composé phénolique	Teneurs (mg/kg)	Structure chimique
Oleuropéine	26471.4	
Apeginin-7-glucoside	2333.1	
Luteolin-7-glucoside	1355.9	
Verbascoside	966.1	
Hydroxytyrosol		

1.6. Activités biologiques

L'olivier et ses dérivés peuvent être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels et qui peut être utilisé dans l'industrie pharmaceutique (SAVARESE *et al.*, 2007).

Les feuilles d'olivier et l'huile d'olive diminuent l'incidence des maladies du cœur (COOK et SAMMAN, 1997). De nombreuses activités ont été attribuées à la plus part des composants phénoliques de l'olivier, ils agissent comme des agents antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux et anti-cancérogènes (VISIOLI *et al.*, 2002). Les polyphénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc dans leurs extraits (POLZONETTI *et al.*, 2004). Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence, et à la résistance à l'oxydation (VISIOLI *et al.*, 2002). Les feuilles d'olivier possèdent la plus forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre d'olivier, ils présentent aussi une concentration importante en composants à haute valeur (SAVOURNIN *et al.*, 2001). Il est mentionné par certains auteurs que l'extrait de feuille d'olivier réduit la pression artérielle et le cholestérol du plasma chez les rats (PERRINJAQUET-MOCCHETTI *et al.*, 2008). De plus, les acides gras monoinsaturés disponibles dans les feuilles d'olivier tels que l'acide oléique, diminuent les lipides du plasma dont les LDL et VLDL et préviennent des maladies cardio-vasculaires (HUANG et SUMPIO, 2008). Les feuilles contiennent aussi du cinchonidine, un alcaloïde quinoléique aux propriétés antipaludiques. Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent l'oleuropéine qui possède des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes, antiseptiques, anti-inflammatoire, antimicrobiennes et anti tumorales (Ghedira, 2008 ; PEREIRA *et al.*, 2007 ; VISIOLI *et al.*, 2002 ; HAMDY et CASTELLON, 2005).

II. La mitose

2.1. Description du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire correspond à l'ensemble des étapes par lesquelles passe une cellule pour former deux cellules filles possédant le même patrimoine génétique (KARP, 2004). Il est composé de deux phases principales : l'interphase et la mitose (Figure 3). Lorsque la cellule n'est pas engagée dans le cycle cellulaire, elle se trouve alors dans un état de repos appelé stade G₀ (COLOMBEL, 2009).

Selon NORBURY et NURSE (1992), l'interphase se divise en trois parties et peut durer jusqu'à une semaine:

- la phase G₁ (Gap 1) où la cellule synthétise les matériaux nécessaires à sa division ;
- la phase S (Synthèse) au cours de laquelle la cellule duplique son matériel génétique ;
- la phase G₂ (Gap 2) pendant laquelle la cellule fabrique les protéines nécessaires à la division cellulaire comme la tubuline.

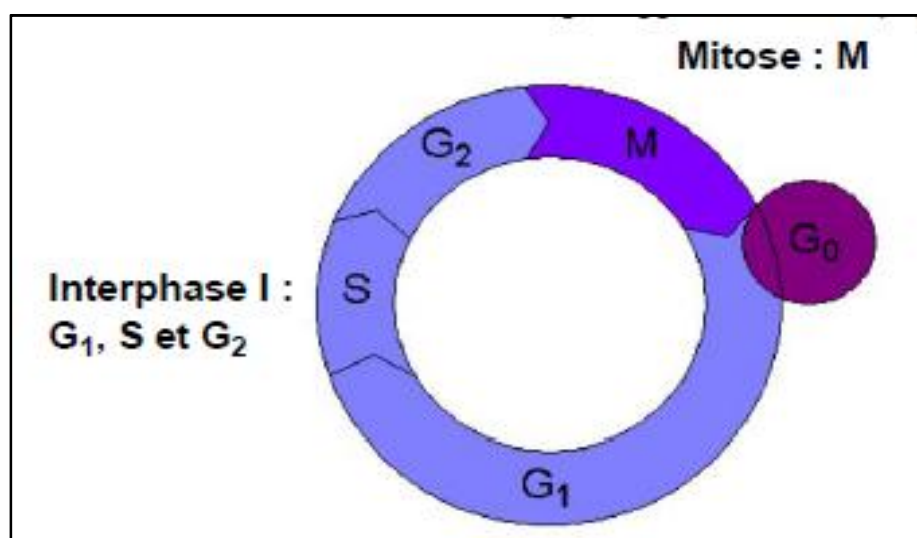


Figure 3: Les différentes phases de cycle cellulaire (COLOMBEL, 2009).

2.2. Les différentes phases de la mitose

La mitose est une étape clé du cycle cellulaire qui s'effectue de façon rapide (environ 1 heure), très préservée chez toutes les cellules eucaryotes, durant laquelle le matériel génétique de la cellule (les chromosomes) réparti de manière égale dans les deux cellules

filles. Cette équipartition du matériel génétique est cruciale pour le maintien de la stabilité génétique (MARY, 2015).

La mitose se déroule en quatre étapes reconnaissables morphologiquement, à savoir : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 4) (ESSAD, 1977; BRUNORI, 1967 ; HALLET, 1983).

2.2.1. La prophase

La prophase est caractérisée par une réorganisation de la chromatine qui se condense en chromosomes compacts facilement visibles en microscopie photonique. Chaque chromosome est constitué de deux chromatides sœurs réunies au niveau du centromère, la cohésion entre les chromatides sœurs étant indispensable au partage équitable du génome qui aura lieu plus tardivement en anaphase (ROUBINET, 2011).

Une autre caractéristique de la prophase correspond à la maturation des centrosomes riches en tubuline, ils constituent des centres organisateurs de microtubules (MTOC), qui s'écartent et migrent progressivement de façon diamétralement opposée (DOXSEY *et al.*, 2005).

2.2.2. La métaphase

Durant cette phase, l'enveloppe nucléaire disparaît (prométaphase). Les chromosomes se retrouvent dans le cytoplasme. Ils se lient aux microtubules par une protéine appelée kinétochore puis s'alignent sur le plan équatorial de la cellule pour former la plaque métaphasique (COLOMBEL, 2009).

Selon CLAUDE CALLEN (2005), le degré de condensation et la visibilité maximale des chromosomes sont atteints à la métaphase de la mitose. C'est à ce stade qu'ils illustrent le mieux l'organisation discontinue du génome eucaryotique, c'est aussi à ce stade qu'ils sont les plus faciles à analyser par simple écrasement de la cellule, car l'enveloppe nucléaire a disparu et ils s'étalent sans problème dans les préparations cytologiques.

2.2.3. L'anaphase

L'anaphase marque la ségrégation des chromatides sœurs de chaque chromosome, en deux lots égaux de chromosomes à une chromatide, qui migrent vers les pôles opposés du fuseau. Dans un premier temps, appelé anaphase A, les microtubules kinétochoriens se

dépolymérisent et tractent les chromatides vers chacun des pôles. Puis dans un second temps, appelé anaphase B, les microtubules polaires s'allongent par polymérisation éloignant de ce fait l'un de l'autre les deux pôles du fuseau (CHEESEMAN et DESAI, 2008).

2.2.4. La télophase

Durant cette phase les microtubules kinétochoriens se détachent, les chromosomes se décondensent et retournent à leur état initial de brins d'ADN (MARY, 2015). Deux enveloppes nucléaires se forment autour des chromosomes fils. Les autres microtubules s'allongent jusqu'à la formation de deux cellules filles (COLOMBEL, 2009).

Les microtubules sont donc des éléments clés de la cellule. La perturbation de leur instabilité dynamique a pour conséquence de bloquer la division cellulaire en métaphase et conduire ainsi à l'apoptose. Il est donc intéressant d'un point de vue médical de synthétiser des molécules pouvant agir au niveau de cet équilibre (LUCH, 2002).

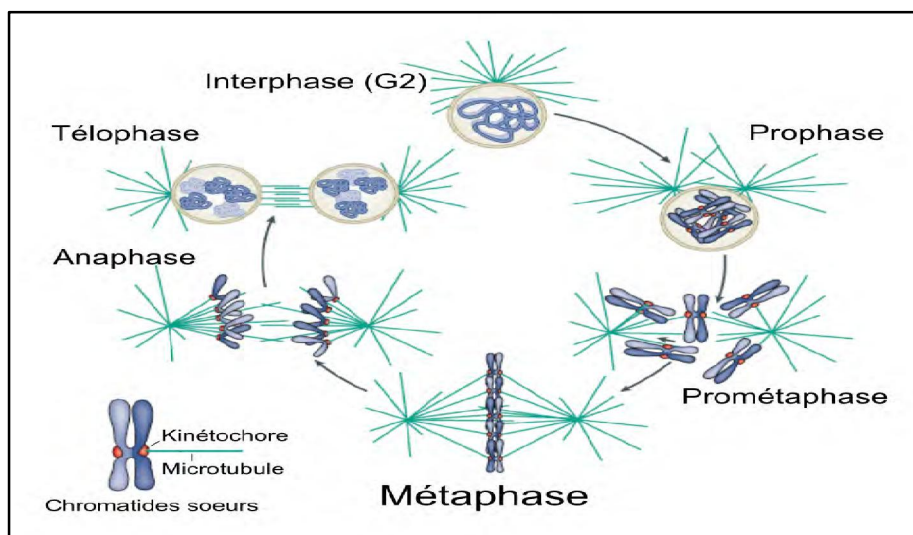


Figure 4 : Les différentes phases de la mitose (CHEESEMAN et DESAI, 2008).

2.3. Tubuline et microtubules

De nombreuses molécules antimitotiques utilisées en thérapie anticancéreuse se lient spécifiquement à la tubuline ou aux microtubules et altèrent leur dynamique, ce qui entraîne un blocage de la division cellulaire (ANTOINE, 2005).

La tubuline est une protéine hétérométrique, constituée de deux sous unités α et β (environ 50 kDa chacune). Ces dimères forment des protofilaments qui après élongation conduisent à la formation de microtubules (13 protofilaments) (Figure5). Ces polymères

linéaires sont des tubes creux de 25 nm de diamètre et qui peuvent aller jusqu'à quelques μm de longueur (NOGALES *et al.*, 1999).

Les microtubules sont formés de tubuline, protéine qui polymérise spontanément en présence de GTP et se dépolymérise en présence d'ions calcium (Figure 6) (JANIN, 1993).

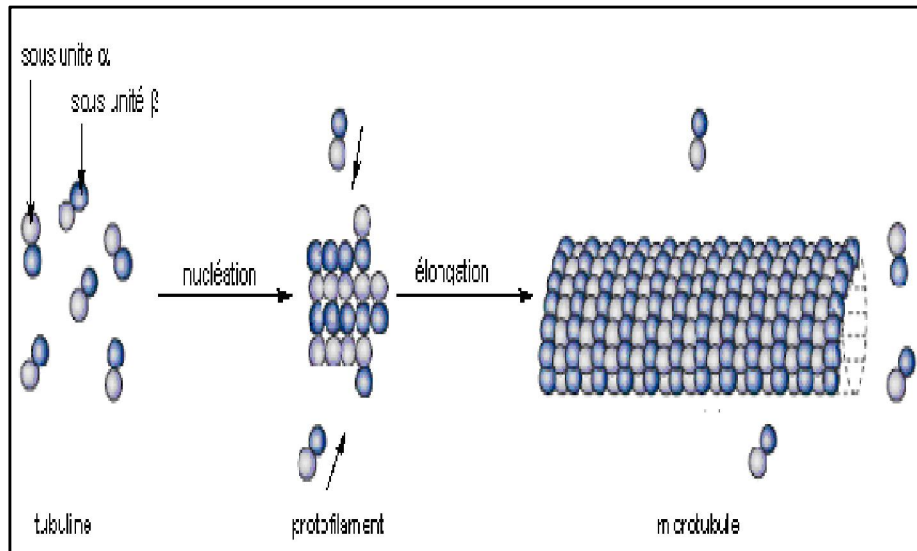


Figure 5 : formation des microtubules (NOGALES *et al.*, 1999).

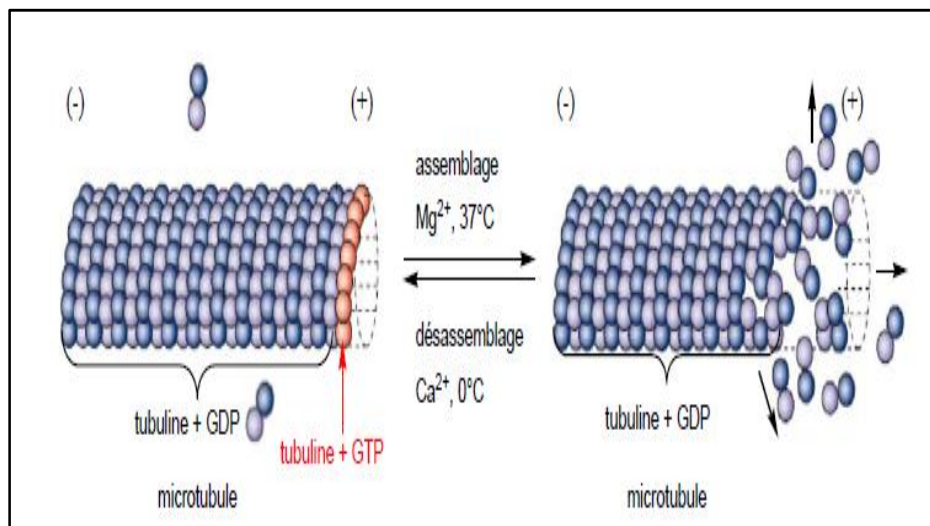


Figure 6: Description de l'instabilité dynamique des microtubules (NOGALES *et al.*, 1999).

2.4. Les inhibiteurs d'origine végétale de la mitose

Les inhibiteurs de la mitose sont divisés en trois groupes : les alcaloïdes, les vinca-alcaloïdes et les taxoïdes (HAMEL, 1996 ; KINGSTON, 2009). En raison de leur fort intérêt

thérapeutique, la synthèse ou l'hémisynthèse d'analogues de ces molécules, fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches (BECKERS et MAHBOOBI, 2003).

2.4.1. Les alcaloïdes

Selon BRUNETON (1999), Les alcaloïdes sont des molécules de structures complexes cycliques et azotées, relativement stables plus ou moins basiques. Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentre dans la vacuole. Généralement, ils sont produits dans les tissus en croissance puis sont véhiculés dans les différentes parties de la plante. Les alcaloïdes sont insolubles dans l'eau. Ils constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Ils peuvent être classés en fonction de leur précurseur. On distingue ainsi trois grandes classes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes, selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent un atome d'azote dans un hétérocycle.

La colchicine est un alcaloïde et le premier composé antimitotique naturel à avoir été découvert. Cette molécule est extraite d'une plante *Colchicum autumnale* qui était utilisée pour ses effets thérapeutiques en Egypte, en Inde et en Grèce. Elle est caractérisée par une structure tricyclique benzo-cyclohéptanotropolonique, sa formule brute est $C_{22}H_{25}NO_6$ (Figure7). Sa haute toxicité ne permettant pas son utilisation à d'autres fins thérapeutiques, mais elle est utilisée pour le traitement de la goutte. La colchicine se lie sur l'hétérodimère de tubulines engendrant un changement conformationnels qui gêne la formation des microtubules, elle empêche ainsi la formation du fuseau mitotique, ce qui engendre l'arrêt de la mitose en métaphase (JORDAN, 2002 ; BECKERS et MAHBOOBI, 2003 ; HADFIELD *et al.*, 2003).

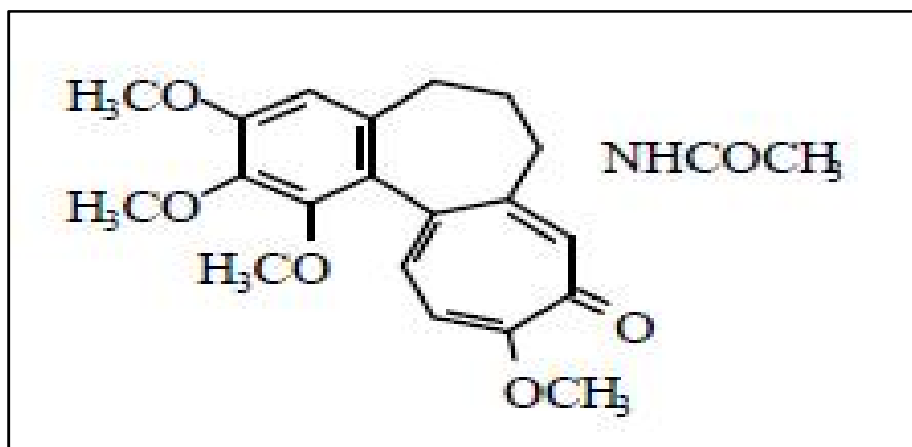


Figure 7: Structure chimique de la colchicine (JANIN, 1993).

Selon SACKETT(1993), Plusieurs composés naturels d'origine végétale sont connus pour se lier sur le même site que la colchicine (Figure 8), parmi eux :

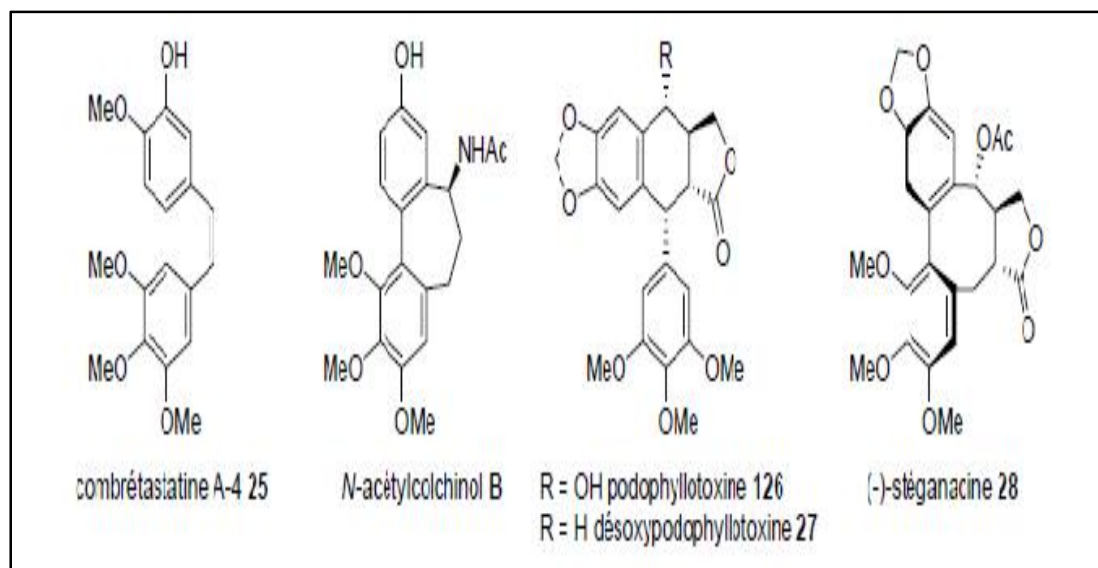


Figure 8: composés agissant au site de la colchicine (SACKETT, 1993).

2.4.2. Les vinca-alcaloïdes

Les vinca-alcaloïdes ou alcaloïdes de la pervenche (vinblastine, vincristine, vindésine, navelbine) sont les premières molécules antimitotiques identifiées provoquant des anomalies au niveau du fuseau mitotique. Ils sont utilisés depuis plus de trente ans en chimiothérapie anticancéreuse. Elles appartiennent à la classe des alcaloïdes terpenoïdes indoliques qui sont constitués de deux sous-unités indoliques (Figure 9). D'une façon générale ces composés provoquent l'arrêt de la mitose au stade de la métaphase. Le fuseau mitotique ne peut se former et les chromosomes restent dispersés dans le cytoplasme (JORDAN, 2002 ; SVOBODA, 1977).

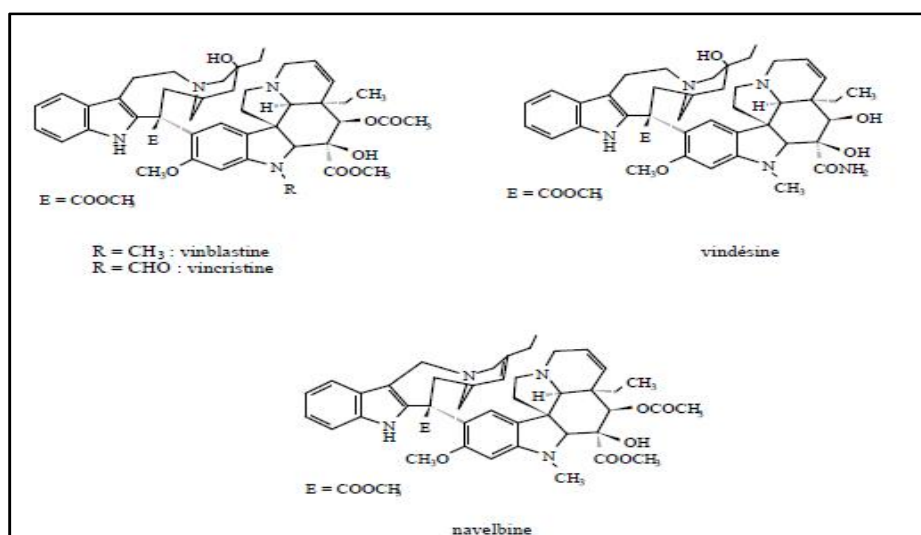


Figure 9: Structure chimique de quelques vinca alcaloïdes (JANIN, 1993).

2.4.3. Les taxoïdes

Une autre famille de composés d'origine naturelle, agit également sur la tubuline. Ce sont les taxoïdes dont le chef de file est le paclitaxel (Taxol) qui est un composé diterpénique appartenant à la sous-classe des taxanes. Cette sous-classe de composés se caractérise par la présence d'un squelette taxène du type méthano-benzocyclodécène polyoxygéné (WANI *et al.*, 1971). Les molécules qui se fixent sur la tubuline au site des taxoïdes sont des composés qui stabilisent les microtubules et empêchent ainsi leur dépolymérisation, ce qui a pour effet de stopper le processus de la division cellulaire entre la métaphase et l'anaphase. Cette action ne conduit pas obligatoirement à la mort de la cellule. Ces composés se lient sur la sous-unité β à l'intérieur du tube que forment les microtubules (DABYDEEN *et al.*, 2005 ; ALTMANN et GERTSCH, 2007).

Le Taxol est un diterpène (Figure 10) qui a été découvert en 1971 (WANI *et al.*, 1971). Il s'agit d'un composant du tronc de l'if du pacifique *Taxus brevifolia*. Son mode d'action sur les microtubules a été démontré pour la première fois en 1979 par SUAN HORWITZ et ses collaborateurs (SCHIFF *et al.*, 1979). Ce composé est utilisé pour le traitement de quelques cancers, à savoir : le cancer de sein, de l'ovaire et des poumons (WANI *et al.*, 1971).

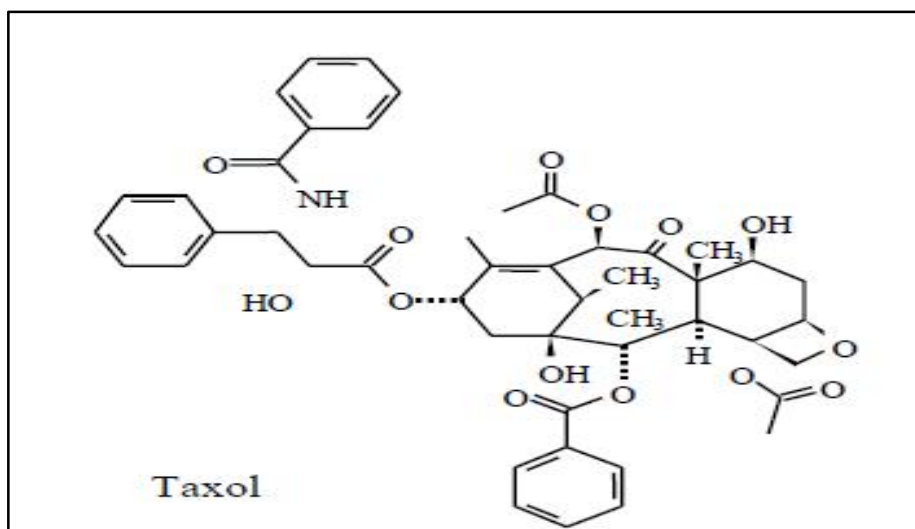


Figure 10 : structure chimique de Taxol (SLICHENMYER, 1991).

Une autre famille de composés se liant au site des taxoïdes est représentée dans la figure ci dessous :

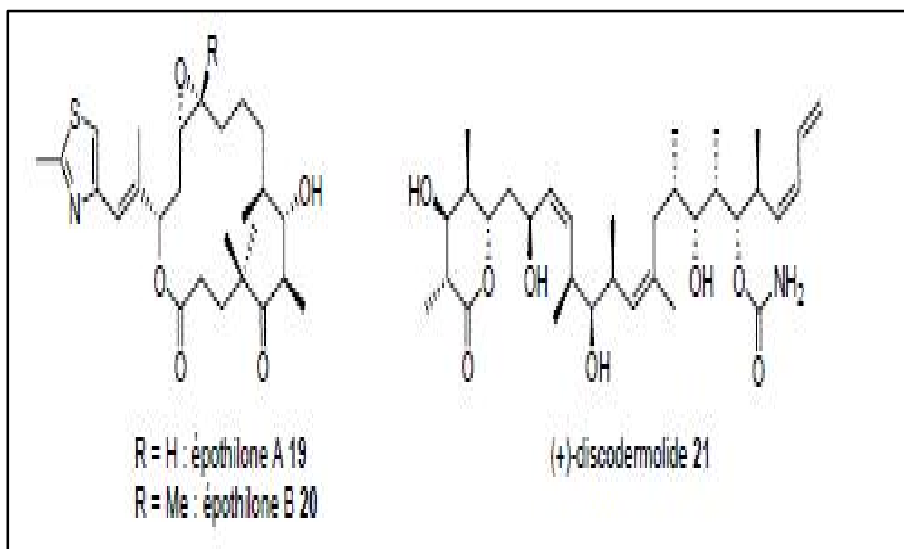


Figure 11 : Structure chimique des composés agissant au site des taxoïdes (NICOLAOU *et al.*, 1998 ; KALESSE,2000 ; SMITH et FREEZE ,2008).

2.5. Action cytotoxique et antiproliférative des composés naturels

2.5.1. Effet cytotoxique

D'après BENAMAR (2009), La mort cellulaire, reste une des préoccupations essentielles de la toxicologie moderne. Elle est particulièrement importante dans les études *in vitro*, pour comprendre ou prévoir les effets toxiques observés *in vivo*. Sur le plan moléculaire, des modifications de la structure des molécules biologiques, causées par l'interaction directe ou indirecte avec l'agent toxique, peuvent être détectées. Sur le plan biologique, ce sont les altérations fonctionnelles des cellules et leur retentissement sur l'homéostasie de l'individu qui sont observées. L'observation du fait que des dommages cellulaires sévères, provoqués par divers toxiques, n'entraînent pas obligatoirement la mort de toute la population cellulaire exposée, montre que d'autres facteurs de protection et de réparation, particuliers à chaque cellule, sont à prendre en compte. Ce n'est que lorsque ces défenses cellulaires sont débordées qu'un processus dégénératif s'installe, aboutissant à la mort cellulaire. La cellule peut mourir par deux types de processus distincts: La nécrose et l'apoptose.

2.5.2. Molécules d'origine végétale à effet cytotoxique

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui appartiennent à la famille des polyphénols qui compte presque 8000 composés polyphénoliques naturels (STALIKAS, 2007). Sont des phénylbenzo-pyrones (phénylchromones) (Figure 12). Leur structure moléculaire, C6-C3-C6, comprend deux noyaux aromatiques, A et B, liés par un hétérocycle oxygéné C (HEIM *et al.*, 2002)..

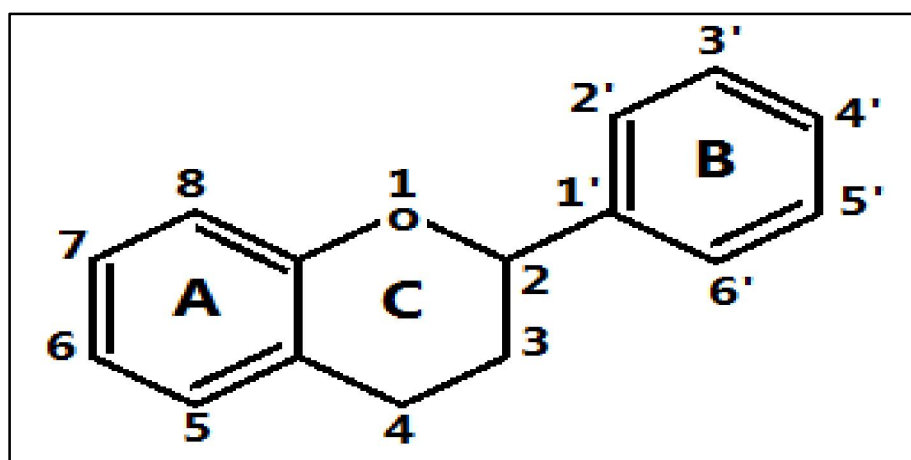


Figure 12: Structure générale des flavonoïdes (HEIM *et al.*, 2002).

Plusieurs études *in vitro* ont montré l'effet antiprolifératif et cytotoxique des flavonoïdes vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses ainsi qu'*in vivo*. En plus, l'effet anticancéreux des flavonoïdes observé *in vitro* a été confirmé par plusieurs études épidémiologiques. Ainsi, il a été démontré que la consommation des flavonoïdes diminue le risque et l'incidence de plusieurs types de cancers à savoir le cancer du sein (BOSETTI *et al.*, 2005 ; FINK *et al.*, 2007), le cancer du poumon (LE MARCHAND *et al.*, 2000), le cancer de la prostate (KNEKT *et al.*, 2002), le cancer de l'estomac (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 1999) et le cancer du rectum (ARTS *et al.*, 2001). Parmi eux :

➤ La quercétine

La quercétine est un flavonoïde de type flavonol, présenté sous forme hétéroside ou glycoside, autrement dit associé à un glucide (Figure 13). Elle figure parmi les milliers de pigments, origines de la coloration des légumes, des fruits et des fleurs. Sa teneur varie grandement d'une espèce végétale à une autre, en fonction de la variété cultivée, de la période de récolte, et des différentes conditions dans lesquelles les plantes ont poussé (ANONYME 1). La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du côlon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales (PIETTA, 2000 ; TOMOFUJI *et al.*, 2009).

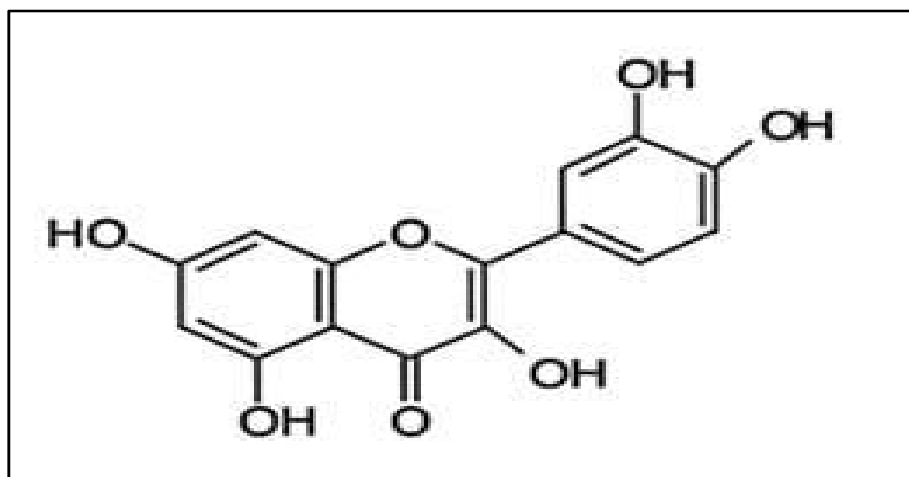


Figure 13 : Structure chimique de la quercétine (HEIM *et al.*, 2002).

➤ La curcumine

La curcumine (Figure 14) une molécule extraite de la racine de *Curcuma longa*, une plante originaire d'Asie, est utilisée depuis des siècles dans les cuisines et les médecines traditionnelles hindoues et chinoises. Cette molécule, tout d'abord reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires (REUTER *et al.*, 2009), est également capable d'induire la mort des cellules cancéreuses, principalement par apoptose (DUVOIX *et al.*, 2003 ; TEITEN *et al.*, 2010).

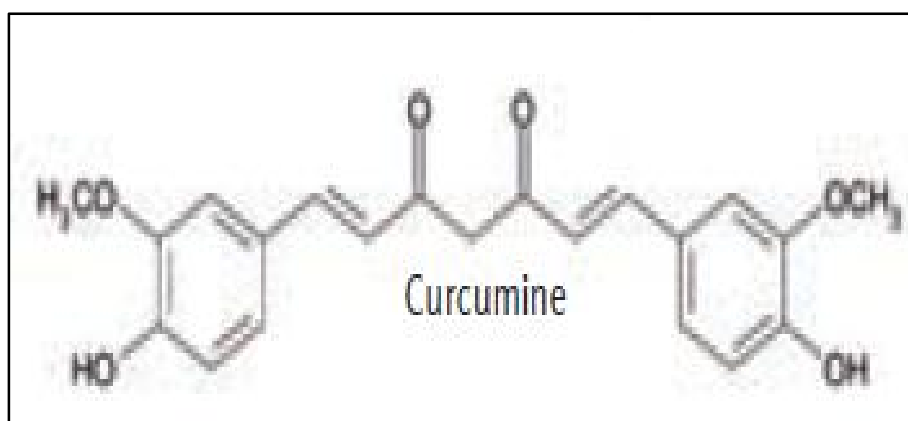


Figure 14: Structure de la curcumine (REUTER *et al.*, 2009).

➤ La catéchine

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallocatechingallate (EGCG) (Figure 15) (PIETTA, 2000 ; TOMOFUJI *et al.*, 2009).

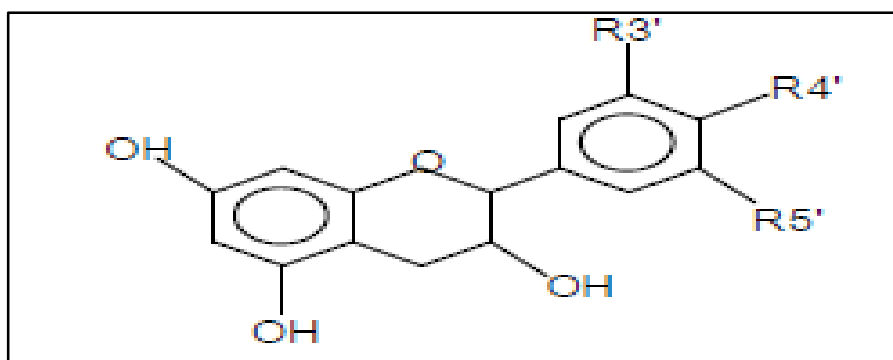
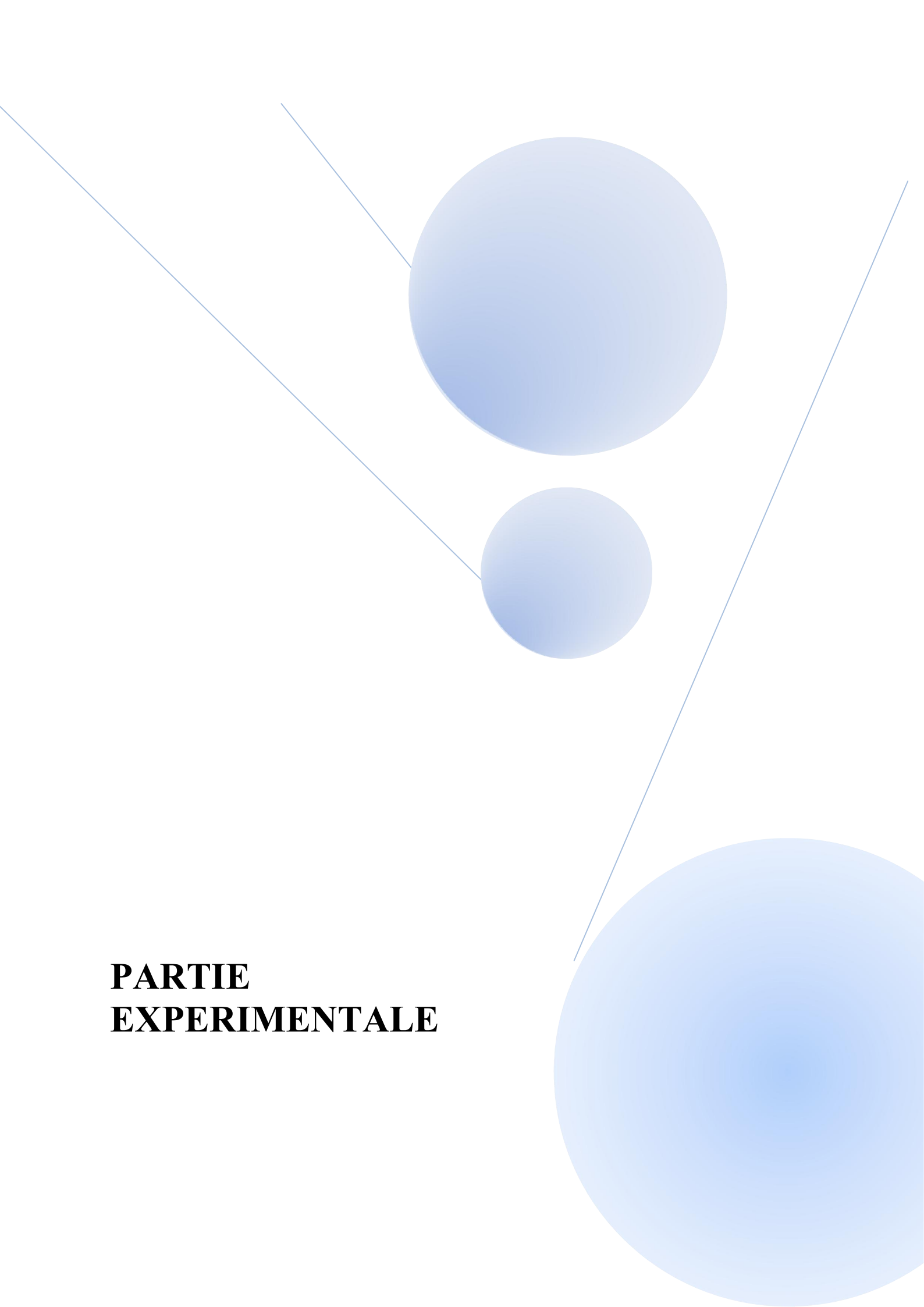


Figure 15 : structure de la catéchine (NARAYANA *et al.*, 2001; W- ERDMAN *et al.*, 2007).

An abstract geometric design featuring three blue circles of varying sizes and three thin blue lines. One line connects the top-left of the large upper circle to the top-left of the medium circle. Another line connects the top-right of the large upper circle to the top-right of the medium circle. A third line extends from the bottom-right of the large upper circle towards the bottom-right of the large lower circle. The circles are semi-transparent blue, and the lines are thin and light blue.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes

Au cours de cette étude nous nous sommes intéressés aux effets bénéfiques que l'on peut retrouver en exploitant des composés naturels. Nous avons évalué l'activité antimitotique et antiproliférative des extraits aqueux des feuilles de deux espèces d'une plante médicinale à savoir *Olea europaea sylvestris* du nord de la méditerranée et *Olea europaea laperrinei* de sud. Le choix de ces plantes est justifié par leur large utilisation en médecine traditionnelle.

1.1. Matériels

1.1.1. Matériel biologique

1.1.1.1. Feuilles des deux espèces de plante *Olea europaea L.*

Le matériel végétal utilisé au cours de l'expérimentation est représenté par des feuilles prélevées sur des pieds mère adultes de la station de Tamanrasset en été 2015 pour l'olivier de Laperrine, et de la région de Tizi-Ouzou en automne 2015 pour l'oléastre. Les feuilles récoltées sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité, elles sont par la suite coupées finement et broyées au moulin électromécanique ; la poudre qui en résulte sert de support à nos extractions.

1.1.1.2. Racines des bulbes d'oignon

Nous avons utilisé des racines des bulbes d'oignon sur lesquelles on a testé l'activité antimitotique des extraits aqueux des feuilles des deux espèces de plante *Olea europaea L.*, ces bulbes sont laissés dans l'eau pendant 3-4 jours pour avoir l'allongement des racines grâce à la zone méristématique où les cellules de cette zone se multiplient activement par mitose (Figure 16).



Figure 16 : racines des bulbes d'oignon en contact avec l'eau.

PARTIE EXPERIMENTALE

1.1.1.3. Levure *saccharomyces cerevisiae*

Dans le but de déterminer l'activité antiproliférative des extraits aqueux foliaires des deux plantes, on a utilisé de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* achetée lyophilisée et conservée dans des sachets pour qu'elle soit utilisée ultérieurement.

1.1.2. Solvants et réactifs

L'ensemble des solvants et réactifs utilisés, leurs composition ainsi que leurs rôles est résumés dans le tableau II suivant :

Tableau II : Solvants et réactifs utilisés.

Solvants et réactifs	composition	rôle
Colchicine	1mg de colchicine+1ml d'eau distillée	Inhibe la mitose en métaphase
Solution de fixation	10ml d'acide acétique(99%)+30ml de l'éthanol(96%)	A pour but de bloquer toute évolution de division cellulaire et permet de conserver l'intégrité structurelle des chromosomes.
Solution de coloration	0.5g de carmin+55ml d'eau distillée+45ml d'acide acétique	Colorer les noyaux des cellules méristématiques pour voir les différentes phases de division
MTT	50mg de MTT dans 5ml de milieu de culture (10 %)	Tester la viabilité des cellules de levure en transformant les sels de tetrazolium présente dans le MTT en cristaux de formazon
SDS	5g dans 50ml d'eau distillée stérile (10 %)	Dissocier les cristaux formés pour pouvoir compter par la suite le nombre des cellules mortes et vivantes.
Quercetine	10 mg de quercetine dans 5ml d'eau distillée stériles	Inhibe la prolifération des cellules.

PARTIE EXPERIMENTALE

1.1.3. Milieu de culture des levures

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu de culture des *Saccharomyces*, qui est un milieu acide (Ph=3.8) permet la croissance et le développement de la levure *saccharomyces cerevisiae*, sa composition est résumé et détaillée en Annexe1.

On mélange les composés sous agitation et chauffage pendant quelques minutes. Après un autoclavage de 20 min à 120°C pour éliminer tous les germes intempestifs susceptibles de contaminer le milieu, les flacons stériles sont conservés à +4°C.

1.1.4. Petit matériel de laboratoire

En plus de matériel usuel, on a utilisé également :

- La cellule de Malassez (ou Hématimètre de Malassez) qui 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.
- Une plaque stérile en polystyrène transparent contenant 12 puits (alignés en 4 rangées x 3 colonnes), avec couvercle, et un volume utile de chaque puit est de 2mL a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antiproliférative des extraits aqueux des deux plantes médicinales.

1.1.5. Appareillage

1.1.5.1. Microscope optique

Il est utilisé pour observer et compter le nombre des cellules en division pour calculer par la suite l'indice mitotique.

1.1.5.2. Spectrophotomètre

Permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement par la lecture de la densité optique (DO) à 560 nm.

1.1.6. Analyse statistique

Afin d'analyser statistiquement les données de cette étude, nous avons utilisé le logiciel STATISTICA version 7.1. La différence entre les échantillons étudiés a été déterminée par différents tests (test de MANN-WHITNEY, test ANOVA de KRUSKAL WALLIS et test de STUDENT) et les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

1.2. Méthodes

1.2.1.Extraction aqueuse

Les feuilles récoltées sont séchées à l'abri de la lumière, puis broyées avec un broyeur électrique. La poudre des feuilles est récupérée. 5g de poudre des feuilles de chaque espèce sont macérées dans 50mL d'eau distillé, le mélange est laissé sous agitation pendant 18-24h. Par la suite le mélange est filtré avec le coton, on obtient ainsi un extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea sylvestris* et un autre d'*Olea europaea laperrinei*. Ces extraits aqueux des feuilles sont conservés à l'abri de la lumière et dans le réfrigérateur. Cette solution correspond à la solution mère (SM), par la suite on a préparé 3 dilutions successives pour chaque extrait à savoir la dilution 1/2, 1/4 et 1/8.

1.2.2.Détermination de l'activité antimitotique

Pour la détermination de l'activité antimitotique de nos extraits végétaux aqueux nous sommes basés sur les travaux de (PING *et al.*, 2012) avec quelques modifications.

De jeunes racines de bulbes d'oignon sont mises en contact avec chacune des différentes dilutions (1/2, 1/4 et 1/8) de chaque extrait aqueux préalablement préparé pendant 24 h à température ambiante. Un témoin positif (constitué de racines mises en contact avec la colchicine à 1mg/ml) et un témoin négatif (constitué de racines mises en contact avec de l'eau distillée) sont également réalisés.

Après 24h d'incubation, les cellules méristématiques racinaires sont fixées puis colorées avec de carmin acétique. Enfin, on les observe avec le microscope optique (×400).

PARTIE EXPERIMENTALE

Le calcul de l'indice mitotique (IM) se fait selon la formule suivante :

$$\text{Indice mitotique(\%)} = \left[\frac{\text{Nombre de cellules en division}}{\text{Nombre totale des cellules}} \right] \times 100$$

Le schéma de protocole expérimental de l'activité antimitotique se résume dans la figure 17 présentée ci-dessous :

PARTIE EXPERIMENTALE

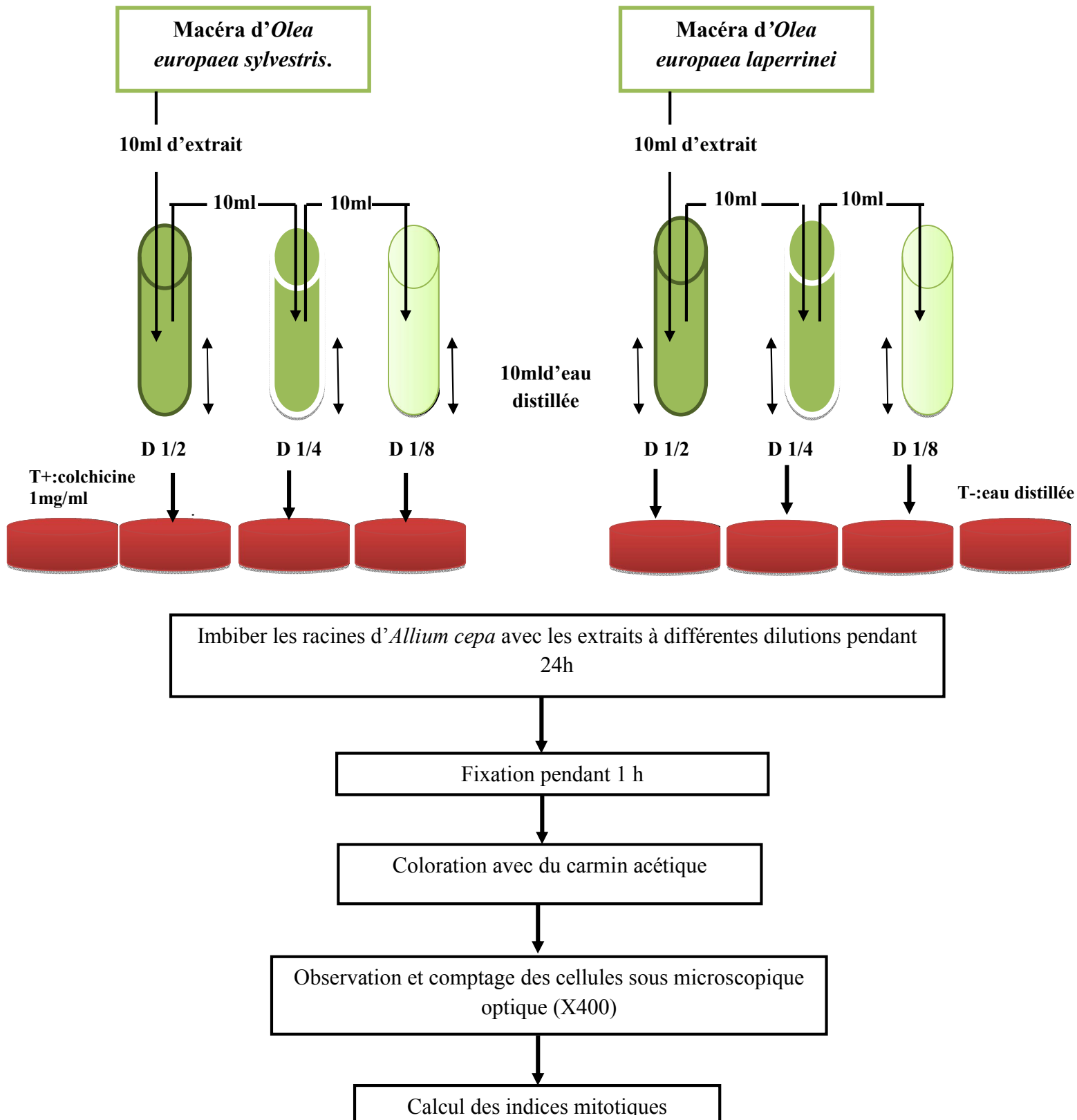


Figure17 : Différentes étapes suivi pour la mise en évidence de l'activité antimitotique.

1.2.3.Détermination de l'activité antiproliférative-MTT

Les méthodes les plus largement utilisées et les plus adaptées pour la mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire, sont celles qui utilisent les sels de tetrazolium. Pour cette étude nous avons utilisé la technique du MTT [3-(4, 5 dimethylthiazol -2 - yl) -2, 5-diphenyl tetrazolium bromide], méthode colorométrique appliquée pour la quantification de la prolifération cellulaire (CARMICHAEL *et al.*, 1987 ; MOSMANN, 1983)

Elle consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, qui réduit les sels de tetrazolium présente dans le MTT en cristaux de formazon. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Il suffit donc après l'incubation des cellules avec du MTT pendant un certain temps à 37 °C (environ trois heures) de dissoudre les cellules, leurs mitochondries et donc les précipités de Formazon violets dans du SDS. Un simple dosage de la densité optique à 560 nm par spectroscopie permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Le schéma réactionnel est détaillé en Annexe 2.

Pour la détermination de l'activité antiproliférative de nos extraits végétaux nous nous sommes basés sur les travaux de (HOSSEINPOUR *et al.*, 2013) avec quelques modifications.

1.2.3.1. Préparation et standardisation de la suspension de levure

Pour la mise en culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 2 à 3g de levure lyophilisé sont dissous dans 5 ml de milieu de culture et incubé à 28°C pendant 24h. La culture obtenue est standardisée à une DO entre 1.6-1.8 à une longueur d'onde de 560 nm correspondant à une concentration cellulaire de 10^7 UFC/ml, pour confirmer ce dénombrement nous avons procédé à un dénombrement sur cellule de Malassez qui a permis le comptage des cellules de levure à l'aide de l'équation suivante :

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

Dont :

N : c'est le nombre de cellules formant colonie par mL (UFC /ml)

PARTIE EXPERIMENTALE

n: nombre de cellules comptées

V : le volume de comptage (ml)

F : le facteur de dilution

Pour dénombrer les cellules de levure contenue dans la suspension, on place une lamelle de verre sur la cellule de Malassez, sur laquelle on dépose 10 μ l de suspension de levure. Après sédimentation des cellules, nous procédons à l'observation sous microscopique optique (X400).

Le comptage a été effectué dans 10 rectangles de la cellule de Malassez (Figure18). Le nombre de cellules retrouvé est de 942 cellules, sachant que la cellule de Malassez a 100 rectangles, on obtient :

Moyenne des cellules comptées = $942 / 10 = 94.2$ Cellules/ rectangle

Nombre des cellules totale = $100 \times 94.2 / 1 = 9420$ cellules/ μ l

Nombre des cellules totale par ml = $9420 \times 10^3 = 9.42 \times 10^6$ Cellules/ ml = 10^7 .

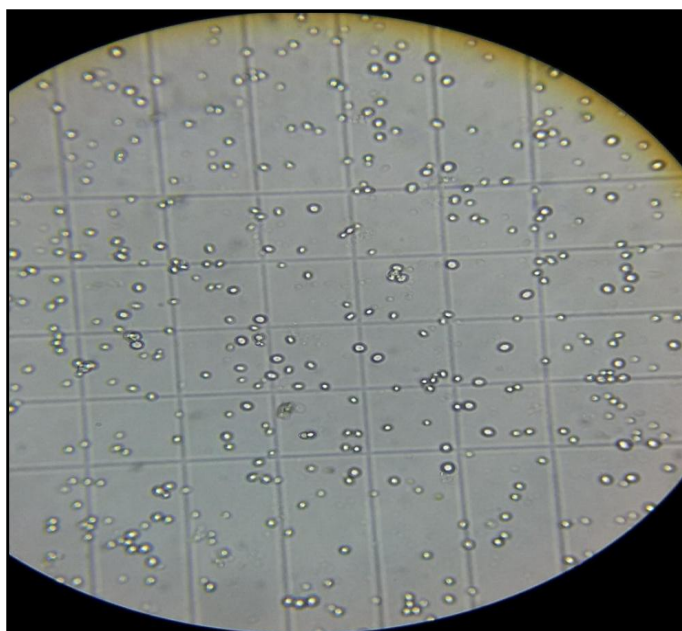


Figure 18 : Cellule Malassez sous microscope optique (X 400).

PARTIE EXPERIMENTALE

1.2.3.2. Préparation de la plaque stérile

Afin d'éviter toute contamination bactérienne tout le long de travail, on a travaillé dans des conditions stérile (Figure 19).



Figure 19 : Les conditions stériles de travail.

Dans une plaque stérile nous avons mis en contact 1 ml de chacun de nos extraits, préalablement stérilisés par filtration avec des filtres de 0.22µm de diamètre, avec 800µl de levure standardisée sous une agitation pendant 24 h à température ambiante. Après incubation on rajoute 200 µl de MTT à 10%, on laisse agir à 37°C pendant 3h. Après cette incubation on rajoute 700 µl de SDS. Un standard (l'extrait végétal est remplacée par de la quercetine) et un témoin négatif (l'extrait est remplacée par le milieu de culture) sont également réalisés. La viabilité des cellules de levure est déterminée par une lecture de la densité optique à 560 nm contre un blanc pour chaque échantillon.

Le pourcentage de viabilité est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{DO de l'essai} \times 100}{\text{DO de témoin négatif}}$$

PARTIE EXPERIMENTALE

La préparation de la plaque des témoins et des extraits végétaux est résumée dans la figure 20.

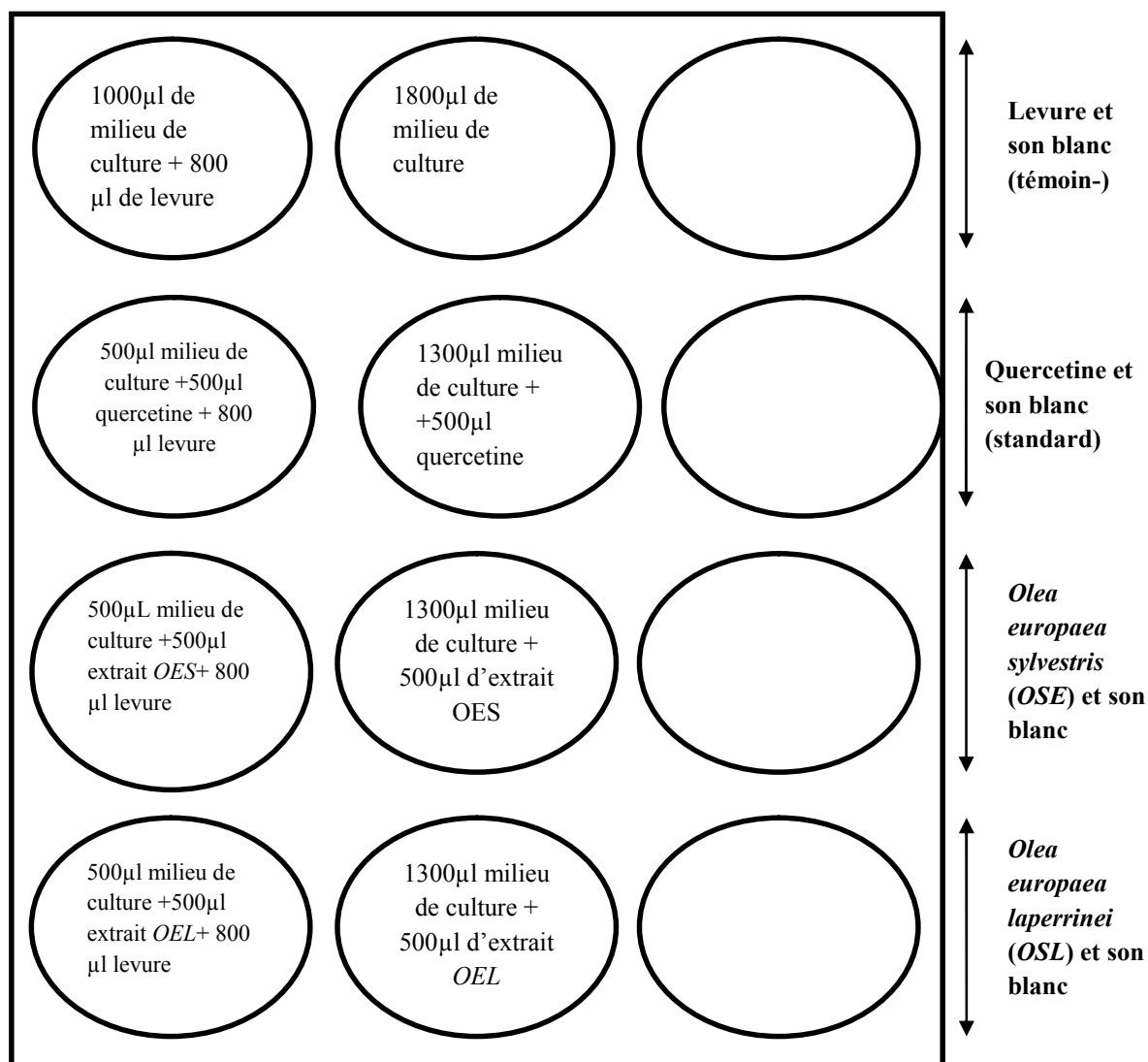


Figure 20: Préparation de la plaque stérile de l'activité antiproliférative- MTT.

PARTIE EXPERIMENTALE

II. Résultat et discussion

2.1. L'activité antimittotique

L'activité antimittotique des extraits aqueux des feuilles d'*Olea europaea sylvestris* et d'*Olea europaea laperrinei* qui est testée sur les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* est déterminée par le calcul de l'indice mitotique (IM) qui est défini par le rapport de cellules inhibées en mitose sur le total des cellules comptées (350 cellules).

Les cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* qui n'ont subi aucun extrait, mis dans de l'eau distillée représentant le témoin négatif. Ce dernier a donné un IM élevé qui est de $82,72 \pm 2,32\%$, tandis que leur contact avec le témoin positif (colchicine) a baissé l'IM jusqu'à $37,31 \pm 1,92\%$. Par ailleurs, l'exposition des cellules méristématiques racinaires à l'extrait aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* a donné un IM de $48,972 \pm 5,63\%$ à la dilution $\frac{1}{2}$, nous avons vu une augmentation de l'IM jusqu'à la valeur de $56,17 \pm 3,72\%$ à la dilution $\frac{1}{4}$, puis jusqu'à $62,514 \pm 4,04\%$ à la dilution $\frac{1}{8}$. D'autre part, leur contact avec l'extrait aqueux foliaire d'*O. laperrinei* a donné un IM de $49,088 \pm 2,89\%$ à la faible dilution d'extrait ($\frac{1}{2}$) qui a augmenté pour atteindre une valeur de $65,656 \pm 1,52\%$ à la dilution $\frac{1}{8}$ comme l'indique le tableau III.

Tableau III: Indices mitotiques des différents extraits testés.

Indice mitotique (IM $\pm$ ES)%			
Témoins	Eau distillé (T-)	$82,720 \pm 2,320$	
	Colchicine (T+)	$37,310 \pm 1,923$	
Plantes	<i>Olea europaea sylvestris</i>	D1/2	$48,972 \pm 5,63$
		D1/4	$56,17 \pm 3,72$
		D1/8	$62,514 \pm 4,09$
	<i>Olea europaea laperrinei</i>	D1/2	$49,088 \pm 2,89$
		D1/4	$59,94 \pm 2,32$
		D1/8	$65,656 \pm 1,52$

D : dilution

ES : erreur standard

PARTIE EXPERIMENTALE

L'indice mitotique est considéré comme un paramètre permettant d'estimer la fréquence de la division cellulaire au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* (MARCANO *et al.*, 2004).

La diminution de l'activité mitotique chez les cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* indique un effet mitodépressif de l'extrait aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* et d'*O. laperrinei*. L'activité antimitotique des deux extraits aqueux testés est marquée à la dilution $\frac{1}{2}$ où les indices mitotiques sont réduits de 33.75% en contact avec l'extrait aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* et de 33.63% pour l'extrait aqueux des feuilles d'*O. laperrinei* (Figure 21).

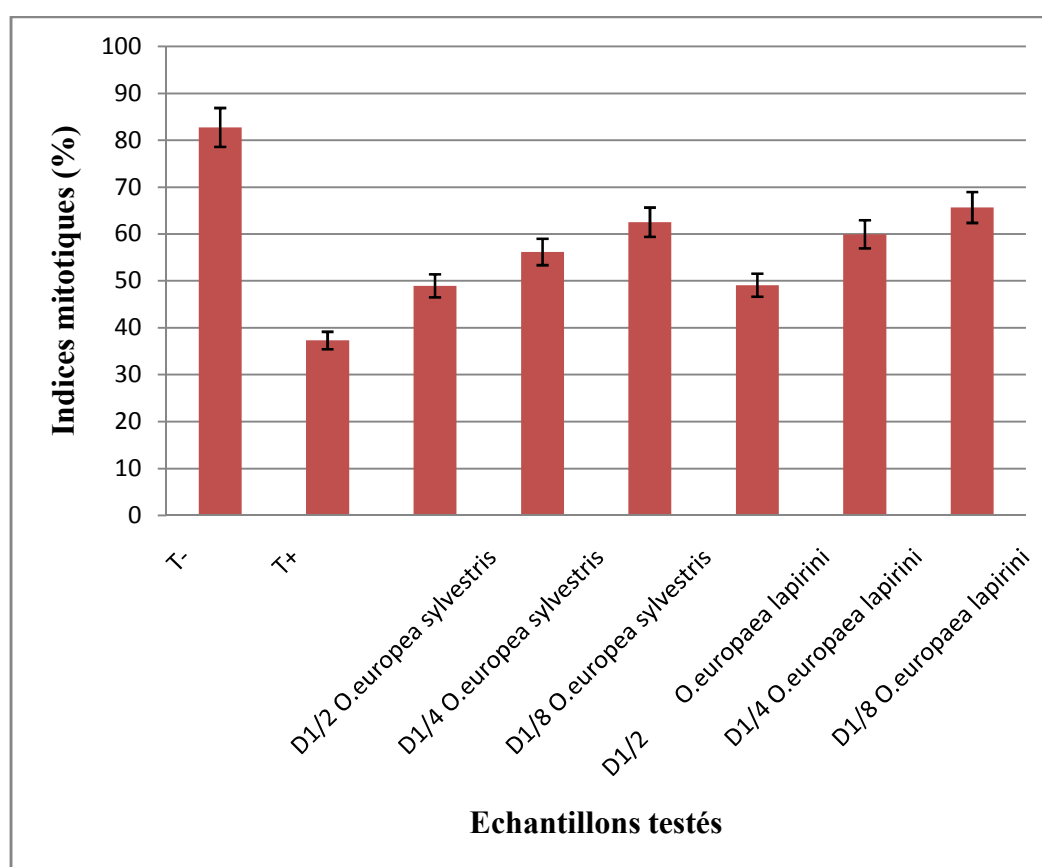


Figure 21 : Indices mitotiques des différents extraits testés.

Selon ANTONSIEWICZ (1990), quand l'indice mitotique diminue en dessous de 22% du témoin il provoque ce qu'on appelle un effet léthal sur les cellules en division. Une diminution de l'indice mitotique de 50 % par rapport au témoin est habituellement un effet sublétal (PANDA et SAHU, 1985) et est nommée «valeur limite de cytotoxicité» (SHARMA, 1983). Selon ces deux définitions on pourra déduire que l'extrait aqueux des feuilles

PARTIE EXPERIMENTALE

d'*O.sylvestris* et d'*O.laperrinei* est considéré comme sublétal pour les cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* à la dilution $\frac{1}{2}$.

La réduction de l'activité mitotique pourrait être due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et des nucléoprotéines du système biologique (CHAUHAN *et al.*, 1998). Selon SIDDIQUI *et al.* (2007), la diminution de l'indice mitotique est due probablement à une modification ou une altération dans l'expression de certains gènes.

Les observations microscopiques des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traitées avec l'eau distillée (témoin négatif) ont révélées la présence des quatre phases de la mitose à savoir : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 22).

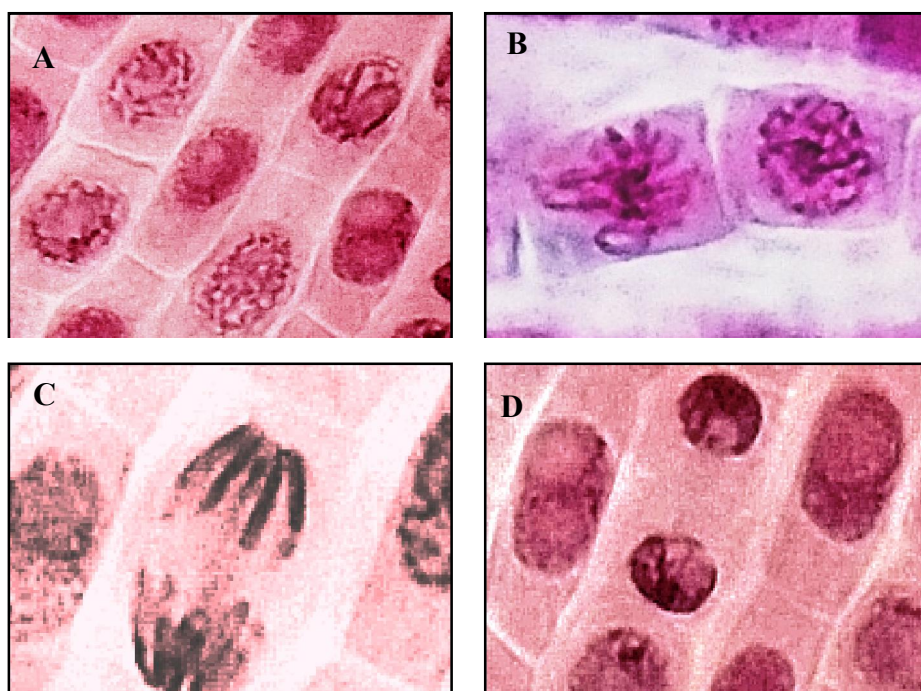


Figure 22 :Les différentes phases de la mitose observées chez les cellules méristématiques des racines d'*Allium cepa*($\times 720$).

(A) Prophase, (B) Metaphase, (C) Anaphase, (D) Télophase.

Le modèle expérimentale d'*Allium cepa* est l'un des meilleurs protocoles d'évaluation de l'activité antimitotique *in vitro*. Ce test est validé par le Programme de l'Environnement des Nations Unies (UNEP) et le Programme International de la Sécurité Chimique (IPCS), il

PARTIE EXPERIMENTALE

est utile pour toute étude préliminaire des substances anticancéreuses (KURAS *et al.*, 2006). En outre, les cellules végétales étant généralement plus grosses que les cellules animales et donc plus faciles à observer au microscope, ne soulevant pas de problèmes éthiques, facile à obtenir et peu coûteux.

Par ailleurs, l'exposition des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* à la colchicine a diminué l'IM jusqu'à $37,31 \pm 1,92\%$, générant des anomalies nucléaires, chromosomiques et cellulaires à savoir : des agglutinations chromosomiques, des allongements des cellules et rétrécissement du noyau, désorganisation chromosomique ainsi que des ponts chromosomiques (Figure 23).

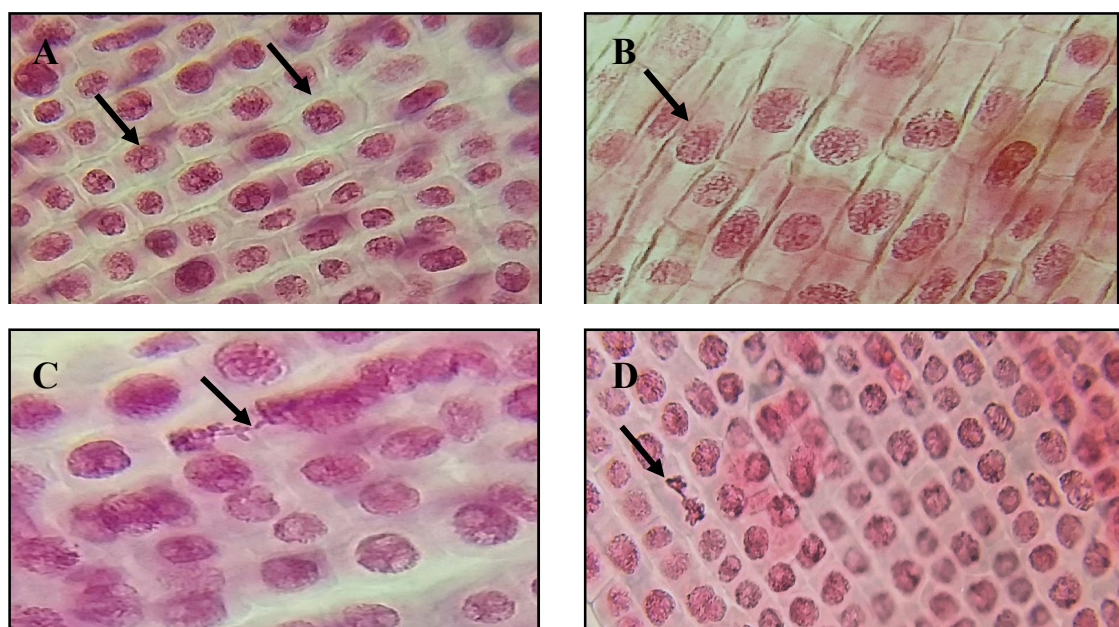


Figure 23 : Anomalies chromosomique et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traitées par la colchicine(X400).

(A) agglutination des chromosomes, (B) allongement des cellules et rétrécissement du noyau, (C) désorganisation chromosomique, (D) pont chromosomique

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines du colchique ; *Colchicum autumnal* L.(MAKHOULFI, 2016). Elle est utilisée couramment dans le traitement de différentes tumeurs tissulaires. Son action se résume par blocage de la formation du fuseau mitotique (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001). En se fixant sur une molécule de la tubuline,

PARTIE EXPERIMENTALE

elle empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance de ces dernières entraîne un blocage de la mitose au stade de métaphase (GARRETT et GRISHAM, 2000). Cette approche confirme le résultat de l'indice mitotique des cellules méristématiques racinaires traitées par la colchicine obtenu dans notre étude.

Les cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traitées par les extraits aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* et d'*O. laperrinei* à différentes dilutions, ont présentées des IM faibles à des faibles dilutions, accompagnés des aberrations nucléaires, chromosomiques et cellulaires dont les plus observées sont : allongement des cellules et rétrécissement de noyau, cellule gigantesque avec un petit noyau, désorganisation des chromosomes et des ponts chromosomique (Figures 24, 25).

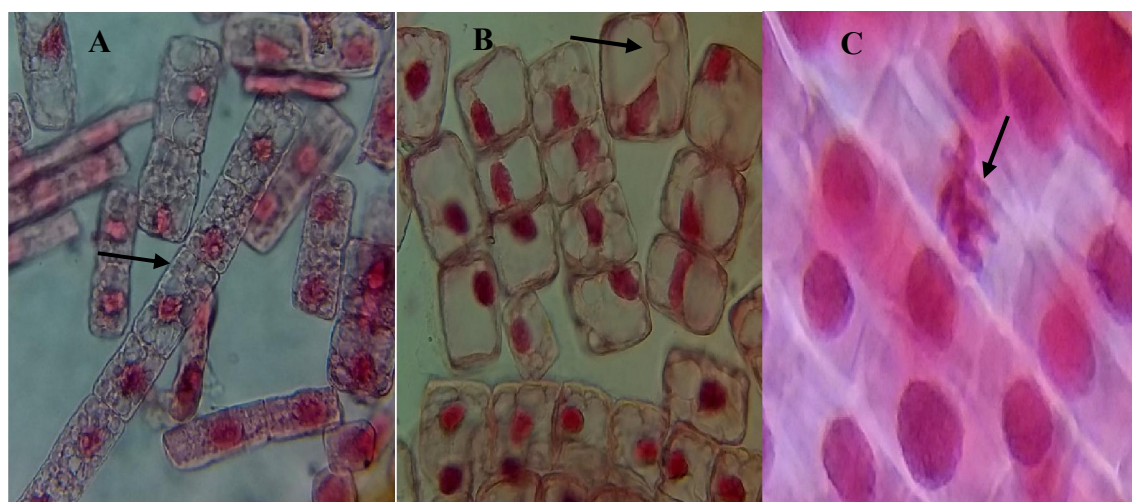


Figure 24: Anomalies chromosomique et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traités par l'extrait aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* ($\times 480$).

(A) allongement de cellule et rétrécissement de noyau, *(B)* cellule gigantesque avec un petit noyau, *(C)* désorganisation des chromosomes lors de la métaphase.

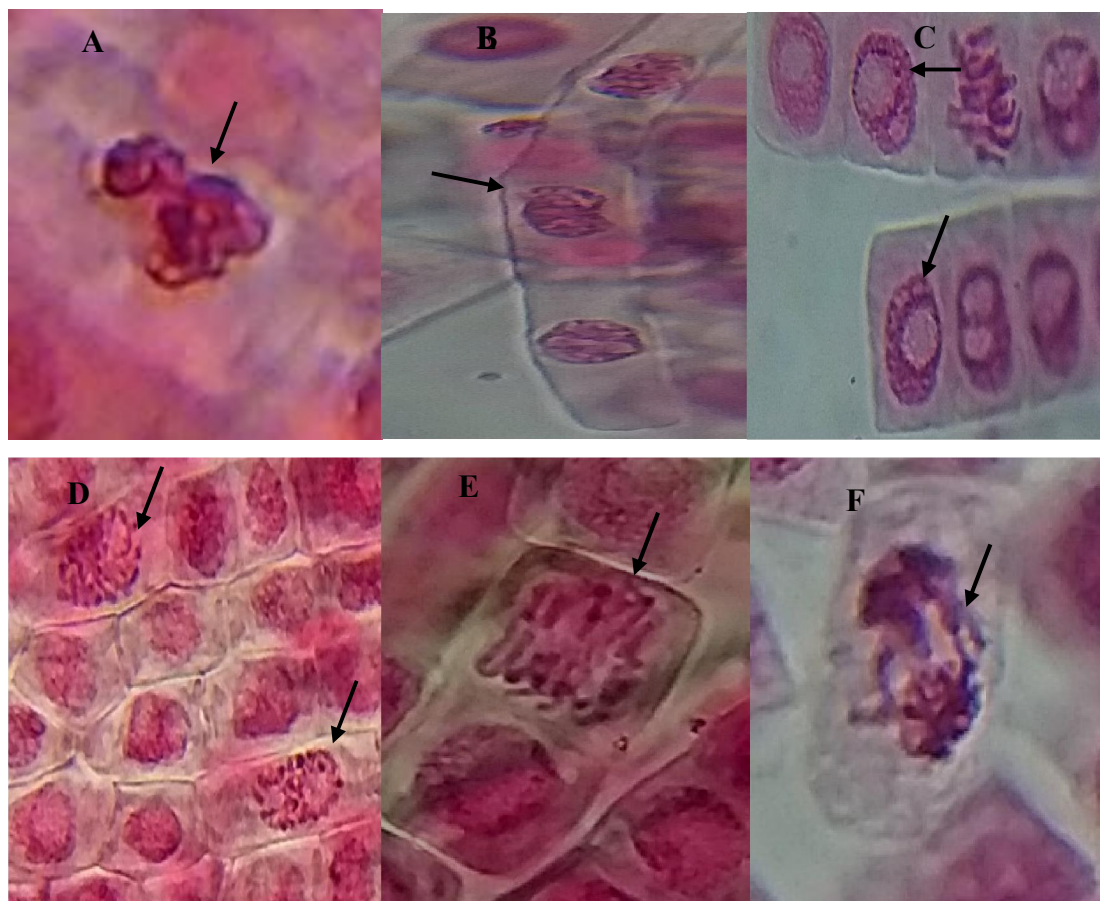


Figure 25: Anomalies chromosomiques et cellulaires observées au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traités par l'extrait aqueux des feuilles d'*O. laperrinei* (×720).

(A) condensation des chromosomes en télophase, (B) allongement de cellule et absence de cytotdiérèse, (C) agglutination des chromosomes, (D) désorganisation des chromosomes en prophase (E) fragmentation de chromosomes, (F) pont chromosomique.

L'augmentation du nombre de prophases chez des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traitées par l'extrait aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* et d'*O. laperrinei* laisse suggérer selon D'AMATO (1954), que cela est dû, soit à une durée de traitement trop longue, soit à l'utilisation de doses trop élevées, ce qui aboutit au ralentissement de l'engagement des cellules aux autres stades de la mitose, notamment : la métaphase, l'anaphase et la télophase.

Le blocage de la mitose en prophase a été observé également chez des cellules méristématiques de *Pisum sativum* L. traitées par le cadmium, (FUSCONI *et al.*, 2006). L'augmentation du nombre de prophase doit probablement être reliée à une intense altération

PARTIE EXPERIMENTALE

de microtubules en empêchant l'assemblage des chromosomes au stade métaphase (FUSCONI *et al.*, 2006).

D'après DEYSSON (1956), les phénomènes de l'inhibition prophasique sont classés en trois degré :

- Le premier degré est caractérisé par une action qui se manifeste uniquement avant la prophase ;
- Le second degré est défini par une diminution progressive de l'indice mitotique en même temps que l'augmentation des proportions des prophases et des télophases, par le fait que la durée de ces deux stades soit allongée ;
- Le troisième degré est déterminé par une inhibition de l'entrée en prophase et un blocage des prophases commencées qui, peu à peu, subissent la catachromase et reviennent à l'état interphasique. Ceci expliquerait probablement l'apparition des agglutinations des chromosomes rencontrés chez les cellules d'*A. cepa* L.

Les fragmentations chromosomiques rencontrées chez les cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* sont considérablement importantes chez celles traitées par l'extrait aqueux d'*O. laperrinei* par rapport à l'extrait aqueux d'*O. sylvestris*. Ces fragmentations chromosomiques sont dues probablement aux effets clastogènes de l'extrait, et son action sur les chromosomes est généralement considérée comme étant due à une action sur l'ADN (GRANT, 1978).

La présence de ponts chromosomiques chez les cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traitées par l'extrait aqueux des feuilles d'*O. laperrinei* est un phénomène complexe lié à la fragmentation chromosomique, à l'aspect collant des chromosomes et aux cassures et réunion des extrémités cassées (KABARITY *et al.*, 1974 ; BADR *et al.*, 1992). Ces anomalies chromosomiques pourraient être provoquées durant la translocation d'échange chromatidique inégal ou dues à la présence de chromosomes dicentriques (KONUK *et al.*, 2007).

L'aspect rétrécis des noyaux rencontrés chez les cellules méristématiques d'*A. cepa* L. traitées par l'extrait aqueux des feuilles d'*O. sylvestris* et d'*O. laperrinei* est dû probablement au changement dans la structure ou la composition de la membrane nucléaire (GABARA *et al.*, 2006). De tels phénomènes ont été rencontrés chez des cellules méristématiques racinaires d'*A. cepa* traitées par l'extrait aqueux de *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) (KURAS *et al.*, 2006).

2.1.1. Etude statistique de l'activité antimitotique

La comparaison des IM entre le témoin positif et le témoin négatif par le test de MANN-WHITNEY a donné une p-value <0.05 (0.007), ce qui montre une différence hautement significative entre les deux témoins, On peut donc déduire l'effet antimitotique de la colchicine comparativement au témoin négatif (Figure 1 de l'Annexe 3).

Le test ANOVA de KRUSKAL WALLIS a permis de comparer l'effet antimitotique des extraits aqueux foliaires d'*O.sylvestris* et d'*O. laperrinei* selon deux facteurs. Le facteur 1 qui est la dilution et le facteur 2 qui est le type de plante. Une p-value <0.05 (0.0055) est obtenue pour le facteur dilution (Figure 2 de l'Annexe 3). Ceci a révélé une différence hautement significative entre les différentes dilutions, indiquant leur effet antimitotique différent sur les cellules méristématiques. En ce qui concerne le facteur plante, le test a donné une p-value >0.05 (0.715), ceci a révélé aucune différence significative entre l'extrait aqueux foliaire d'*O.sylvestris* et d'*O. laperrinei* (Figure 3 de l'Annexe 3).

Pour déterminer la dilution ayant le meilleur effet antimitotique nous avons réalisé le test de STUDENT à un seul échantillon, où on a comparé chaque dilution à un témoin (positif et négatif). Une p-value >0.05 entre la D1 et le témoin positif est retrouvée, tandis que D2 et D3 ont donné des p-value <0.05 . Ceci montre que la dilution 1 a un effet antimitotique plus élevé comparativement aux deux autres dilutions pour les deux extraits aqueux foliaires des plantes (Figure 4, 5, 6 et 7 de l'Annexe 3).

2.2. Activité antiproliférative-MTT

La prolifération de la levure *saccharomyces cerevisiae* en présence de la quercétine (standard) et les extraits végétaux est évaluée en utilisant le test MTT. Cette étude est basée sur une analyse spectrophotométrique à 560 nm où les DO sont proportionnelle au nombre des cellules vivantes. En se basant sur les différentes DO obtenus, regroupées dans le tableau représenté en Annexe 4, nous avons calculé le pourcentage de viabilité et déduit le pourcentage de mortalité.

Le pourcentage de mortalité des cellules de levure *saccharomyces cerevisiae* traitées par de la quercétine est de 14.06%. Celui obtenu en présence des extraits aqueux foliaires des deux plantes est de 32.28% et 12.32% respectivement pour les cellules de levure traitées par l'extrait aqueux d'*O.sylvestris* et l'extrait d'*O.laperrinei* comme le montre le tableau suivant :

PARTIE EXPERIMENTALE

TableauIV: Taux de mortalité et de viabilité en présence des extraits végétaux.

		Taux de viabilité (%)	Taux de mortalité (%)
Standard	quercetine	85.94%	14.06%
échantillons	<i>Olea europaea sylvestris</i>	67.72%	32.28%
	<i>Olea europaea laperrinei</i>	87.68%	12.32%

La levure est un modèle de choix dans la compréhension des processus biologiques les plus complexes. Grace à elle, PAUL NURSE, LEE HARTWELL et TIM HUNT ont pu découvrir les molécules clés de la régulation de la division cellulaire ; ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 2001 (SCHWOB, 2001). De plus *Saccharomyces cerevisiae* a l'avantage de se reproduire spontanément ce qui permet d'évaluer sa croissance cellulaire. Nous avons donc utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour la mise en évidence de l'activité antiproliférative des extraits aqueux des feuilles d'*O.sylvestris* et d'*O. laperrinei* (LAMBERT *et al.*, 1993 ;MINTON et ADAMSON,1979).

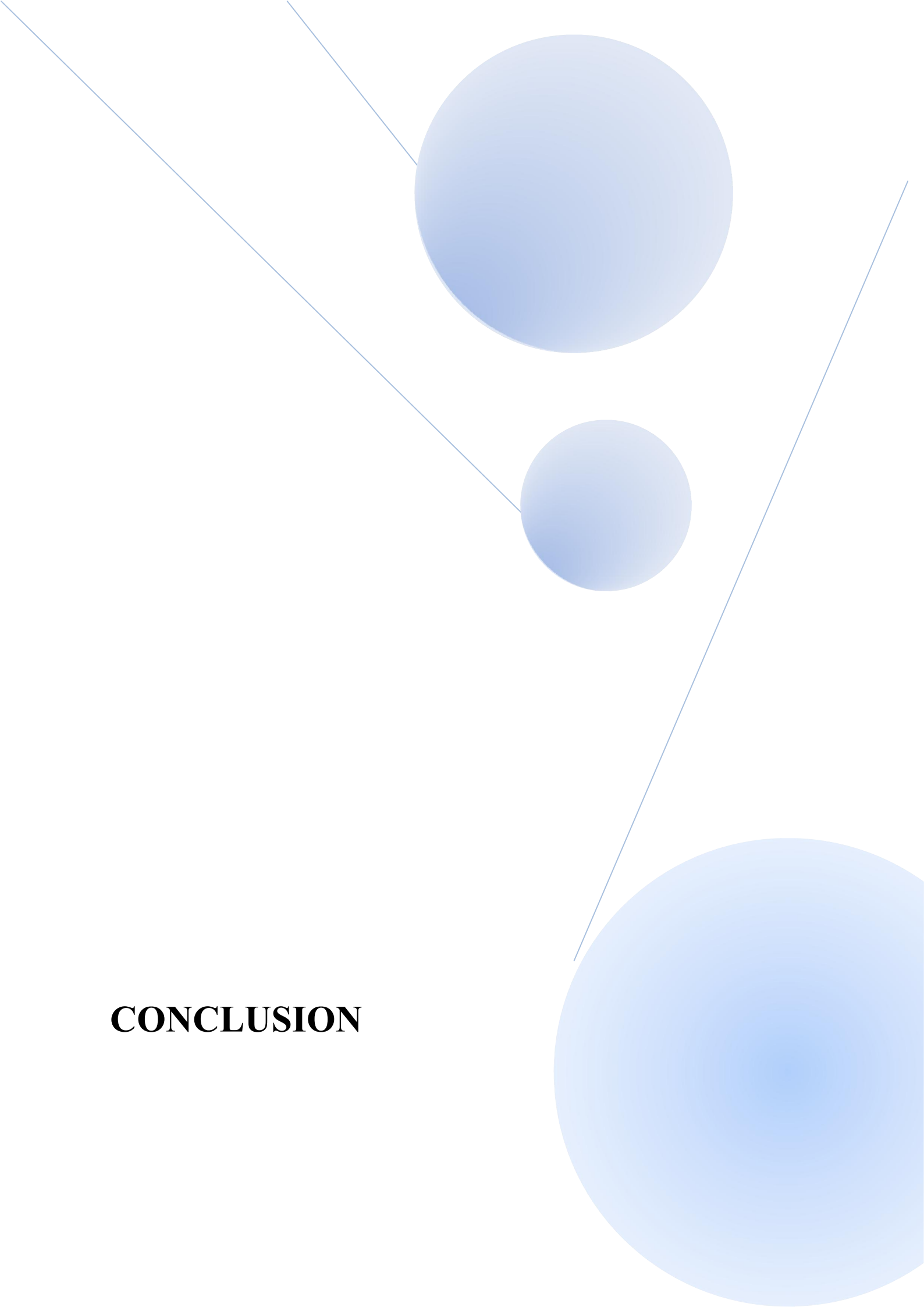
Nos résultats indiquent que l'extrait aqueux des feuilles d'*O.sylvestris* à la dilution ½ inhibe la croissance et diminue la survie des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* plus que l'extrait aqueux des feuilles d'*O.laparrinei* à des pourcentages de mortalité de 32.28% et 12.32% respectivement.Ces résultats confirment l'effet antiprolifératif des deux extrait aqueux testés avec un effet plus important pour l'extrait aqueux d'*O.sylvestris*.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet antiprolifératif et cytotoxique des extraits des plantes sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'une des plantes les plus importantes utilisées à des fins thérapeutiques est *Matricaria chamomilla*. L'extrait hydroalcolique de cette plante à des concentrations de 3000 µg / ml inhibe significativement la croissance et diminue la survie des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'à 48% (SRIVASTAVAet GUPTA, 2009). Ceci est dû à la présence de molécules bioactives au niveau

PARTIE EXPERIMENTALE

des extraits des plantes. Des études antérieures montrent que les saponosides ont une activité antiproliférative (DRISSI *et al.*, 2006).

L'effet antiprolifératif de l'oléastre (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) a été étudié sur les cellules cancéreuses. Les résultats de cette étude ont montré que l'extrait phénolique de feuilles d'oléastre réduit la croissance du cancer du côlon et induit une apoptose dépendante de la caspase dans les cellules cancéreuses du côlon via la voie apoptotique mitochondriale (ZERIOU *et al.*, 2017). Dans une autre étude, il a été démontré que l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier sauvage qui comporte plusieurs composés phytochimiques sélectionnés tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, l'oleuropéine, les acides gras et les composés volatils exercent un effet cytotoxique sélectif significatif sur les lignées cellulaires DU-145 et PC-3 du cancer de la prostate (MAKOWSKA-WAS *et al.*, 2017).



CONCLUSION

CONCLUSION

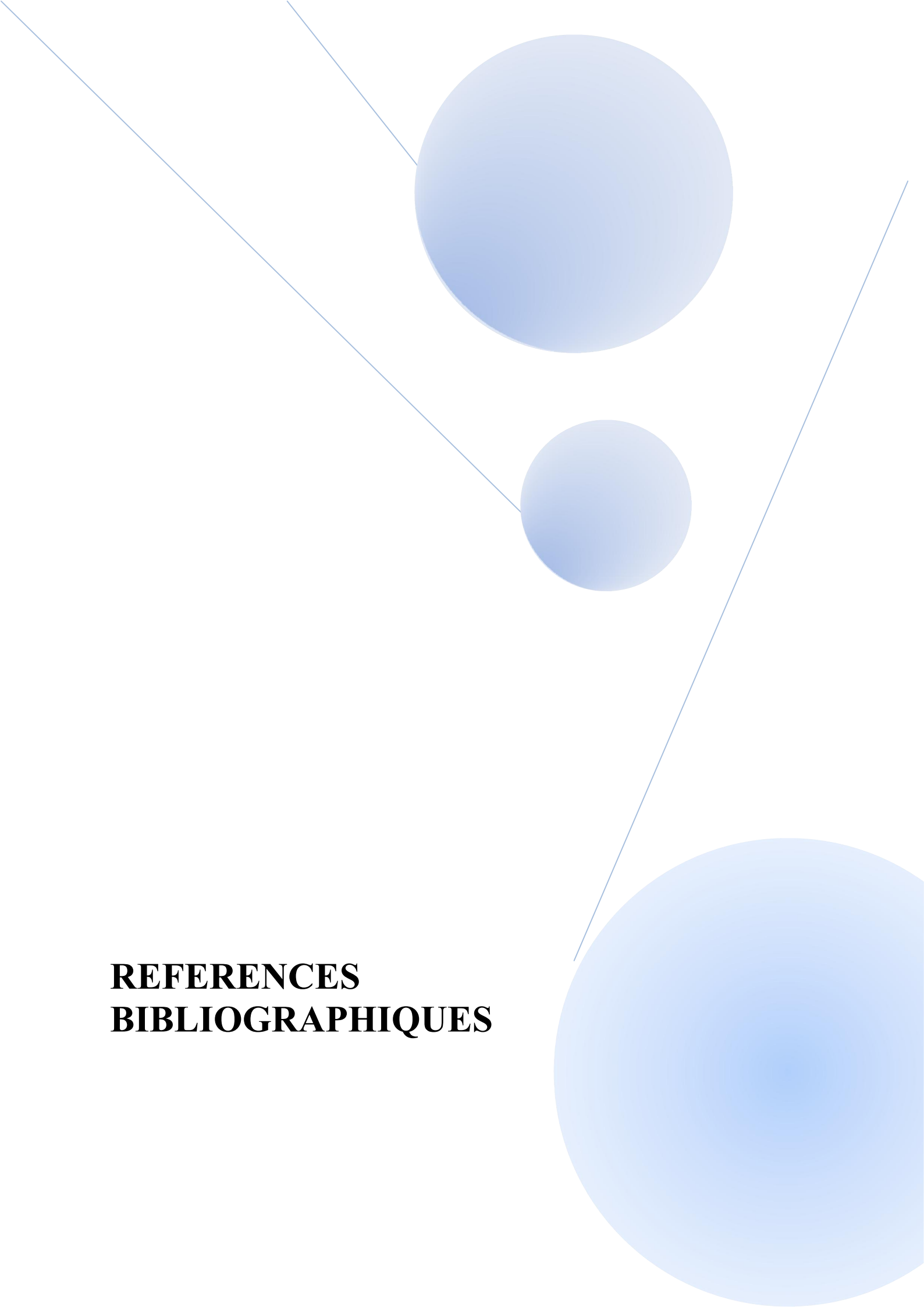
Dans le cadre de la mise en évidence des nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre le cancer, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet antimittotique et antiprolifératif des feuilles de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle : *Olea europaea sylvestris* et *Olea europaea laperrinei*.

L'étude de l'activité antimittotique des extraits aqueux foliaires d'*Olea europaea sylvestris* et d'*Olea europaea laperrinei* réalisée sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa* L. montre que les deux extraits exercent une inhibition de la mitose par perturbation du fuseau mitotique à la faible dilution de l'extrait, cela est marqué par diminution de l'indice mitotique jusqu'à $48,972 \pm 5,63\%$ pour l'extrait aqueux d'*Olea sylvestris* et $49,088 \pm 2,89\%$ pour l'extrait aqueux d'*Olea laperrinei* qui est accompagné d'anomalies nucléaires, chromosomiques et cellulaires à savoir : des allongements des cellules et rétrécissement du noyau, des cellules gigantesques avec un petit noyau, des agglutinations chromosomiques, des fragmentations et des désorganisations chromosomiques ainsi que des ponts chromosomiques.

Par ailleurs, l'étude de l'activité antiproliférative a montré que les deux extraits aqueux foliaires inhibent la croissance et diminuent la survie des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* à la dilution $\frac{1}{2}$, avec un effet antiprolifératif plus important pour l'extrait aqueux d'*O.sylvestris* par rapport à l'extrait aqueux d'*O.laperrinei* à des pourcentages de mortalité de 32.28% et 12.32% respectivement.

Sachant que notre pays possède une grande diversité de plantes où chacune se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques intéressantes qui doivent être exploitées par les recherches, de cet effet et pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- réaliser des extractions avec d'autres solvants ;
- déterminer la composition chimique des extraits aqueux des plantes étudiées ;
- purifier les molécules bioactives ;
- déterminer *in vivo* de l'effet antimittotique et antiprolifératif ;
- élargir le panel des activités biologiques par d'autres tests : anti-inflammatoire, anticoagulant.

An abstract geometric design featuring three blue circles of varying sizes and three thin blue lines that intersect them. The largest circle is at the top center, a medium-sized circle is below it to the right, and a large circle is at the bottom right. The lines are thin and blue, creating a network of intersections across the page.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALTIOK E., BAYCIN D., BAYRAKTAR O et ULKU S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.*, 62(2), 342-348.

ALTIOK E. (2010). Recovery of phytochemicals (having antimicrobial and antioxidant characteristics) from local plants. These in Chemical Engineering, Izmir Institute of technologie.

ALTMANN K.H., GERTSCH J. (2007). Anticancer drugs from nature - natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 327–357.

AMOURETTI MC and COMET G. (1998). Artisanat et matériaux : (la place des matériaux dans l'histoire des techniques). Cahiers d'histoire des techniques, vol. 4 (251 p.).

ANTOINE M. (2005). Synthèse et évaluation pharmacologique de composés indoliques et pyridopyraziniques à visée antitumorale. Thèse de doctorat en chimie thérapeutique, Université de NANTES U.F.R des sciences pharmaceutiques, NANTES, France.

ANTONSIE-WICZ D. (1990). Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of the Ledakrin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 28, 79-96.

ARAB K et BOUCHENAK O. (2013). Évaluation de l'activité biologique des Feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique Sci*, 09, 159-166.

ARTS I.C., HOLLMAN P.C and FESKENS E.J. (2001). Cathechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 227-232.

BAALI-CHERIF DJ. (2007). Etude des populations d'olivier de Laperrine (*Olea europaea subsp.laperrinei*) de Sahara central algérien (Hoggar et Tassili) aspects biologiques et caractérisation moléculaire. Thèse de Doctorat d'état en Sciences de la Nature Spécialité : Biologie Végétale, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne USTHB-ALGER.

BADR A., GHAREEB A et EL-DIN H.M. (1992). Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *Vicia faba* roots. *Egyptian Journal of Applied Siences*, 7, 457-468.

BECKERS T and MAHBOODI S. (2003). Natural, semisynthetic and synthetic microtubule inhibitors for cancer therapy. *Drugs of the future*, 28, 767-785.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENAMAR M. (2009). Etude de l'activité antimittotique et anticancéreuse des alcaloïdes naturels ou synthétiques d'*Arisarum vulgare targ* et de *Pancratium foetidum pom* sur deux lignées cellulaires cancéreuses P815 et HEP. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Spécialité : Produits Naturels, Intérêts thérapeutiques et toxicologie, Université Mohammed Premier Faculté des sciences OUJDA, Maroc.

BENCHELAH A-C et BOUZIANE H. (2006). Arbre et Arbuste de Sahara : voyages au cœur de leurs usages : 216-217.

BENNANI-KABCHI N., FDHIL H., CHERRAH Y, EL BOUAYADI F., KEHEL L et MARQUIE G. (2000). Effet thérapeutique des feuilles d'*Olea europea var. oleaster* sur le métabolisme glucido-lipidique chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) obèse prédiabétique. *Ann Pharm Fr*, 58 : 271-277.

BESNARD G., GARCIA-VERDUGO C., RUBIO DE CASAS R., TREIER UA., GALLAND N et VARGAS P. (2008). Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea* L.) : evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of Botany*, 101, 25-30.

BESNARD G., ANTHELME F et BAALI-CHERIF DJ. (2012). The Laperrine's olive tree (Oleaceae): a wild genetic resource of the cultivated olive and a model-species for studying the biogeography of the Saharan Mountains. *Acta Botanica Gallica*, 159 (3), 319-328.

BIANCO A et UCCELLA N. (2000). Biophenolic components of olive. *Food Research International*, 33, 475-485.

BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N and SAIJA A. (1999). On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*, vol.51, 4-971.

BOSETTI C., SPERTINI L., PARPINEL M., GNAGNARELLA P., LAGIOU P., NEGRI E., FRANCESCHI S., MONTELLA M., PETERSON J., DWYER J., GIACOSA A and LA VECCHIA C. (2005). Flavonoïds and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14, 805-808.

BOUAZIZ M., GRAYER R.J., SIMMONDS M.S., DAMAK M. et SAYADI S. (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

olive cultivar Chemlali growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 236-241.

BRETONCM et BERVILLEA. (2012). New hypothesis elucidates self-incompatibility in the olive tree regarding S-alleles dominance relationships as in the sporophytic model. *C R Biol*, 335(9), 563-72.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie - Phytochimie – Plantes médicinales, 3^{ème} Ed., Technique et Documentation, Paris.

BRUNORI A. (1967). Relation ship between DNA synthesis and water content during repening of *Vicia foba*. *Seed. Crylogia*, 20, 333-338.

CARMICHAEL J., DEGRAFF W.G., GAZDARA.F., MINNA J.D et MITCHELL J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium based semi automated colorimetric assay. Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 963-942.

CARRION Y., NTINOU M. et BADAL E. (2010). *Olea europaea L.* in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early-Middle Holocene. *Quat Sci Rev*, 29, 952–968.

CHAUHAN L.K.S., SAXENA P.N. et GUPTA S. K. (1998). Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany*, 42, 181-189.

CHEESEMAN IM and DESAI A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 9(1), 33–46.

CLAUDE CALLEN J. (2005). Biologie cellulaire des molécules aux organismes. 2^{ème} Ed., Dunod, Paris.

COLOMBEL V. (2009). Synthèse et étude de l'activité biologique de nouveaux analogues du N-acétylcolchinol. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur en Chimie Organique, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1, LYON, France.

COMTE H. (1990). Le tour de l'olivier. Régine Vallée, 2^{ème} Ed., France.

COOK N.C et SAMMAN S. (1997). Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*, 7, 66-76.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DABYDEEN D., FLORENCE G., PATERSON I et HAMEL E. (2005). A quantitative evaluation of the effects of inhibitors of tubulin assembly on polymerization induced by discodermolide, epothilone B, and paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 53, 397-403.

D'AMATO F. (1954). Action des facteurs physiques et chimiques sur la mitose. *Int. Botanique*, 9, 1-9. In DEYSSON G., 1956.

DEYSSON G. (1956). Les facteurs de la mito-inhibition végétale. VI. p. 241-274. In André THOMAS J., 1956.

DJENANE D., YANGUELA J., DERRICHE F., BOUARAB L et RONCALES P. (2012). Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*, 10-18.

DOXSEY S., ZIMMERMAN W and MIKULE K. (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol*, 15(6), 303-11.

DRISSI A., BENNANI H., GITON F., CHARROUF Z., FIET J et ADLOUNI A. (2006). Tocopherols and Saponins Derived From *Argania spinosa* Exert, an Antiproliferative effect on Human Prostate Cancer. *Cancer Investig*, 24, 588-592.

DUVOIX A., MORCEAU F et SCHNEKENBURGER M. (2003). Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. *Ann NY Acad Sci*, 1010, 389-92.

ESSAD S. (1977). Action de températures basses sur les proportions des phases monocycliques du méristème racinaire de *Lactuca sativa* L. *Physiol. Vég*, 15 (2), 325-332.

FINK B.N., STECK S.E., WOLFF M.S., BRITTON J.A., KABAT G.C., GAUDET M.M., ABRAHAMSON P.E., BELL P., SCHROEDER J.C., TEITELBAUM S.L., NEUGUT A.I and GAMMON M.D. (2007). Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on Long Island. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 16, 2285-2292.

FUSCONI A., REPETTO O., BONA E., MASSA N., GALLO C., DUMAS-GAUDOT E et BERTA G. (2006). Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 253–260.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GABARA B., KALWINEK J., KOZIRO A., ŻAKOWSKA Z. et BRYCKI B. (2006).** Influence of N, N-Bis (3- Aminopropyl) Dodecylamine on the ultrastructure of nuclei in *Aspergillus niger* mycelium and on cell proliferation and mitotic disturbances in *Allium cepa* L. root meristem. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48 (1), 45-52.
- GARCIA-CLOSAS R., GONZALEZ C.A., AGUDO A and RIBOLI E. (1999).** Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*, 10, 71-75.
- GARRETT R.H et GRISHAM C.M. (2000).** Biochimie. De boeck université édition, p 4-7.
- GARRO GALVEZ J.M., RIEDL B et CONNER A.H. (1997).** Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of wood*, 51, 235-243.
- GHANBARI R., FAROOQ A., ALKHARFY KH. M., GILANI A-H and SAARI N. (2012).** Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). A Review. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 3291-3340.
- GHEDIRA K. (2008).** L'olivier. *Phytothérapie*, vol 6(2), 83-89.
- GHERIB. A. (2014).** Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait d'*Olea europea* var. *oleaster* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Thèse en vue de l'obtention d'un diplôme de Doctorat en Biochimie Appliquée, Université BADJI MOKHTAR – ANNABA, Algérie.
- GRANT W.F. (1978).** Chromosome aberrations in plant as monitoring system. *Environ. Health Perspect*, 27: 37–43.
- GREEN P.S. (2002).** A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull*, 57, 91-140.
- HADFIELD J.A., DUCKIS., HIRST N et MCGOWAN T. (2003).** Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Research*, 5, 309-325.
- HALLET J. N. (1983).** Acquisition récentes sur les modifications quantitatives du noyau au cours du cycle cellulaire et de la différenciation. Journée d'Etude cytologique, université Pierre et Marie Curie, Paris, 4-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HAMDI K.H et CASTELLON R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 769-778.

HAMEL E. (1996).Antimitotic Natural Products and Their Interactions with Tubulin. *Med. Res. Rev.*, 16, 207-231.

HANENE G., AOUADHI C., HAMROUNI S et MNIF W. (2015).Antibactérien, les activités antifongiques et antioxydantes de tunisien *olea europea ssp* pulpe fruti et ses acides gras essentiels. *Int J Pharm Sci*, 7.

HANS W. K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition, p6-7.

HAOUANE H. (2012).Origines, domestication et diversification variétale chez l'olivier (*Olea europaea L.*) à l'ouest de la Méditerranée. Thèse pour obtenir le grade de docteur en Evolution – Ecologie – Ressources Génétiques – Paléontologie.Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement, Montpellier.

HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R and BOBILYA D.J. (2002).Flavonoïd antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

HOSSEINPOUR M., DEHKORDI M.M., SAFFAR B et TEIMORI H. (2013). Antiproliferative effects of *Matricaria chamomilla* on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Herb Med Pharmacol*, 2(2), 49-51.

HUANG C.L et SUMPIO, B.E. (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surg*, 207, 407–416.

JANIN Y. (1993).Analogues et dérivés inédits des benzo[c]phénanthridines antitumorales. Synthèse et étude biologique. Thèse de doctorat en chimie organique, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, France.

JORDANM.A. (2002). Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr.Med.Chem, Anticancer Agents*, 2,1-17.

KABARITY A., EL-BAYOUMI A.S. et HABIB A.A. (1974). Effects of morphine sulphate on mitosis of *Allium cepa* root tips. *Biologia Plantarum*, 16, 275-282.

KALESSE M. (2000). The Chemistry and Biology of discodermolide. *ChemBioChem*, 1, 171-175.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

KARP G. (2004). Biologie Cellulaire et Moléculaire. 2^{ème} Ed., De Boeck Université: Bruxelles.

KIM C., BAEK S. H., UM J. Y., SHIM B. S et AHN K. S. (2016). Resveratrol attenuates constitutive STAT3 and STAT5 activation through induction of PTP ϵ and SHP-2 tyrosine phosphatases and potentiates sorafenib-induced apoptosis in renal cell carcinoma. *BMC Nephrology*, 17(1), 19.

KINGSTON D. J. (2009). Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. *Nat. Prod*, 72, 507-515.

KNEKT P., KUMPULAINEN J., JARVINEN R., RISSANEN H., HELIOVAARA M., REUNANEN A., HAKULINEN T and AROMAA A. (2002). Flavonoïds intake and the risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568.

KONUK M., LIMAN R. et CIGERCI H. (2007). Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pak. J. Bot*, 39(1), 73-79.

KURAS M., NOWAKOWSKA J., SLIWINSKA E., PILARSKI R., ILASZ R., TYKARSKA T., ZOBEL A et GULEWICZ K. (2006). Changes in chromosome structure, Mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC, *J. Ethnopharmacol*, 107 (2), 211-221.

LAMBERT N., TROUSLOLOT M.-F., NEF-CAMPA C and CHRESTIN H. (1993). Production of rotenoids by heterotrophic and photomixotrophic cell cultures of *Tephrosia vogelii*. *Phytochemistry*, 34, 1515-1520.

LE MARCHAND L., MURPHY S.P., HANKIN J.H., WILKENS L.R and KOLONEL L.N. (2000). Intake of flavonoïds and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 9, 154-160.

LUCH A. (2002). Cell Cycle Control and Cell Division: Implications for Chemically Induced Carcinogenesis. *Chem Bio Chem*, 3, 506-516.

MAKHLOUFI S. (2016). Intoxication aigue par la colchicine (à propos de 02 cas). Thèse pour l'obtention du doctorat en Médecine, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah faculté de Médecine et de pharmacie Fes, Maroc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MAKOWSKA-WAS J., GALANTY A., GDULA-ARGASINSKA J., TYSZKA-CZOCCHARA M., SZEWCZYK A., NUNES R., CARVALHO IS., MICHALIK M et PASKO P. (2017).** Identification des composés phytochimiques prédominants et de l'activité cytotoxique des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europaea L. ssp sylvestris*) récoltées au sud du Portugal. *Chem Biodivers*, 14 (3), doi: 10.1002.
- MARCANO L., CARRUYO I., FERNANDEZ Y., MONTIEL X et TORREALBA Z. (2004).** Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa L.*) and its correlation with toxicity. *Biocell*, 30: 259–267.
- MARY H. (2015).** Analyse et Modélisation de la Dynamique des Chromosomes durant la Mitose chez la Levure à Fission. Thèse de doctorat en biologie, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France.
- MINTON N.A. and W.C. ADAMSON. (1979).** Response of *Tephrosia vogelii* to four species of root-knot nematodes. *Plant Dis. Repr*, 63, 514.
- MOHD NOR N. H., OTHMAN F., MOHD TOHIT E. R et MD NOOR S. (2016).** Medicinal Herbals with Antiplatelet Properties Benefit in Coronary Atherothrombotic Diseases.
- MOSMANN T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival ; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65,55-63.
- MULAS M et DEIDDA P. (1998).** Domestication of woody plants from Mediterranean maquis to promote crops for mountain lands. *Acta Horticulturae*,457, 295–301.
- NARAYANA K. R., REDDY M. S., CHALUVADI M. R. et KRISHNA D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33, 2-16.
- NICOLAOU K.C., ROSCHANGAR F and VOURLOUMIS D. (1998).** Chemical Biology of Epothilones. *Angew. Chem. Int. Ed*, 37, 2014-2045.
- NOGALES E., WHITTAKER W., MILIGAN R and DOWNING K. (1999).** High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96, 79-88.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- NORBURY C and NURSE P. (1992).** Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 441–470.
- PANDA B.B. et SAHU U.K. (1985).** Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fenitrothion. *Cytobios*, 42, 147-155.
- PEREIRA J.A., OLIVEIRA I., SOUSA A., VALENTAO P., ANDRADE P.B., FERREIRA I.C.F.R., FERRERS F., BENTO A., SEABRA R and ESTEVINHO L (2007).** Walnut (*Juglans regia* L.) leaves : phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol*, 45, 2287-2295.
- PERRINJAQUET-MOCCHETTI T., BUSJAHN A., SCHMIDLIN C., SCHMIDT A., BRADL B and AYDOGAN C. (2008).** Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*, 22, 1239-1242.
- PIETTA P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*, 63 (7), 1035-42.
- PING K.Y., DARAH I., YUSUF U.K., YENG C and SASIDHARAN S. (2012).** Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules*, 17, 7782-7791.
- POLZONETTI V., EGIDI D et VITA A. (2004).** Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*, 88, 1-15.
- REUTER S., CHARLET J et JUNCKER T. (2009).** Effect of curcumin on nuclear factor kappa B signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. *Ann NY Acad Sci*, 1171, 47–436.
- ROBINET C. (2011).** Rôles et régulation du PI(4,5) P2 dans le remodelage cortical et la morphogénèse cellulaire en mitose .Thèse de doctorat en cancérologie, Université Toulouse III – Paul Sabatier, France.
- RUBIO DE CASAS R., BALAGUER L., MANRIQUE E., PEREZ-CORONA ME et VARGAS P. (2002).** On the historical presence of the wild olive *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Miller) Leh in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Anales de Jardin Botanica*, 59, 342–344.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SACKETT D. (1993). Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: Natural products that bind at the colchicine site of tubulin. *Pharmac. Ther.*, 59, 163-228.

SAVARESE TM., STROHSNITTER WC., LOW HP., LIU Q., BAIK I., OKULICZ W., CHELMOW DP., LAGIOU P., QUESENBERRY PJ., NOLLER KL et HSIEH CC. (2007). Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Res*, 9, R29.

SAVOURNIN C., BAGHDIKIAN B., ELIAS R., DARGOUTH-KESRAOUI F., BOUKEF K et BALANSARD G. (2001). Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem*, 49, 618-621.

SCHWOB E. (2001). Bull Cancer, 88(10), 937.

SHARMA C.B. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Curr. Sci*, 52, 1000–1002.

SIDDIQUI S., MEGHVANSI M.K. et HASAN Z. (2007). Cytogenetic changes induced by sodium azide (NaN₃) on *Trigonella foenum-graecum* L. seeds. *South African Journal of Botany*, 73, 632–635.

SLICHENMYER W. J and VON HOFF D.D. (1991). Anti-Cancer Drugs, 2, 519.

SMITH A et FREEZE B. (2008). (D)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation Tetrahedron, 64, 261-298.

SRIVASTAVA JK et GUPTA S. (2009). Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. *Mole Cell Pharmacol*, 1(3), 138.

STALIKAS C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.

SVOBODA G. H. (1977). The role of the alkaloids of *catharanthus roseus* (L.) G. Don (*vinca rosea*) and their derivatives in cancer chemotherapy; plants: the potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals, indianapolis.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TALHAOUI N., TAMALLI A., GOMEZ-CARAVACA A.M., FERNANDEZ-GUTIERREZ A and SEGURA-CARRETERO A. (2015). Phenolic compound in olive leaves : Analytical determination, biotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.

TEITEN MH, EIFES S, DICATO M et al. (2010). Curcumin - the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins*, 2(1):128-62.

TOMOFUJI T., EKUNI D., IRIE K., AZUMA T., ENDO Y., TAMAKI N., SANBE T., MURAKAMI J., YAMAMOTO T and MORITA M. (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol*, 80 (11), 1799-808.

VERDIER-PINARD P., LANSIAUX A. et BAILLY C. (2001). Combretastatin A4 phosphate. *Bulletin du cancer*. 88 (3), 235-239.

VISIOLI F., POLI A et GALLI C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olive and olive oil. *Med Res Rev*, 22, 65–75.

WAINSTEIN J., GANZ T., BOAZ M., BAR DAYAN Y., DOLEV E and KEREM Z. (2013). Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine*, 01-477.

WANI M.C., TAYLOR H.L, WALL M.E., COGGON P and MCPHAIL A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–7.

W –ERDMAN J., BALENTINE J. D., ARAB L., BEECHER G., DWYER J. T., FOLTS J., HARNLY., HOLLMAN J. P., L –KEEN C., MAZZA G., MESSINA M., SCALBERT A., VITA J., WILLIAMSON et BURROWES J. (2007). Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop. *Journal of Nutrition*, 137 (3 supp 1), 718-737.

ZERIOU W., NANI A ., BELARBI M.,DUMONT A ., DE ROSNY C., ABOURA I ., GHANEMI F.Z.,MURTAZA B.,DANOIS P., THOMAS C ., APETOCH L .,REBE C .,DELMAS D.,AKHTAR KHAN N .,GHIRINGHELLI F.,RIALLAND M et HICHAMI

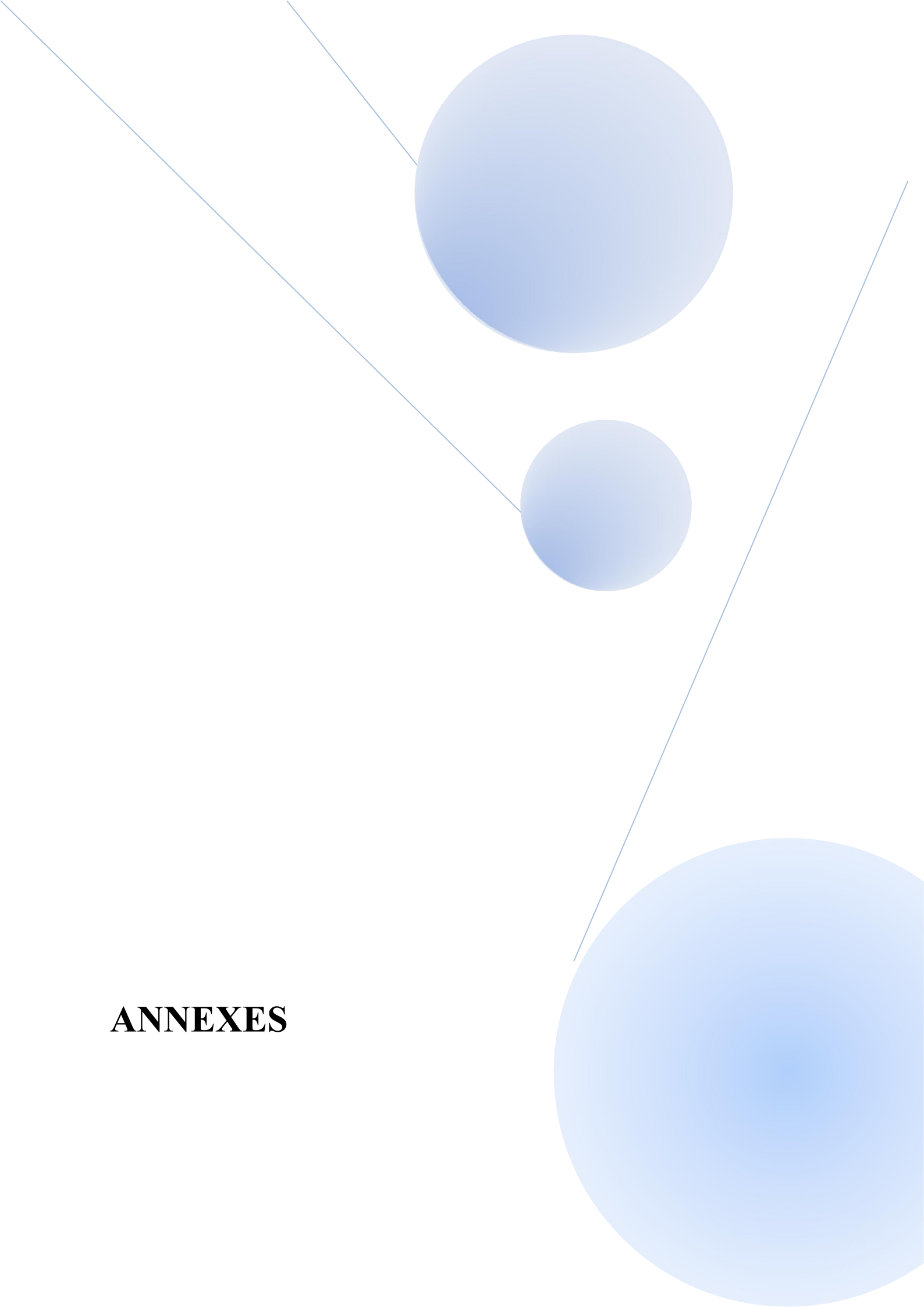
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A. (2017).L'extrait phénolique de feuilles d'oléastre (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) réduit la croissance du cancer du côlon et induit une apoptose dépendante de la caspase dans les cellules cancéreuses du côlon via la voie apoptotique mitochondriale. *PLoS One*, 12(4), e0176574.

ZOHARY D., HOPE M and WEISSE E. (2012). Domestication of plants in the Old World. 3^{ème} Ed. New York : Oxford University Press. 328 p.

Site web :

ANONYME 1 : www.quercetine.fr. (Consulté le 01-07-2018).

An abstract geometric design featuring three blue circles of varying sizes and three thin blue lines. One line connects the top-left corner to the top circle. Another line connects the top-right corner to the bottom circle. A third line connects the top circle to the middle circle. The circles are positioned in the upper and lower right areas of the page.

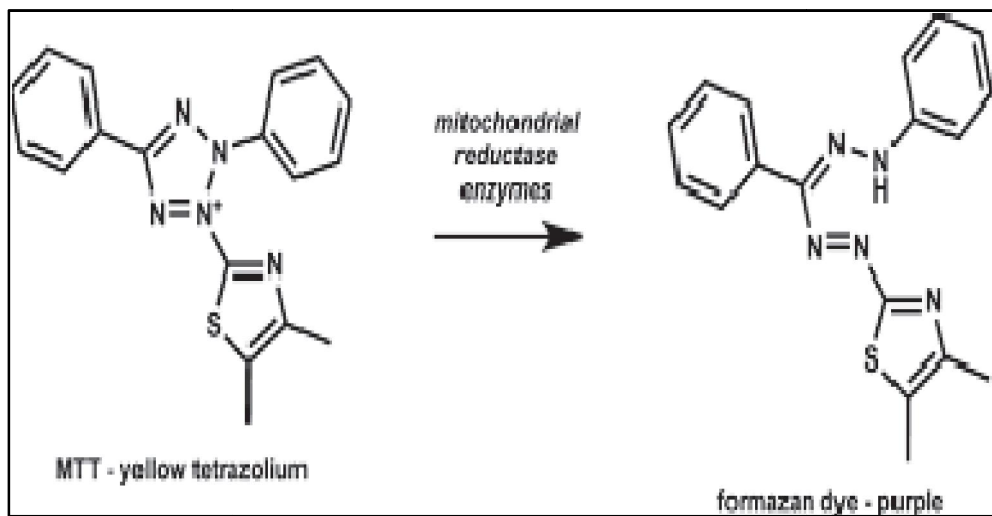
ANNEXES

ANNEXES

Annexe01 : Composition du milieu de culture.

Milieu de culture	Composition
Milieu de culture des <i>saccharomyces</i>	-10g de Bactopeptone -25g de Glucose -700ml d'eau distillée stérile -300ml de tampon phosphate (ph=3.8) -26.88g de Na ₂ HPO ₄ hydraté -17.6g d'acide citrique

Annexe02 : Réaction chimique de la conversion du MTT en formazan.



Annexe 03 : Résultats des tests statistiques

Test U de Mann-Whitney (ANOVA 2F.sta) Par var. témoin Tests significatifs marqués à p <,05000										
variable	SommeRgs t-	SommeRgs t+	U	Z	niv. p	Z ajusté	niv. p	N Actif t-	N Actif t+	2*(1-p) p exact
im	40,00000	15,00000	0,00	2,611165	0,009024	2,611165	0,009024	5	5	0,007937

Figure 1 : Table de MANN-WHITNEY pour les résultats de comparaison des IM entre le témoin négatif au témoin positif.

ANNEXES

Dépendant : indice	Test Médiane, Méd. Globale = 58,4250; indice (ANOVA 2F.sta) Var. indépendante (classement) : dilution Chi-Deux = 10,40000 dl = 2 p = ,0055						
	D1	D2	D3	Total			
<= Médiane : observ.	9,00000	4,00000	2,00000	15,00000			
théorique	5,00000	5,00000	5,00000				
obs.-thé.	4,00000	-1,00000	-3,00000				
> Médiane : observée	1,00000	6,00000	8,00000	15,00000			
théorique	5,00000	5,00000	5,00000				
obs.-thé.	-4,00000	1,00000	3,00000				
Total : observé	10,00000	10,00000	10,00000	30,00000			

Figure 2: Table de l'ANOVA de KRUSKAL WALLIS de Comparaison des IM pour le facteur dilution.

Dépendant : indice	Test Médiane, Méd. Globale = 58,4250; indice (ANOVA 2F.sta) Var. indépendante (classement) : plantes Chi-Deux = ,1333333 dl = 1 p = ,7150					
	S	L	Total			
<= Médiane : observ.	8,00000	7,00000	15,00000			
théorique	7,50000	7,50000				
obs.-thé.	0,50000	-0,50000				
> Médiane : observée	7,00000	8,00000	15,00000			
théorique	7,50000	7,50000				
obs.-thé.	-0,50000	0,50000				
Total : observé	15,00000	15,00000	30,00000			

Figure 3: Table de l'ANOVA de KRUSKAL WALLIS de comparaison des IM pour le facteur plante.

Variable	Comparaison de moyennes à un standard (constante) (ANOVA 2F.sta)							
	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
D1S	48,97200	12,59925	5	5,634555	82,72000	-5,98947	4	0,003908
D2S	56,17000	8,31577	5	3,718926	82,72000	-7,13916	4	0,002036
D3S	62,51400	9,14211	5	4,088475	82,72000	-4,94219	4	0,007805

Figure 4: Table de STUDENT à un seul échantillon de comparaison de chaque dilution d'*O. sylvestris* au témoin négatif.

ANNEXES

Variable	Comparaison de moyennes à un standard (constante) (ANOVA 2F.sta)							
	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
D1S	48,97200	12,59925	5	5,634555	37,31000	2,069729	4	0,107263
D2S	56,17000	8,31577	5	3,718926	37,31000	5,071357	4	0,007124
D3S	62,51400	9,14211	5	4,088475	37,31000	6,164646	4	0,003515

Figure 5:Table de test du STUDENT à un seul échantillon de comparaison de chaque dilution d'*O. sylvestris* au témoin positif.

Variable	Comparaison de moyennes à un standard (constante) (ANOVA 2F.sta)							
	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
D1L	49,02286	6,497991	7	2,456010	82,72000	-13,7203	6	0,000009
D2L	59,94000	5,187625	5	2,319976	82,72000	-9,8191	4	0,000603
D3L	65,65600	3,389606	5	1,515878	82,72000	-11,2568	4	0,000355

Figure 6:Table de test du STUDENT à un seul échantillon de comparaison de chaque dilution d'*O. laperrinei* au témoin négatif.

Variable	Comparaison de moyennes à un standard (constante) (ANOVA 2F.sta)							
	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
D1L	49,02286	6,497991	7	2,456010	37,31000	4,76906	6	0,003097
D2L	59,94000	5,187625	5	2,319976	37,31000	9,75441	4	0,000619
D3L	65,65600	3,389606	5	1,515878	37,31000	18,69939	4	0,000048

Figure 7:Table de test du STUDENT à un seul échantillon de comparaison de chaque dilution d'*O. laperrinei* au témoin positif.

Annexe 4 :Les différentes DO obtenues par le spectrophotomètre.

Echantillons	DO de l'échantillon	DO de blanc	Différence
Milieu de culture	1.013	0.031	0.982
Quercetine	0.747	1.591	0.844
Extrait d' <i>O.sylvestris</i>	0.766	0.101	0.665
Extrait d' <i>O.laperrinei</i>	0.946	0.085	0.861

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés bioactifs qui inhibent le développement des tumeurs, il nous a paru intéressant d'étudier l'activité antimitotique et antiproliférative des extraits aqueux des feuilles de l'oléastre (*Olea europaea sylvestris*) et de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea laperrinei*).

L'activité antimitotique a été réalisée *in vitro* sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa*, les résultats de calcul de l'indice mitotique ont montré l'effet antimitotique des deux plantes à la faible dilution de l'extrait à des valeurs des indices de $48,972 \pm 5,63$ % pour l'extrait aqueux d'*Olea sylvestris* et $49,088 \pm 2,89$ % pour l'extrait aqueux d'*Olea laperrinei*, cela est accompagné d'aberrations nucléaires, chromosomiques et cellulaires.

Par ailleurs, la mise en évidence de l'activité antiproliférative des extraits aqueux foliaires des deux plantes a été réalisée *in vitro* sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les résultats ont montré que les deux extraits inhibent la croissance et diminuent la survie des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* à la dilution $\frac{1}{2}$, avec un effet antiprolifératif plus important pour l'extrait aqueux d'*O.sylvestris* par rapport à l'extrait aqueux d'*O.laperrinei* à des pourcentages de mortalité de 32.28% et 12.32% respectivement.

Mots clés : Extrait aqueux foliaire, *Olea europaea sylvestris*, *Olea europaea laperrinei*, activité antimitotique, activité antiproliférative.

Abstract

As part of the search for new bioactive compounds that inhibit the development of tumors, it seemed interesting to study the antimitotic and antiproliferative activity of the aqueous extracts of leaves of the *Olea europaea sylvestris* and the olive tree Laperrine (*Olea europaea laperrinei*).

The antimitotic activity was carried out in vitro on the meristematic cells of *Allium cepa*, the results of calculation of the mitotic index showed the antimitotic effect of the two plants at the low dilution of the extract at values of $48.972 \pm 5.63\%$ for the aqueous extract of *Olea sylvestris* and $49.088 \pm 2.89\%$ for the aqueous extract of *Olea laperrinei*, this is accompanied by nuclear, chromosomal and cellular aberrations.

Furthermore, the demonstration of the antiproliferative activity of the aqueous leaf extracts of the two plants was carried out in vitro on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the results showed that the two extracts inhibit the growth and decrease the survival of the cells of *Saccharomyces cerevisiae* at the $\frac{1}{2}$ dilution, with a greater antiproliferative effect for the aqueous extract of *O. sylvestris* by supply to the aqueous extract of *O. laperrinei* at mortality percentages of 32.28% and 12.32% respectively.

Key words: Leaf aqueous extract, *Olea europaea sylvestris*, *Olea europaea laperrinei*, antimitotic activity, antiproliferative activity.

الملخص

كجزء من البحث عن المركبات الجديدة النشطة بيولوجيا التي تمنع تطور الأورام ، بدأ من المثير للاهتمام دراسة النشاط المضاد للانقسام الخلوي و المضاد للتكاثر للمستخلصات المائية لأوراق *Olea europaea sylvestris* و *Olea europaea laperrinei*.

تم تنفيذ النشاط المضاد للانقسام الخلوي في المختبر على الخلايا المرستيمية من الأليوم سيبيا، وأظهرت نتائج حساب مؤشر الانقسامية التأثير المضاد للانقسام الخلوي للنباتين في تخفيف منخفض للمستخلص في قيم $48.972 \pm 5.63\%$ لمستخلص مائي من *Oleasylvestris* و $49.088 \pm 2.89\%$ لمستخلص مائي من *Olea laperrinei*، هذا كان مرافق بتشوهات نووية، كروموزومية و خلوية.

من جهة أخرى، تم عرض تظاهرة النشاط المضاد للتكاثر للمستخلصات المائية للنباتين في المختبر على الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*، وأظهرت النتائج أن المستخلصين يثبطان النمو ويقللان بقاء خلايا *Saccharomyces cerevisiae* عند التخفيف $1/2$ ، مع تأثير مضاد للتكاثر أكبر للمستخلص المائي لـ *O.sylvestris* بالنسبة للمستخلص المائي لـ *O.laperrinei* بنسب وفيات 32.28%

و 12.32% على التوالي.

الكلمات المفتاحية: مستخلص أوراق مائي، *Olea europaea sylvestris*، *Oleaeuropaea laperrinei*، نشاط مضاد للانقسام الخلوي، نشاط مضاد للتكاثر.