

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULAIRE

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE MOULOD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude

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

Option : Biochimie de la nutrition

Thème

**Evaluation in vitro de l'effet
antiprolifératif des flavonoïdes des
feuilles de *Peganum harmala* L.**

Rédigé par :

Mezaour Naima

Soutenu devant le jury :

M^r HOUALI K.	Professeur	UMMTO	Président
M^{me} OUZID Y.	Maitre de conférences B	UMBB	promotrice
M^{me} AICHE-IRATNI G.	Maitre de conférences B	UMMTO	Co – Promotrice
M^r MSELA. A	Maitre de conférences B	UMMTO	examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

*Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à **Mr Houali K**, professeur à en microbiologie à l'université MOULOUD MAMMARI TIZI-OUZOU de nous avoir accueillies au sein de son laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) et l'honneur qu'il nous a fait d'être président du jury.*

*Nous sommes très reconnaissantes à **M^{me} OUZID YASMINA**, **Maitre de conférences classe B à l'UMBB** d'avoir accepté d'encadrer ce travail et d'avoir pu bénéficier de ses conseils et des ses qualité pédagogiques.*

*Nous désirons aussi exprimer toute notre gratitude à **M^{me} AICHE-IRATNI GHENIMA**, **Maitre de conférences classe B à l'UMMTO** pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité à tout moment et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Il m'est agréable d'exprimer mes vifs remerciements à **Monsieur MSELA.A**, **Maitres de conférences classe B à l'UMMTO**, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce mémoire et de participer au jury.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers parents, pour leur patience et sacrifice
Consenti à mon égard pendant toute la durée de mes études.*

*A mes très chères sœurs et pour leurs soutien et Leurs
encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.*

Merci

Naima

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographiques

Chapitre 1 : *Peganum harmala L*

1.1 Description de la plante 2

1.2 Classification 3

1.3 Distribution géographique 3

1.4 Utilisation traditionnelle 3

1.5 Les métabolites secondaires 3

1.5.1 Les flavonoïdes 4

1.5.1.1 Structure chimique et classification 4

1.5.1.2 Les classes des flavonoïdes 5

1.5.1.3 Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes 7

1.5.2 Autres métabolites secondaires 7

Chapitre 2 : Cycle cellulaire

2.1 Définition du cycle cellulaire 8

2.1.1 L'interphase 8

2.1.2 La mitose 9

2.2 Agents antimitotiques et leur différente action 10

2.2.1 Action sur l'ADN 10

2.2.1.1 Agents alkylants 10

2.2.1.2 Agents scindants (Bleomycines) 11

2.2.2 Action sur les enzymes 11

2.2.2.1 Les Anti métabolites 11

2.2.2.2 Les antifolique 11

2.2.3 Action sur les microtubules : poisons du fuseau mitotique	13
2.3 Inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules	14
2.3.1 La colchicine	14
2.3.2 Les Vinca-alcaloïdes	14
2.3.3 La curcumine	15

Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes	17
1.1 Matériel.....	17
1.1.1 Matériel biologiques.....	17
1.1.2 Matériel de l'aboratoire	18
1.1.3 Réactifs et solvants.....	18
1.2 Méthodes.....	18
1.2.1 Extraction des fractions de flavonoïdes.....	18
1.2.2 Préparation du milieu Potato-Dextrose-Broth (PDB).....	20
1.2.3 Evaluation in vitro de l'activité antiproliférative.....	20
1.2.2 Analyse statistique.....	23
2. Résultat et discussion	24
2.1 Extraction des flavonoïdes.....	24
2.2 Activité antiproliférative des flavonoïdes de <i>Peganum harmala</i> L.	24
2.2.1 Action de la quercétine sur la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.2.2 Action de la fraction butanolique des flavonoïdes sur la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.2.3 Action de la fraction aqueuses de flavonoïdes sur la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Conclusion.....	27

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

cdk1 : Cycline Dependant Kinase 1

GTP : Guanosine triphosphate

G1 : Gap 1(intervalle 1)

G2 : Gap2 (intervalle2)

MTOC : microtubule organizing center

PDB : Potato-Dextrose-Broth

Liste des figures

Figure 1 : les différentes parties de <i>Peganum harmal L</i>	2
Figure 2: structure moléculaire de base des flavonoïdes.....	5
Figure 3: les différentes étapes du cycle cellulaire.....	8
Figure 4: Principaux sites d'action des agents alkylants sur nucléotide.....	10
Figure 5 : structures de l'acide folique et du méthotrexate.....	11
Figure 6 : dynamique de la formation de microtubule.....	12
Figure 7 : les protéines motrices des microtubules.....	13
Figure 8 : structures de la colchicine.....	14
Figure 9 : site d'action des Vinca-alcaloïdes.....	15
Figure 10 : Structure de la curcumine.....	15
Figure 11 : schéma récapitulatif des étapes de l'extraction des fractions.....	19
Figure 12: les différentes étapes du test antiprolifératif.....	22
Figure 13 : décantation des deux fractions des flavonoïdes.....	24

Liste des tableaux

Tableau I : les principales classes de flavonoïdes.....	6
Tableau II : les différentes phases de la division cellulaire.....	9
Tableau III : Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Tableau IV : liste des solvants et réactifs.....	18
Tableau V : pourcentages de cytotoxicité de la quercétine.....	25
Tableau VI : le pourcentage de cytotoxicité de la fraction butanolique.....	25
Tableau VII : pourcentage de cytotoxicité de la fraction aqueuse.....	26

Introduction générale

Depuis les temps anciens, les plantes sont utilisées par l'Homme pour différents besoins notamment la nourriture et la santé. De nos jours, la nature fournit toujours une source plus fiable d'agents médicaux. Presque 40 % de médicaments actuellement disponibles sont des dérivés directs ou indirects des précurseurs naturels issus des plantes (SOHAIL *et al.*, 2011). En Afrique, les populations dépendent encore largement des plantes médicinales pour guérir les maladies. L'utilisation des remèdes à base de plantes est une partie intégrante de la culture africaine.

Environ 2 à 4 % d'espèces végétales contiennent une grande quantité de constituants antinéoplasiques et/ou cytotoxiques. Les composés isolés à partir de ces espèces conduisent aux développements de nouveaux produits puissants qui inhibent le développement des tumeurs (FASLA, 2009).

Peganum harmala L., de nom local harmel, est un remède populaire. Les graines sont utilisées comme antispasmodiques en Afrique du Nord (BELLAKHDAR, 1997) et au moyen orient (SIDDIQUI *et al.*, 1987). *Peganum harmala* L. est très réputée pour sa richesse en métabolites secondaires ce qui la classe parmi les plantes hallucinogènes à effets psychotropes (DUKE, 1929 ; FARNSWORTH, 1968). Elle possède également des propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-virales, anti- oxydantes, anti-diabétiques, antitumorales, anti-leishmanioses. Elle présente également une activité cytotoxique, ainsi que des effets hépato-protecteurs (JINOUS et FERESHTEH, 2012). Cependant mal utilisée elle peut est très toxique pour les animaux et l'homme en particulier. Elle est responsable de la paralysie du système nerveux et entraîne la mort par arrêt respiratoire chez les vertébrés, et peut provoquer l'interruption de grossesse chez les femmes (BELLAKHDAR, 1997). Elle est également abortive et anti-fertilisante chez les rats (NATH *et al.*, 1993).

Afin de contribuer à la valorisation des plantes médicinales locales réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous nous sommes intéressés dans le présent travail, à l'étude de l'activité antiproliférative et cytotoxique de la fraction des flavonoïdes des feuilles de *Peganum harmala* L., récolté à Timzerth. Dayate Aiat dans la wilaya de Laghouat au sud algérien.

Peganum harmala L.

1.1 Description de la plante

Peganum harmala L. appelé aussi « Harmel ou Harmel El sahari » est une plante herbacée, vivace, glabre, buissonnante de 30 à 90 cm de hauteur à rhizome épais. Les tiges dressées, très rameuses disparaissent l'hiver. Elles portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites. Les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert. Les graines : nombreuses, petites, anguleuses, sub-triangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé (figure 1). Elles ont une saveur amère. On les récolte en été. Le tégument externe de la graine renferme un pigment rouge connu sous le nom de "Turkey red". Cette plante est présente surtout dans les zones arides, sur les sols sableux et légèrement nitrés (PREEDY *et al.* , 2011)



Figure1 : les différentes parties de *Peganum harmala* L. A : arbuste ; B : la graine ; c : le fruit ; D : la fleur (PREEDY *et al.* , 2011)

1.2 Classification

Peganum harmala L. appartient à la famille des Zygophyllaceae, qui compte 22 genres et plus de 250 espèces (JINOUS et FERESHTEH, 2012). D'après DOBIGNARD et CHATELAIN (2013), la position taxonomique du Harmel est la suivante :

Ordre : Sapindales

Famille : Zygophyllaceae

Genre : *Peganum*

Espèce : *Peganum harmala* L.

1.3 Distribution géographique

Elle est largement distribuée à travers le monde, généralement dans la zone méditerranéenne surtout dans les zones sèches en Europe comme l'Espagne, la Russie, Hongrie, en Afrique (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux Algériens, Tunisie, steppes de la Lybie, déserts d'Egypte), et en Asie, elle est répandue dans les steppes de l'Iran, du Pakistan, du Turkestan jusqu'au Tibet et en Sibérie (YOUSFI *et al.*, 2009 ; MOSHIRI *et al.*, 2013).

1.4 Utilisation traditionnelle

L'Harmel est très utilisé en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine. Elle est utilisée pour traiter différents troubles. En gynécologiques elle traite l'emménagogue et la stérilité féminine. En médecine générale, elle est utilisée comme hypnotique, antipyrétique, antalgique et antitussif. Elle est également très utilisée dans le traitement de troubles digestifs (GOEL *et al.*, 2009). On peut l'utiliser dans les traitements cutanés et infectieux. Cutané parce qu'elle est antiseptique et cicatrisante, dermatoses (eczémas) et brûlures, (MONSIF *et al.*, 2004) et infectieux comme tétanos néonatal ; antipaludique ; oreillons (IDRISSI AND HERMAS, 2008), et aussi utilisé contre autres maladie tel que : diabète, hypertension artérielle, empoisonnement (venins de serpent) le rhumatisme et les problèmes nerveux. L'hermine permet d'atténuer les tremblements de la maladie de Parkinson (ISERIN, 2001).

1.5 Les métabolites secondaires

Le métabolisme primaire regroupe toutes les voies de synthèse de composés indispensables à la croissance et au développement de la plante. Les métabolites primaires qui

en proviennent ont donc un rôle clé et bien établi chez tous les végétaux (acides aminés et protéines, acides gras, sucres et polysaccharides...). Par opposition, le métabolisme secondaire regroupe les autres voies de synthèse de composés qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance de la plante. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (soutien, protection contre les UV, défense, mise en place de symbiose, attraction d'insectes utiles pour la pollinisation...). Ces composés sont composés phénoliques (les flavonoïdes, Les lignines, Les acides phénoliques (HERMS et MATTSON, 1992).

Les polyphénols ou composés phénoliques constituent un groupe largement distribué dans le monde végétal. Ils sont divisés en une dizaine de classes chimiques, qui présentent en commun la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (VERMERRIS et NICHOLSON, 2006). Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important chez les plantes (BETA *et al.*, 2005).

1.5.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires, hydrosolubles. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont largement abondants dans les légumes, les feuilles (salade, choux, épinards, etc), et aussi dans les téguments externes des fruits (LAWSON, 2006). Les flavonoïdes ont plusieurs rôles tels que la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (HADI, 2004), et aussi un rôle dans la défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes (BOVY, 2004).

1.5.1.1 Structure chimique et classification

Les flavonoïdes possèdent un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Figure 2), et le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone (VERMERRIS et NICHOLSON, 2006).

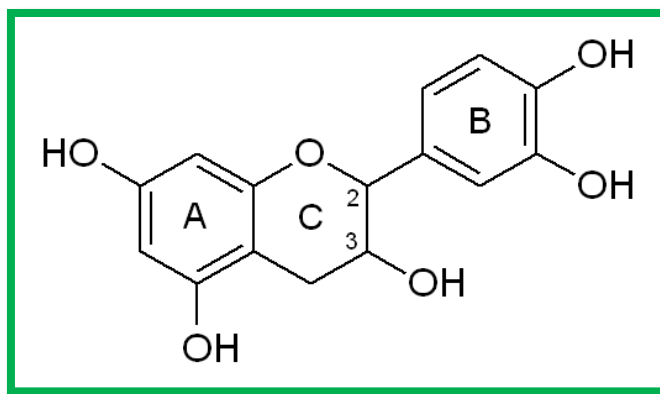


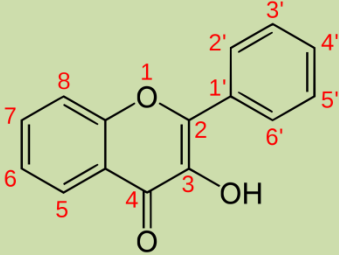
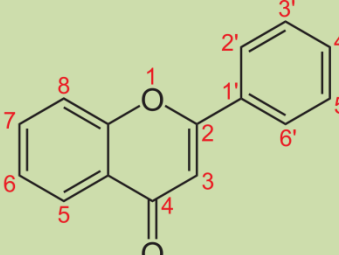
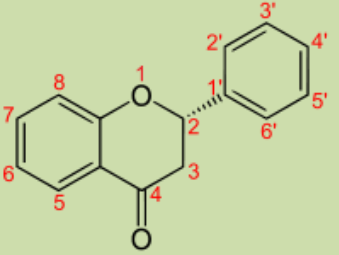
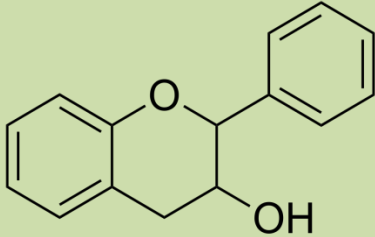
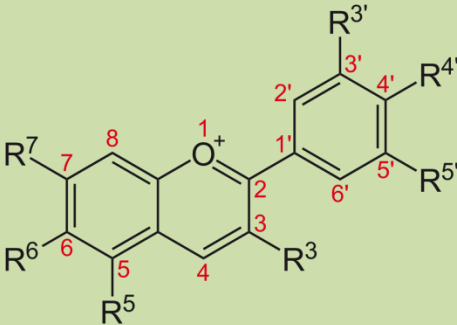
Figure 2 : structure moléculaire de base des flavonoïdes (VERMERRIS et NICHOLSON, 2006).

1.5.1.2 Les classes des flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent en fonction de la structure de molécules. En effet, plus de 6400 structures ont été identifiées (HARBORNE et WILIAMS, 2000), les plus importantes 7 Généralités sur les plantes médicinales sont les flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, auronnes, chalcones, anthocyanins (EFFENDI *et al.*, 2008). Tableau I.

Peganum harmala L.

Tableau I : les principales classes de flavonoïdes (EFFENDI *et al.*, 2008)

Flavonoïdes	Exemple	Structure	Caractéristique
Flavonols	Quercétine Kaempférol Myricétine		Le groupes le plus abondants des composés phénoliques.
Flavones	Utéoline Apigénine Chrysine		Les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration.
Flavanone	Genisteine Daidzeine Naringénine		Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée
Flavan3-ols	Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine		Flavan3ols ainsi que flavan3, 4diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques
Anthocyanidines	Cyanidine Delphénidine Cyanidol		Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.

1.5.1.3 Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (VERMERRIS and NICHOLSON, 2006). Ces molécules sont retrouvées dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Elles sont consommées régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes type flavines et flavanols qui sont les plus abondants (SCHEWE and SIES, 2003). La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée, ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (ISHII *et al.*, 2003). La plupart des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive. Il semblait alors que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle (WILLIAMSON *et al.*, 2000).

1.5.2 Autres métabolites secondaires

En plus des flavonoïdes, *Peganum harmala L.* renferme d'autres métabolites secondaires d'intérêt biologique. Les alcaloïdes constituent la principale classe de ces molécules bioactives. Les alcaloïdes de type β -carbolines tel que l'harmine, l'harmaline, l'harmalol et l'harmane et leurs dérivés forment une grande famille hétérogène. Ces composés phytochimiques présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine (KAMEL *et al.*, 1970). Ils sont caractérisés par un grand nombre d'activités biologiques telles que : l'activité analgésique, diurétique, anthelminthique, antiproliférative, abortive et antimicrobienne (TAHROUCH *et al.*, 2002). En plus des alcaloïdes, il existe aussi les composés terpéniques qui sont des molécules à nombre de carbones multiple de 5, et dont le précurseur est l'isoprène. Ce sont des composés synthétisés à partir de l'acétyl-CoA. Les iridoïdes et les saponosides sont les principaux composés terpéniques du genre *Peganum* (BIANCO *et al.*, 1980).

Cycle cellulaire

2.1 Définition du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation, par division de la cellule mère, et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles grâce à la mitose. Le cycle cellulaire comprend deux phases l'interphase et la mitose. (MAILLET, 2002).

2.1.1 L'interphase

L'interphase correspond, en général, à la plus grande partie du cycle, elle se décompose en une phase G₁, une phase S et une phase G₂ (MAILLET, 2002). Figure 3.

➤ Phase G₁

La phase G₁ est une phase de présynthèse au cours de laquelle la cellule se prépare à la réplication (synthèse d'enzymes) et accumule des réserves pour la division cellulaire, et synthétise les molécules d'ARN (messagers, ribosomiaux et de transfert) et les protéines nécessaires à l'accroissement cellulaire.

➤ Phase S

C'est la phase de synthèse caractérisée par : la duplication de l'ADN, la synthèse des histones la duplication du centriole.

➤ La phase G₂

C'est la phase pré mitotique, Un certain nombre de facteurs y sont synthétisés, en particulier les facteurs de condensation de la chromatine. Comme la phase G₁, elle représente une phase de croissance cytoplasmique.

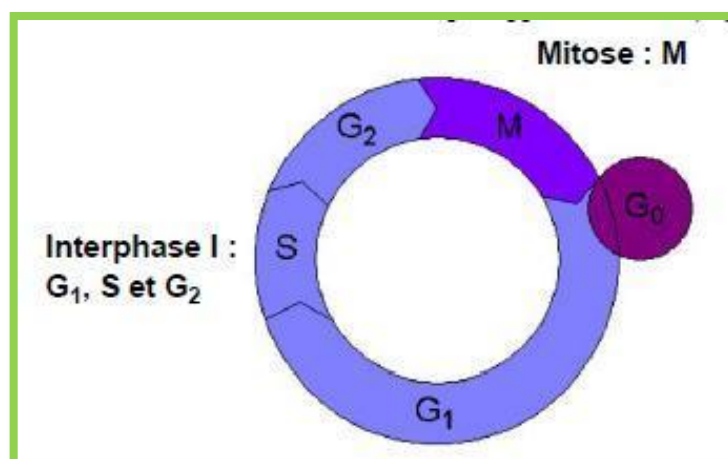


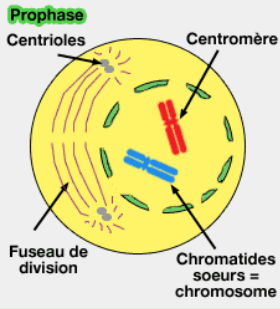
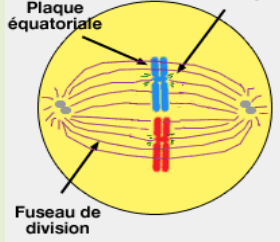
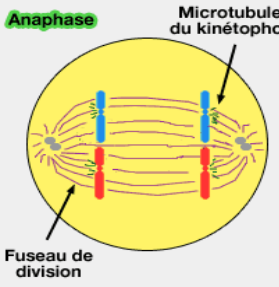
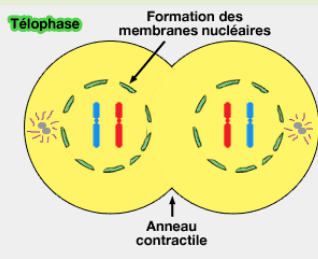
Figure 3 : les différentes étapes du cycle cellulaire (COLOMBEL.2009)

Cycle cellulaire

2.1.2 La mitose

La mitose est un phénomène continu, qui désigne une étape bien particulière du cycle de vie des cellules eucaryotes. Ce processus comprend, une division nucléaire (caryocinèse); une division cytoplasmique (cytodiérèse). La caryocinèse comprend quatre phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Elle est produite grâce au fuseau mitotique constitué de microtubules (ALBERTS *et al.*, 1997). Les différentes phases de la mitose sont mentionnées dans le tableau2 ci-dessous.

Tableau II : les différentes phases de la division cellulaire (ALBERTS *et al.*, 1997).

La prophase	La métaphase	L'anaphase	La télophase
<p>Dure 20 à 30 minutes, et est caractérisée par :</p> <p>La condensation de la chromatine en structures très ordonnées et individualisées appelées chromosomes, suite à un enroulement accru de la fibre chromatinienne qui semble se "condenser".</p> <p>Le nucléole diminue de taille et disparaît.</p> <p>Le cytosquelette de microtubules se réorganise pour former le fuseau mitotique, structure bipolaire qui s'étend entre les deux centrosomes.</p>	<p>Dure 20 à 30 minutes, caractérisée par :</p> <p>Un rassemblement de tous les chromosomes sur la plaque équatoriale (partie moyenne de la cellule) fixés par leurs kinétochores, à distance égale des deux pôles.</p> <p>Condensation maximale des chromosomes.</p> <p>Le chromosome métaphasique : est au maximum de sa condensation, et est constitué de deux chromatides reliés par un centromère.</p>	<p>Dure 5 à 8 minutes.</p> <p>Clivage du centromère, les chromatides deviennent indépendants.</p> <p>Raccourcissement des microtubules kinétochoriens, et ascension polaire des chromatides qui deviennent des chromosomes indépendants, partagés en deux lots identiques dans chaque pôle.</p> <p>Elongation des microtubules polaires entraînant un allongement de la cellule.</p>	<p>Dure 20 minutes</p> <p>Arrêt de migration des chromosomes regroupés en éventail aux pôles cellulaires</p> <p>Les chromatides commencent à se décondenser</p>
 <p>Prophase Centrioles, Centromère, Fuseau de division, Chromatides soeurs = chromosome</p>	 <p>Plaqué équatoriale, Fuseau de division</p>	 <p>Anaphase Microtubules du kinétophore, Fuseau de division</p>	 <p>Télophase Formation des membranes nucléaires, Anneau contractile</p>

2.2 Agents antimitotiques et leur différente action

Des substances végétales ou des radiations qui a faible concentration sont capables de perturber la division cellulaire empêchant ainsi la formation des deux cellules filles (MAILLET, 2002 et FASLA, 2009). Des molécules bioactives chimique de structure et d'origine variée sont capable d'exercée une action antimitotique spécifique soit sur l'ADN, l'enzyme ou les microtubules.

2.2.1 Action sur l'ADN

2.2.1.1 Agents alkylants

C'est un groupe d'agents chimique de constituants assez différents, qui possède en commun la propriété alkyler a la température de l'organisme plusieurs fonction organique thiol (SH) hydroxyle (OH) carboxyle (COOH) amine (NH₂) incluse dans une chaine linéaire ou dans un cycle comme celui des base purique et pyrimidique ainsi que les phosphate des liaisons phosphodiester (ALLAIN ,2005).

L'alkylation au niveau des groupements phosphates est suivie d'une cassure de la chaîne de l'ADN (FOLLEZOU et POUILLART, 1980). L'alkylation des bases nucléiques porte principalement sur la guanine en O6 ou N7 (Figure 4), ainsi on distingue (BERTHET, 2006).

❖ Les alkylants monofonctionnels : provoquent surtout des mutations GC → AT par ce que la guanine en O6 s'apparie à la thymine plutôt que la cytosine.

❖ Les alkylants bi fonctionnels : forment des ponts entre résidus, guanines voisines, bloquant ainsi la réplication de l'ADN.

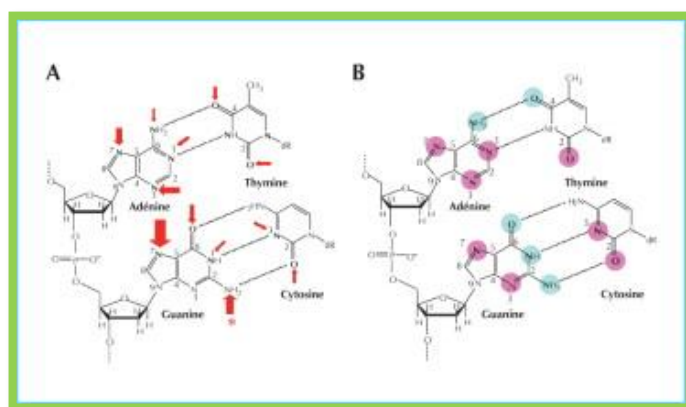


Figure 4 : Principaux sites d'action des agents alkylants sur nucléotide (FOLLEZOU et POUILLART, 1980).

Cycle cellulaire

2.2.1.2 Agents scindants (Bleomycines)

Les bleomycines sont des glycopeptides chélateurs de métaux qui dégradent l'ADN provoquant des fragmentations de la chaîne et la libération des bases agent scindant ciseaux chimiques, ainsi que leur action sur l'ADN est liée à la libération de radicaux libres par chélation de l'ion ferreux, puis oxydation générant des ions superoxyde. La bleomycine est activée en phase G2 durant la mitose mais aussi sur les cellules qui ne sont pas en division (G0).

2.2.2 Action sur les enzymes

2.2.2.1 Les Anti métabolites

Ce sont des substances dont la configuration spatiale est très voisine des métabolites indispensables aux synthèses cellulaires. Dans certains cas, l'anti métabolite est un inhibiteur compétitif d'une enzyme (MAILLET, 1979).

2.2.2.2 Les antifolique

Les folates sont essentiels à la synthèse des bases puriques (thymidine), lesquels sont essentiels pour la synthèse de l'ADN et la division cellulaire. Pour agir comme coenzymes. Les folates doivent être réduits en tétrahydrofolate (FH4) par la dihydrofolate réductase (LECHAT, 2004).

Le méthotrexate analogue des folates présente une affinité supérieure pour la dihydrofolate réductase que les folates eux-mêmes. Cette compétition conduit rapidement à la duplication de la cellule en tétrahydrofolate et donc à l'interruption de la synthèse de l'ADN (figure 5). La toxicité du méthotrexate est maximum en phase S (GORIN *et al* ; 1996).

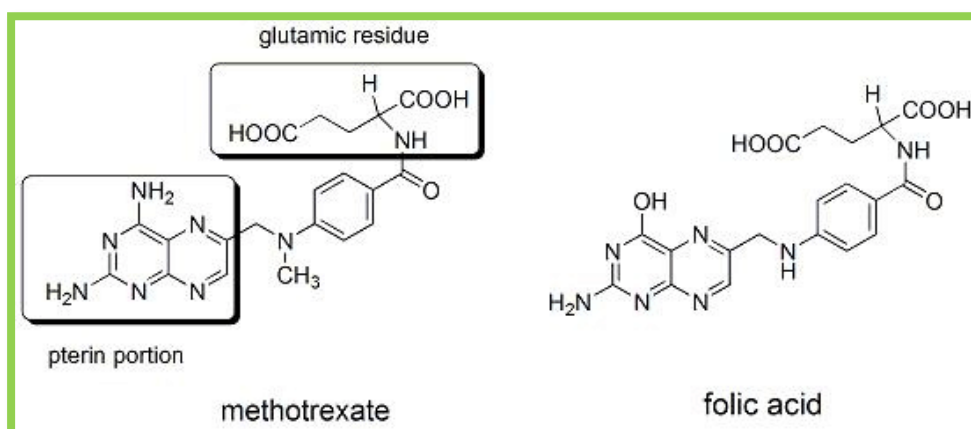


Figure 5 : structures de l'acide folique et du méthotrexate (ALLAIN, 2005)

Cycle cellulaire

Un microtubule est un cylindre creux de 25 nm de diamètre dont la paroi est constituée de 13 protofilaments, chacun d'eux est une succession d'hétérodimères alpha/bêta tubuline (Figure 6). Ce cylindre comporte deux extrémités (Amos et Baker, 1979) :

« **Extrémité plus (+)** » où la vitesse d'addition des monomères de tubuline est plus élevée

« **Extrémité moins (-)** » où la vitesse de dissociation des monomères de tubuline est plus élevée.

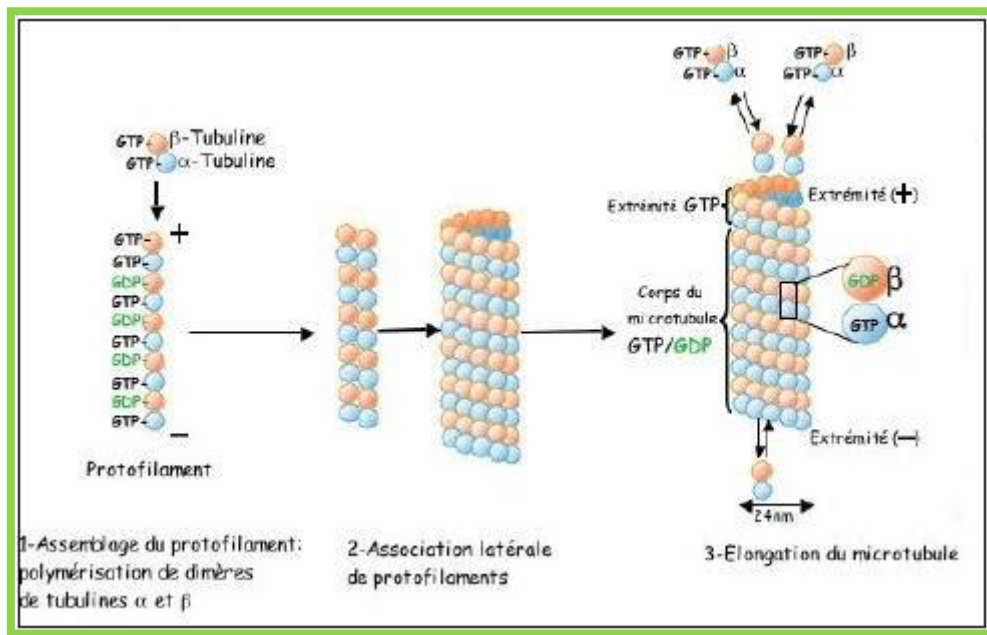


Figure 6 : dynamique de la formation de microtubule (AMOS ET BAKER, 1979).

Les microtubules se forment généralement à partir du centre organisateur des microtubules (MTOC : *microtubule organizing center*), auquel ils restent attachés par l'extrémité dite « moins ».

Le microtubule est par nature instable. Ainsi, en présence de protéine kinase, sa taille s'accroît (polymérisation GTP dépendante) ; en présence de phosphatase, elle décroît (dépolymérisation par phosphorylation). Le passage de la polymérisation à la dépolymérisation ou l'inverse correspond à ce qu'on appelle « instabilité dynamique Cette instabilité est essentielle à (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001) :

- L'attachement des chromosomes au fuseau mitotique ;
- Leur alignement en métaphase
- La séparation des chromatides durant la mitose

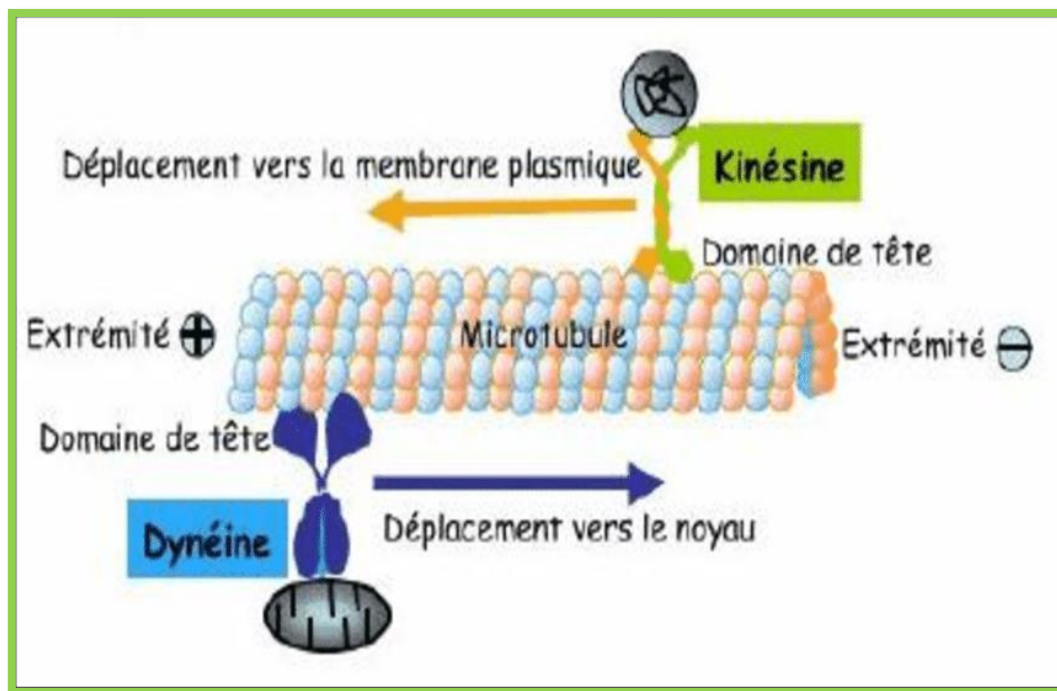


Figure 7 : les protéines motrices des microtubules (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001).

2.2.3 Action sur les microtubules : poisons du fuseau mitotique

Lors de la mitose il y a deux moments favorables à l'action des poisons du fuseau (MAUSSANG, 2005).

-Au cours de la polymérisation des tubulines en microtubules ce qui correspond à l'action des inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules (alcaloïdes de Vinca ; colchicine ; podophyllotoxines

-Au moment de la dépolymérisation des microtubules en tubuline ce qui correspond à l'action des inhibiteurs de désassemblage des microtubules en tubuline (taxol).

-En interagissant avec la tubuline et les microtubules, ces poisons bloquent les cellules en mitose, ce qui se traduit par (VERDIER-PINARD *et al.*, 2001) :

- Leur accumulation en phase G2/M du cycle ;
- L'augmentation du nombre de cellules à ADN chromosomique condensé ;
- L'accumulation de complexes cdk1/cycline B actifs.

2.3 Inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules

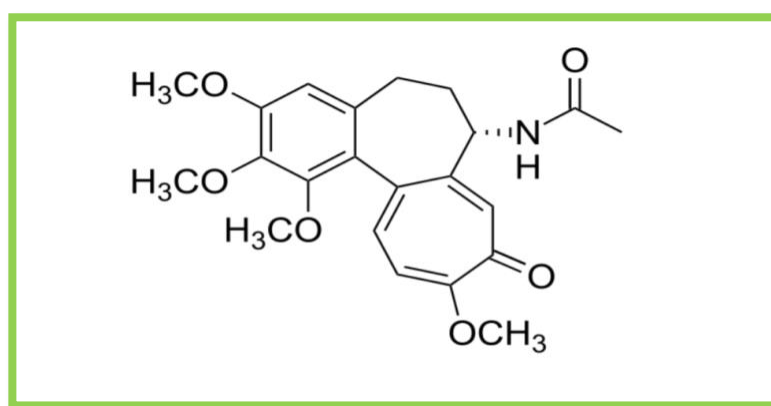
2.3.1 La colchicine

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines charnues du colchique *colchicum autumnale* L. (Liliaceae), qui en se fixant sur une molécule de la tubuline empêche sa polymérisation en microtubules (figure 7).

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



A



B

Figure 8:(A) *colchicum autumnale* L., (B) structures de la colchicine (ALLAIN, 2005)

2.3.2 Les Vinca-alcaloïdes

Les Vinca-alcaloïdes proviennent de *Catharanthus roseus* G. de Madagascar, de la famille des Apocynacea (GUERITTE et FAHY, 2005). Cette plante produit deux molécules bioactives qui appartiennent à la famille des alcaloïdes (hétérocycles azotés) : la vinblastine et la vincristine (figure 8). Ces dernières inhibent la formation des microtubules et interfèrent avec la formation du fuseau mitotique et l'établissement du cytosquelette. Ceci conduit à un blocage de la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau mitotique et la dispersion des chromosomes au hasard à travers le cytoplasme (EPSIE *et al.*, 1998).

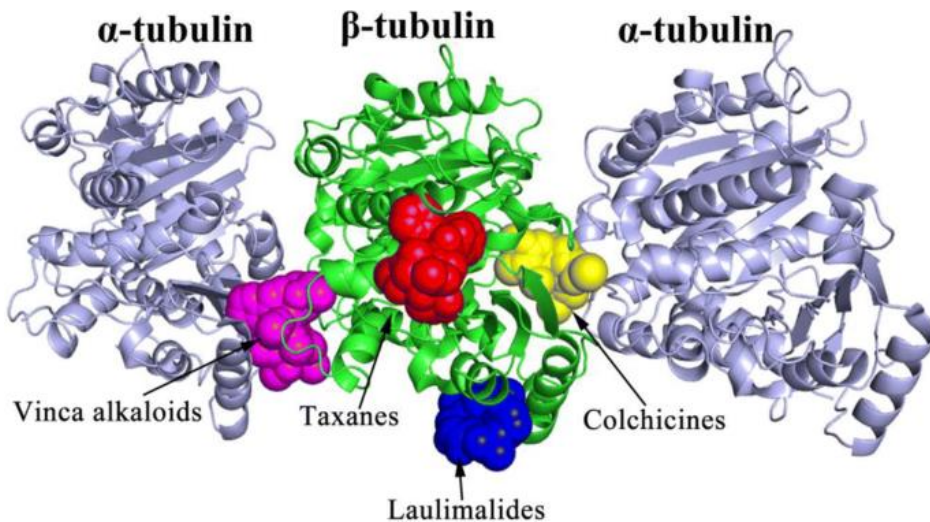


Figure 9 : site d'action des Vinca-alcaloïdes (EPSIE *et al.*, 1998).

2.3.3 La curcumine

La curcumine est une molécule extraite de la racine de *Curcuma longa*, une plante originaire d'Asie (Figure 9). Elle est utilisée depuis des siècles dans les cuisines et les médecines traditionnelles hindoues et chinoises. Cette molécule est reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires (REUTER *et al.*, 2009). Elle est également capable d'induire la mort des cellules cancéreuses, principalement par apoptose (DUVOIX *et al.*, 2003 ; TEITEN *et al.*, 2010).

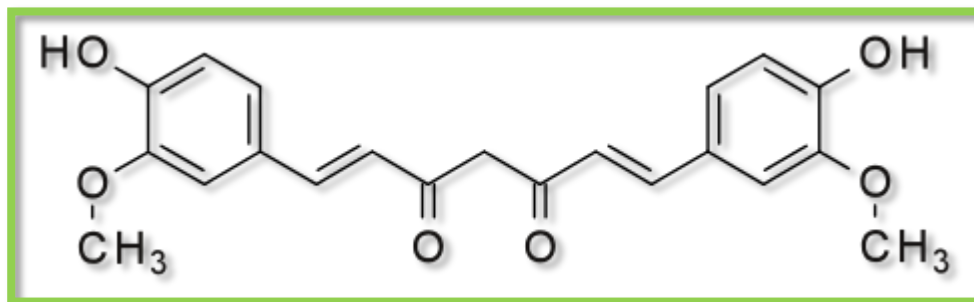


Figure 10 : Structure de la curcumine (REUTER *et al.*, 2009).

Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université Mouloud Mammeri.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet antiprolifératif de la fraction des flavonoïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellules eucaryotes.

1.1 Matériel

1.1.1 Matériels biologiques

Le matériel biologique est constitué :

Des feuilles de *Peganum harmala* L. qui ont été récoltées dans la région Timzerth. Dayate Aiat a Laghouat. Les feuilles de cette plante ont été lavées, puis séchées et broyées en poudre fine. Le produit final est maintenu à température ambiante pour des utilisations ultérieures.

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

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

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

Partie expérimentale

1.1.2 Matériel de laboratoire

En plus du matériel conventionnel de laboratoire nous avons utilisé entre autres :

- l'évaporateur rotatif pour éliminer les solvants ;
- un bain Marie, une centrifugeuse, et un spectrophotomètre utilisé pour les dosages ;
- ampoules à décanter qui nous ont permis d'obtenir les fractions de flavonoïdes.

1.1.3 Réactifs et solvants

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

Tableau IV : liste des solvants et réactifs

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

1.2 Méthodes

1.2.1 Extraction des fractions de flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée à partir de la poudre de feuillets de *Peganum harmala L.* par la méthode (liquide-liquide) décrite par BEKKARA *et al.*, (1998).

Les différentes étapes sont résumées ci-dessous :

Partie expérimentale

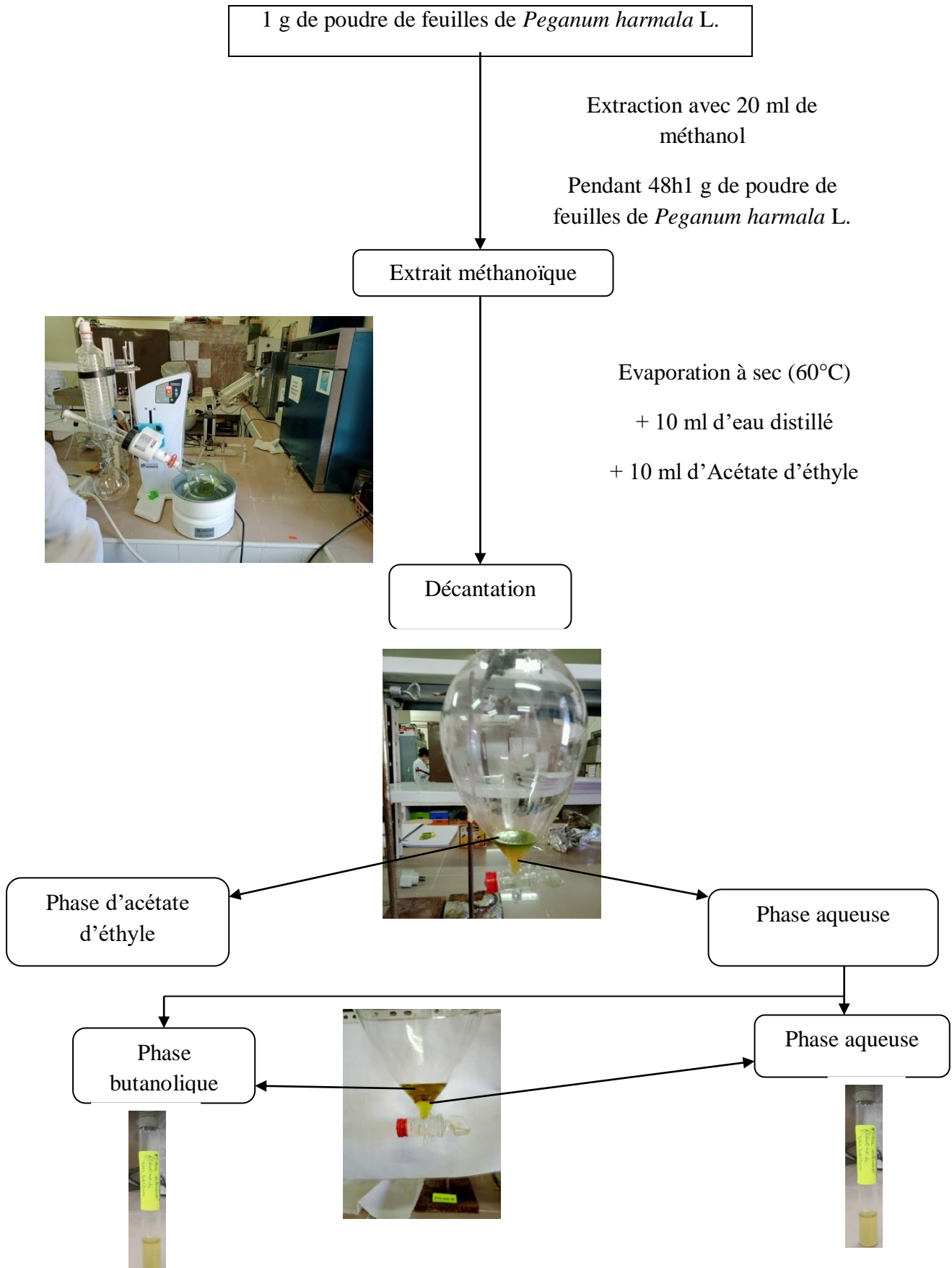


Figure 11 : schéma récapitulatif des étapes de l'extraction des fractions

Partie expérimentale

1.2.2 Préparation du milieu Potato-Dextrose-Broth (PDB)

Le milieu PDB est préparé comme suite :

- ❖ 100g de pomme de terre épluché et découpée en fins des sont mises a cuisson dans 100ml d'eau distillée pendant 15a 20min suivie d'une filtration.
- ❖ Le filtrat récupéré est mis dans un Erlen Meyer à agiter en chauffant.
- ❖ On rajoute 10gde glucose et on complète à 500ml de l'eau distillé. Le mélange est retiré de la plaque chauffante lorsqu'il est homogène et clair.
- ❖ Repartir le bouillon dans des flacons puis autoclaver le milieu de culture 120°C pendant 20 min.

1.2.3 Evaluation in vitro de l'activité antiproliférative

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

1.2.3.1 préparations de l'inoculum de levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un modèle d'étude possédant de nombreux avantages : croissance rapide, préparation de milieux culture facile, conservation des caractères biochimiques, pouvoir prolifératif rapide. La préparation de l'inoculum de levures consiste à les revivifier dans un milieu PDB stérilisé et incubé à 30°C pendant 24 heures. Ces différents étapes ce sont déroulées dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination pouvant fausser les résultats.

Des dilutions de demi en demi ont été préparées à partir d'une solution mère de levures d'une densité optique (DO à 650 nm) proche de 1. Une numération à l'aide de la cellule Malassez. A partir d'un aliquote de 10 µl pour déterminer la concentration qui correspond à chaque dilution. Les principales étapes de dénombrement cellulaire avec la cellule de Malassez sont détaillées en annexe2. Ces valeurs nous ont permis de tracer une courbe étalon $DO = f(\text{concentration cellulaire})$.

1.2.3.2 Actions des fractions de flavonoïdes sur la prolifération *Saccharomyces cerevisiae*

Pour mettre en évidence l'effet de la fraction flavonoïdes sur la prolifération *Saccharomyces cerevisiae* nous avons optée pour la méthode de bleu de méthylène

Partie expérimentale

➤ Principe de coloration au bleu de méthylène

La méthode de coloration au bleu de méthylène est une méthode qui permet de faire une estimation rapide du taux de viabilité et mortalité des cellules. Les cellules de levures vivantes possèdent une enzyme qui décolore le bleu de méthylène contrairement aux cellules mortes. Il est par conséquent simple de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes en les observant sous microscope optique : les cellules mortes sont colorées en bleu et les cellules vivantes sont incolores (PAINTING et KIRSOP, 1990).

➤ Mode opératoire

Une série de quatre tubes (figure 12) contenant 2.5 ml du milieu de culture pdb stérile sont inoculés par 250 µl d'une suspension de levure *Saccharomyces cerevisiae* de densité optique 0.1 à 650nm (équivalent à 10⁶cellule /ml). 250µl de l'agent antiprolifératif est ajoutés aux précédent tube (fraction flavonoïde aqueuse, fraction flavonoïde butanolique). Un témoin positif (la quercetine 1 mg/ ml) et un témoin négatif (eau distillée après l'incubation 30°C pendant 24heure. 0.5 ml de bleu de méthylène sont ajoutés à tous les tubes, puis sous microscope optique et à l'aide de la cellule de Malassez (annexes 2) un comptage des cellules vivantes et mortes a été effectué dans 16 chambres. Trois observations ont été faites pour chaque tube. Les cellules vivantes apparaissent incolores et les cellules mortes sont de couleur bleu. Le pourcentage de cytotoxicité est estimé en utilisant la formule suivante :

Nombre de cellule morte

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

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

Partie expérimentale

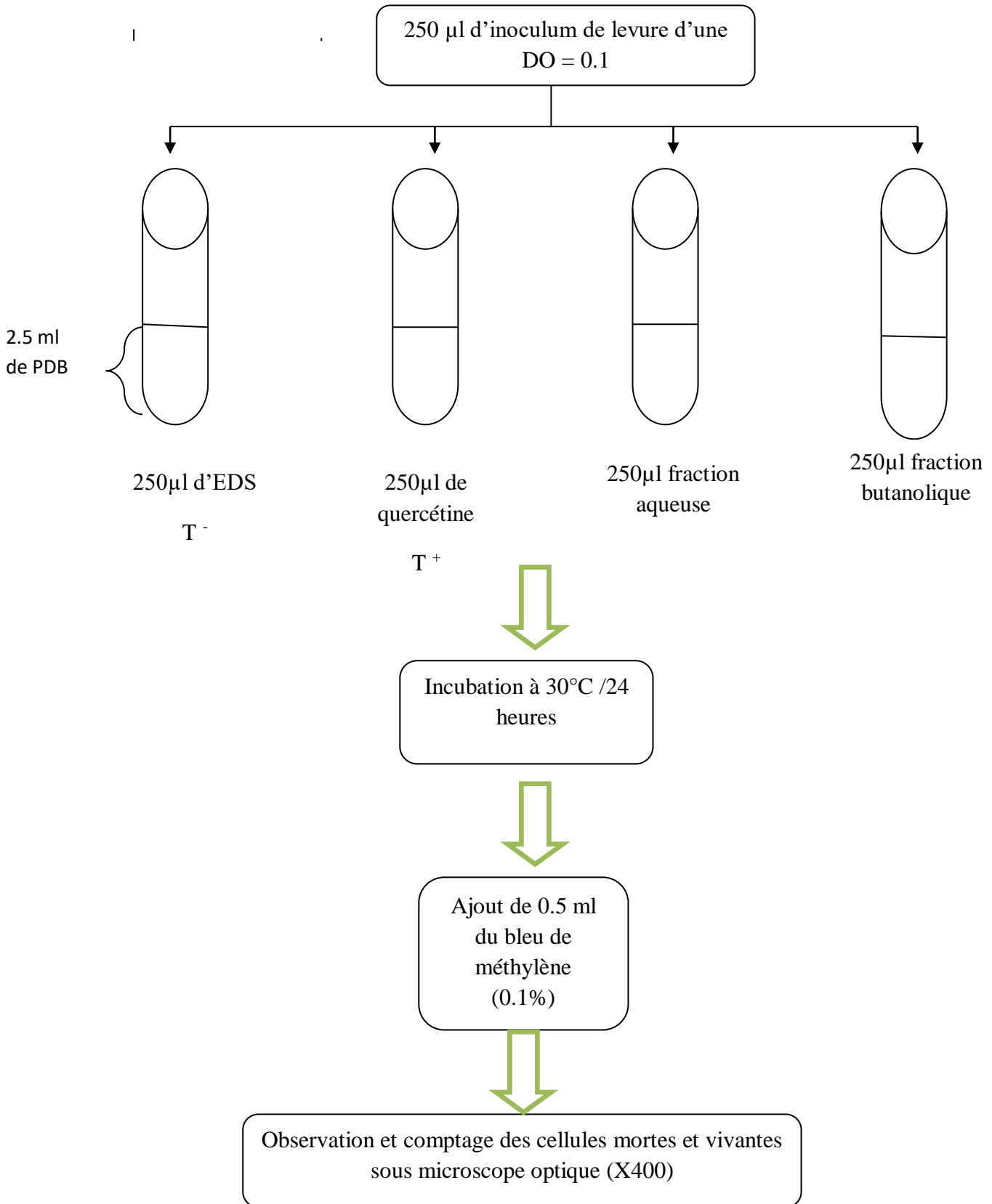


Figure 12 : les différentes étapes du test antiprolifératif

1.2.4 Analyse statistique

Pour cette étude des analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test d'analyse de variance (ANOVA) pour mettre en évidence la signification des différences obtenues entre les fractions étudiées, et les standards.

2 Résultat et discussion

2.1 Extraction des flavonoïdes

Le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur leur degré de solubilité dans les solvants organiques (BRUNETON, 1999 ; KEBIECHE *et al.*, 2011). Les solvants utilisés sont le méthanol, acétate d'éthyle et le n-butanol. Après décantation on récupéré deux phases de flavonoïdes : phase aqueuse et une phase butanolique représenté dans la figure13 suivante.

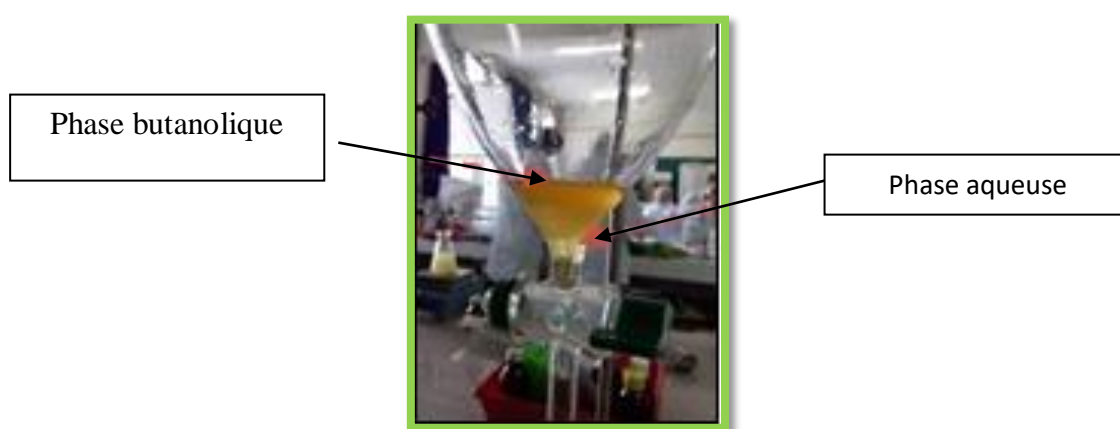


Figure 13 : décantation des deux fractions des flavonoïdes

2.2 Activité antiproliférative des flavonoïdes de *Peganum harmala* L.

L'activité antiproliférative des fractions de flavonoïdes (aqueuse et butanolique) des feuilles de *Peganum harmala* L. sur les levures *Saccharomyces cerevisiae* est comparé à l'action du témoin positif (quercétine).

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

Les pourcentages de cytotoxicité de la quercétine sur *Saccharomyces cerevisiae* sont consignés dans le tableau suivant

Partie expérimentale

Tableau V : pourcentages de cytotoxicité de la quercétine

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

Ces résultats montrent que la quercétine présente un pourcentage de cytotoxicité $47.026 \pm 2.262\%$. La quercétine est un flavonoïde connu pour son activité antiproliférative. Elle est isolée à partir de nombreuses plantes médicinales. Elle possède des effets toxiques et génotoxique (SILVA *et al.*, 2002 ; SOARES *et al.*, 2006 ; ENGEN *et al.*, 2015). Elle présente une forte affinité de liaison avec l'ADN, ce qui induit des dommages au niveau de l'ADN et des chromosomes dans les cellules cancéreuses (CANTERO *et al.*, 2006).

Le test type ANOVA réalisé entre le témoin négatif et la quercétine montre une différence hautement significative ($P=0.00$), cela confirme le bon choix de la quercétine comme témoin positif dans la détermination de l'effet antiprolifératif et cytotoxique.

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

Les pourcentages de cytotoxicité de la fraction butanolique sur *Saccharomyces cerevisiae* sont consignés dans le tableau suivant

Tableau VI : le pourcentage de cytotoxicité de la fraction butanolique.

	% de cytotoxicité	Moyenne ± ES
Eau distillée	0.000	0.000 ± 0.000
	0.000	
	0.000	
Fraction butanolique flavonoïde	76.595	74.218±0.980
	73.333	
	72.727	

La fraction butanolique de flavonoïdes présente un pourcentage de cytotoxicité de 74.218 ± 0.980 . L'extrait butanolique des parties aériennes de *Fagonia microphylla*

Partie expérimentale

(Zygophyllaceae), qui est une espèce endémique du Sahara septentrional, récoltée dans la région de Ghardaïa, montre bien la richesse de ce dernier en saponosides (ABDEL *et al.*, 2000). Vu que *Peganum harmala* L appartient à la famille des Zygophyllaceae, on peut déduire que l'effet cytotoxique de la fraction butanolique peut être expliqué par la présence des saponines, qui ont la capacité d'induire la formation des pores à travers les membranes cellulaires (MAKKAR et BECKER, 1997).

Le test type ANOVA réalisé entre la fraction butanolique et le témoin négatif (eau distillée) montre une différence hautement significative ($P=0.004$). Ceci confirme l'effet cytotoxique de la fraction butanolique des flavonoïdes des feuilles de *Peganum harmala* L.

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

Les pourcentages de cytotoxicité de la fraction aqueuse sur *Saccharomyces cerevisiae* sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau VII : pourcentage de cytotoxicité de la fraction aqueuse.

	% de cytotoxicité	Moyenne \pm ES
Eau distillée	0.000	0.000 \pm 0.000
	0.000	
	0.000	
Fraction aqueuse flavonoïde	53.125	45.297 \pm 3.217
	42.187	
	40.579	

La fraction aqueuse de flavonoïdes présente un pourcentage de cytotoxicité de 45.297 \pm 3.217. Les flavonoïdes sont généralement cytotoxiques. Cette efficacité dépend d'une part de leur glycolisation éventuelle et d'autre part de leur degré de méthylation. Ces résultats sont en accord avec ceux de VERSTRAETEN *et al.*, (2003) et RAMCHOUN *et al.* (2015), qui ont montré que les flavanols et les procyanidines interagissent avec les groupements polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes et s'accumulent ainsi à la surface.

Le test type ANOVA réalisé entre la fraction aqueuse et le témoin négatif montre une différence hautement significative ($P=0.00$). Ceci confirme l'effet cytotoxique de la fraction aqueuse des flavonoïdes des feuilles de *Peganum harmala* L.

Conclusion

La présente étude a concerné l'évaluation de l'effet antiprolifératif et cytotoxique des fractions flavonoïques : aqueuse et butanolique des feuilles de *Peganum harmala* L. sur les levures *Saccharomyces cerevisiae* par la méthode au bleu de méthylène.

Nos résultats ont révélé que nos deux fractions ont un effet sur la prolifération des levures. Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction butanolique ($74.218 \pm 0.980\%$) est plus important que celui obtenu avec la fraction aqueuse ($45.297 \pm 3.217\%$) comparativement à la quercétine ($47.026 \pm 2.262\%$) utilisé comme standard. L'étude statistique de type ANOVA a mis en évidence une différence hautement significative ($P=0.00$) entre les extraits testés (la fraction butanolique, aqueuse) et la quercétine.

La détermination de l'effet antiprolifératif et cytotoxique d'extrait de plante par la coloration au bleu de méthylène est une méthode fiable, peu coûteuse et rapide. De plus les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* représentent un bon modèle de cellules eucaryotes dans la recherche des molécules bioactives à l'origine de l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

En perspective il serait intéressant de :

- ❖ Isoler et identifier les principes actifs responsables de l'activité antiproliférative et cytotoxiques ;
- ❖ Réaliser une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses ;
- ❖ Déterminer d'autres activités biologiques de la fraction de flavonoïdes telle que l'activité antibactérienne, *anti* parasitaire et anti mitotique.

Références bibliographique

Allain P. (2005). Les médicaments. In http (Consulté le 14/06/2007).

ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. et WOLTER. (1997). L'essentiel de biologie cellulaire : Introduction à la biologie moléculaire de la cellule. Médecine- Science Flammarion, ed., p. 5.

AMOS L.A. et BAKER T.S. (1979). The three dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*, 279: 607-612.

BEKKARA et al. (1998) Distribution of phenolic compounds with in seed and seed tannins contened and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and soil* 203 : 27-36.

BELLAKHDAR J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle ; Médecine arabe et ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. p.247.

BERTHET J. (2006). Dictionnaire de biologie. De Boeck université, ed., p. 1046.

BETA T., NAM S., DEXTER J.E. et SAPIRSTEIN H.D. (2005). phenotic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-Milled fractions. *Cereal chem* 82,390-393.

BEZANGER-BEAUQUESNE L., PINKAS M., TORCK M. et TROTIN F. (1980). Plantes médicinales des régions tempérées. Maloine, ed., Paris. p. 156.

BIANCO A., GUISO M., IAVARONE C., PASSACANTILLI P. et TROGOLO C. (1980). 6-0- β -D-xylopyranosylaucubin from verbascum sinuatum. *Phytochemistry*. 19 (4). 571.573.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie-plantes médicinales-3ème Edition Techniques et documentations. Paris. ISBN 2-7430-0315-4.

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. Correlation with toxicity. *Biocell*, 30: 259–267.

Références bibliographique

DUKE. (1929). Duke JA. Handbook of Biological Active Phytochemicals and their Active Phytochemicals and their Activities. CRC Press, 1992; Boca Raton, FL.

EFFENDI A., GERHAUSER H. & BRIDGWATER A.V. (2008). Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 12(8), 2092- 2116.

EPSIE M., EXTRA J.M., COTTU P.H., CUVIER C. et MARTY M. (1998). Médicament anticancéreux. 69: 917-945. *In* Schorderet M., 1998.

FARNSWORTH N. R. (1968). Hallucinogenic plants. *Science* 162: 1086-1092.

FASLA B. (2009). Evaluation du potentiel antimétabolique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse Magister, Université d'Oran Es-sénia. Algérie, 172 p.

FOLLEZOU J.Y. et POUILLART P. (1980). Précis de chimiothérapie anticancéreuse. Doin éd., Paris, p.44683.

GARRETT R.H et GRISHAM C.M. (2000). Biochimie. 2ème Edition, De Boeck, USA. ISBN 2744500208.

GOEL N., SINGH N et SAINI R. (2009). Efficient *in vitro* multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6 benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nature and Science*.7(7), 1545-0740.

GORIN N.C., PHILIP T. et SYMANN M. (1996). Manuel pratique d'hématocancérologie et de chimiothérapie. Frison – Roche, eds., Paris, p. 13-20.

GUERITTE et FAHY. (2005). The vinca alkaloids. *In* Cragg G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., 2005.

GUIRAUD J. et GALZY P. (1998). L'examen au microscope. Partie 1 Techniques générales de la microbiologie. In : L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Éditions de l'usine nouvelle, Paris, Collection Génie alimentaire.

Références bibliographique

HADI M. (2004). La quercitine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres ; études et application thérapeutiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en science de l'université Louis Pasteur, domaine : pharmacochimie. 155p.

HARBORNE J.B., WILLIAMS Ch.A.(1992). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55, 481–504.

HERMS, D.A. et MATTSON, W.J. (1992). The dilemma of plants: To grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, 67, 283-335.

IDRISSI HASSANI LM, HERMAS J. (2008). Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera, Acrididae). *Zool Baetica* 19 :71-84.

ISERIN P., MOULARD F., RACHEL R., BIAUJEAUD M., RINGUET J., BLOCH J., YBERT E., VICAN P., MASSON M., MOULARD F., RESTELLINI J-P et BOTREL A. (2001). La rousse : encyclopédie des plantes médicinales ; identification, préparation, soins. 2^e éd, Paris, pp.155-291.

JINOUS A. et FERESHTEH R. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afric. J. of Pharm. and Pharmacol.*, 6(22), 1573-1580.

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

LAWSON A. M. (2006). Etude phytochimique d'une fabacée tropicale, • *Lonchocarpus Nicou*. Evaluation Biologique Préliminaire. Thèse de doctorat, Université de Limoges

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

MONSIF H.R., GHOBADI A et IRANSHAHI. (2004). Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. Alkaloid extract on mouse formalin test. *J PharmPharmaceuSci.* 7(1), 65-69.

MOSHIRI M., ETEMAD L., JAVIDI S. and ALIZADEH A. (2013). *Peganum harmala* intoxication, a case report. *Avicenna J. of Phytomed.*, 3(3), 288-292.

NATH D., SETHI N., SRIVASTAVA R., JAIN A.K. ET SINGH R.K. (1993). Study on

Références bibliographique

the teratogenic and antifertility activity of *Peganum harmala*. *Fitoterapia*, 64: 321-324.

PAINTING K. et KIRSOP B. (1990). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6 (3), 346-347.

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.

SOHAIL., A. IJAZ., MS YOUSAF., K. ASHRAF., H. ZANEB., M. ALEEM., H. REHM AN (2010). Atténuation du stress thermique cyclique chez les poulets de chair par une supplémentation alimentaire en mannane-oligosaccharide et probiotique à base de lactobacilles : dynamique du cortisol, des hormones thyroïdiennes, du cholestérol, de la protéine C réactive et de l'immunité humorale Poulet. *Sci.*, 89 (2010), p. 1934 – 1938.

SHWETA S., KHADABADI S. et TAPADIYA GANESH G. (2012). *In vitro* evaluation of antimutagenic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extracts of *Revia hypocrateriforis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2 (1), S503-S508.

TAHROUCH S., RAPIOR S., MONDOLOT-COSSON L., IDRISSE-HASSANI L. A., BESSIERE J. M. et ANDARY C., (2002). *Peganum harmala* L: source combinée d'arômes et de colorants. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2 (2): 33-37.

Teiten, MH., Eifes S., Reuter S., Duvoix A., Dicato M., Diederich M. (2010). Profil d'expression génique lié aux propriétés anti-inflammatoires de la curcumine dans les cellules leucémiques K562. *Anne. NY Acad. Sci.* 2010, 1171, 391-398.

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

VERMERRIS W. et NICHOLSON R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht.

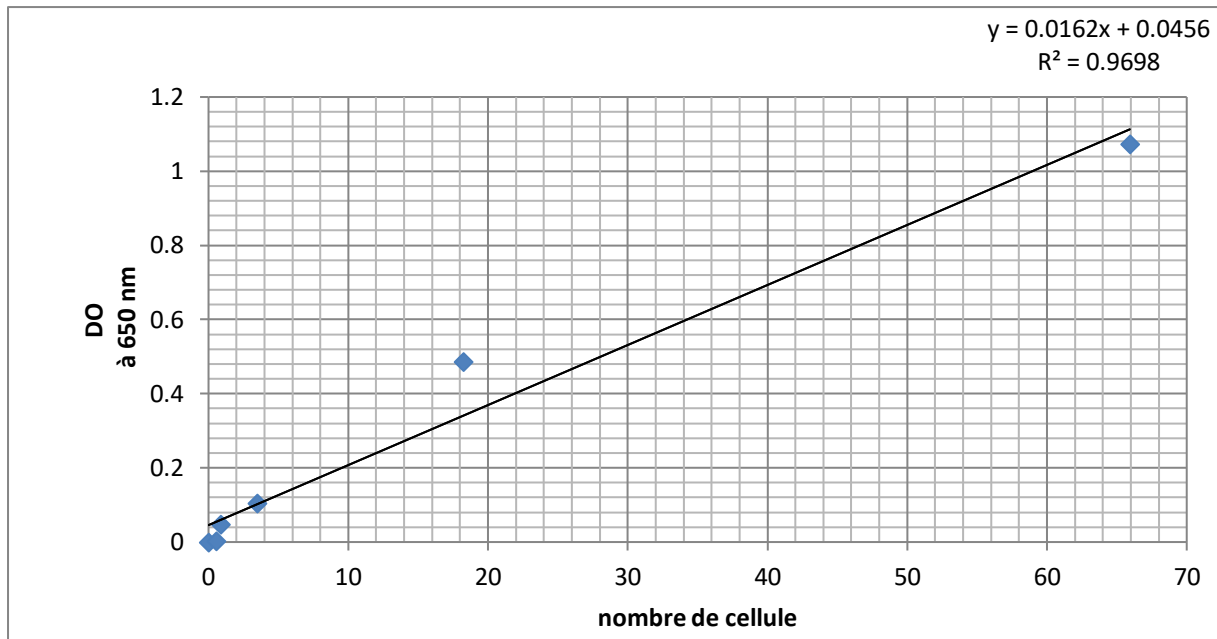
Références bibliographique

YOUSEFI R., GHAFFARIFAR F. and DALIMI A.A. (2009). The Effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* L Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) *in vitro*. *Iranian J. Parasitol.*, **4**, 40-47.

Annexes 1

Tableau de la gamme d'étalonnage

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



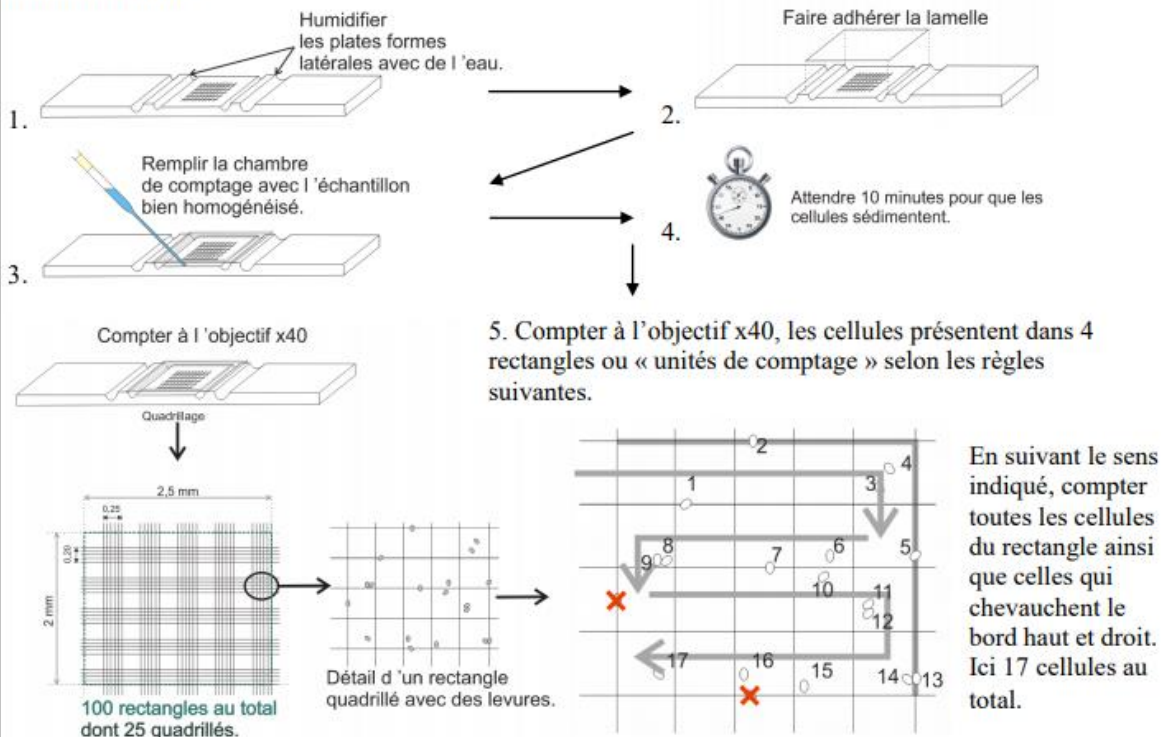
Courbe d'étalonnage de nombre de cellule en fonction de DO optique

Annexe 2

Description de la cellule Malassez

La cellule Malassez est une lame spéciale, quadrillée, qui permet de dénombrer dans un volume précis et connu, tous les éléments visibles à l'objectif 40 du microscope.

Mode opératoire



Sur Malassez un rectangle ou unité de comptage contient $0,01 \text{ mm}^3$ c'est-à-dire $0,01 \mu\text{L}$ d'échantillon (rappel $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L} = 1.10^{-3} \text{ mL} = 1.10^{-6} \text{ L}$).

ANNEXE 3

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

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

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

Résumé

Peganum harmala L. est une plante de la famille des Zygophyllaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle. C'est une plante riche en métabolites secondaires à l'origine de plusieurs activités biologiques principalement : antibactérienne, anticancéreuse et antiproliférative. Dans le présent travail nous avons procédé à l'extraction des flavonoïdes foliaires (fractions aqueuse et butanolique). L'évaluation du pouvoir antiprolifératif est réalisée en utilisant la levure de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle expérimental, par la coloration au bleu de méthylène. Nos résultats ont révélé que les deux fractions présentent un effet cytotoxique et antiprolifératif sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Le pourcentage de cytotoxicité de la fraction butanolique ($74.218 \pm 0.980\%$) est plus important que celui obtenu avec la fraction aqueuse ($45.297 \pm 3.217\%$) comparativement à la quercétine ($47.026 \pm 2.262\%$) utilisée comme standard. L'étude statistique de type ANOVA a mis en évidence une différence hautement significative ($P=0.00$) entre les extraits testés (la fraction butanolique, aqueuse) et la quercétine.

Mots clés : *Peganum harmala L.*, *Saccharomyces cerevisiae*, flavonoïdes, antiprolifératif et cytotoxique.

Abstract

Peganum harmala L. is a plant of the Zygophyllaceae family, widely used in traditional medicine. It is a plant rich in secondary metabolites which are responsible for several biological activities, mainly antibacterial, anti-cancer and antiproliferative. In the present work we proceeded to the extraction of leaf flavonoids (aqueous and butanolic fractions). The evaluation of the antiproliferative power is carried out using *Saccharomyces cerevisiae* yeast as experimental model, by methylene blue staining. Our results revealed that both fractions show cytotoxic and antiproliferative effect on *Saccharomyces cerevisiae* cells. The percentage of cytotoxicity of the butanolic fraction ($74.218 \pm 0.980\%$) is higher than that obtained with the aqueous fraction ($45.297 \pm 3.217\%$) compared to quercetin ($47.026 \pm 2.262\%$) used as standard. The statistical study of ANOVA type showed a highly significant difference ($P=0.00$) between the tested extracts (butanolic, aqueous fraction) and quercetin.

Key words: *Peganum harmala* L., *Saccharomyces cerevisiae*, flavonoids, antiproliferative and cytotoxic.